

**Everton Macêdo Silva**

**Avaliação de compostos isolados da espécie do  
Cerrado *Clusia pernambucensis* G. Mariz em  
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Brasília, DF

2012



**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde**

**Everton Macêdo Silva**

**Avaliação de compostos isolados da espécie do  
Cerrado *Clusia pernambucensis* G. Mariz em  
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Tese de Doutorado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília como  
requisito para obtenção do título  
de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Salmen Espindola**

Brasília, DF

2012

*A minha esposa, meus pais e meu irmão.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela companhia no dia a dia de trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila, pela oportunidade de ser orientado na minha formação acadêmica.

À Keyla, *corazón de mi vida*, por ser capaz de me inspirar, motivar, escutar, ajudar, trabalhar várias noites juntos no laboratório... Por tudo isso, vejo sua marca em cada obstáculo vencido nessa etapa.

Aos meus pais, Consolação e Fernando e ao meu irmão Elber, por recarregar minhas forças continuamente, com amor incondicional.

A todos do Laboratório de Farmacognosia, especialmente Ellen, Mariana, Lorena, que sempre foram companheiras no trabalho e na vida.

Ao Prof. Dr. José Raimundo Braz-Filho (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), por salvar meu trabalho algumas vezes e abrir uma nova luz onde ninguém mais podia.

Ao Prof. Dr. José Elias de Paula (Universidade de Brasília), pelos ensinamentos de vida, pelo conhecimento, e por ser uma pessoa especial na Academia.

Ao Prof. Dr. Geraldo Mariz (†, Universidade Federal de Pernambuco), pela identificação da espécie *Clusia pernambucencis* G. Mariz, abordada nesse estudo.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira (Universidade Federal do Ceará), por mais uma vez me enriquecer com seu conhecimento e pela oportunidade de usufruir do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Mendonça (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), pela simplicidade e presteza imutáveis, e pela parceria e amizade duradouras.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (Universidade de São Paulo), por todo o suporte de seu laboratório e pela contribuição importante à nossa pesquisa.

À Dr<sup>a</sup>. Lindomar Guedes Freire-Filha, que me guiou na iniciação científica e sem ela não seria possível esse trabalho com *Leishmania*.

Aos que me ajudaram a chegar até aqui, lembro-me de todos.

Ao Dr. André Gustavo Tempone Cardoso (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo), por aceitar participar da banca examinadora.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloísa Dutra Caldas (Universidade de Brasília), por aceitar participar da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero (Universidade de Brasília), por contribuir imensamente com seu conhecimento durante todo o trabalho, pela estrutura disponibilizada e por aceitar participar da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa (Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ - UNESP/Araraquara), por aceitar participar da banca examinadora.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Carneiro Albernaz (Universidade de Brasília), por aceitar participar da banca examinadora.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Tratamento.....	18
1.1.1. Antimoniais pentavalentes .....	19
1.1.2. Anfotericina B.....	20
1.1.3. Miltefosina .....	21
1.1.4. Pentamidina .....	22
1.1.5. Paromomicina .....	23
1.2. Perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos .....	23
1.3. <i>Clusia pernambucensis</i> G. Mariz .....	36
2. JUSTIFICATIVA .....	40
3. OBJETIVOS .....	41
3.1. Objetivo Geral .....	41
3.2. Objetivos específicos .....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. Obtenção dos extratos brutos .....	42
4.2. Fracionamento por métodos de cromatografia .....	43
4.2.1. Cromatografia em coluna .....	43
4.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	43
4.2.3. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> .....	44
4.3. Identificação Estrutural.....	45
4.3.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	45
4.3.2. Espectrometria de massas.....	45
4.3.3. Espectroscopia de Infra-vermelho.....	46
4.4. Análise física.....	46
4.4.1. Determinação de rotação óptica .....	46
4.5. Animais .....	46
4.5.1 Aspectos éticos .....	47
4.6. Cultura de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania)</i> <i>amazonensis</i> .....	47

4.7. Ensaio dos extratos brutos em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	47
4.8. Avaliação da toxicidade dos extratos brutos em células NIH-3T3.....	48
4.9. Ensaio dos compostos em formas amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	49
4.10. Avaliação da toxicidade dos compostos em macrófagos murinos .....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. Composto CP1.....	62
5.2. Derivado 1a.....	78
5.3. Compostos CP2 e seu derivado 2a, CP3, CP4 e CP5.....	89
5.3.1 Composto CP2.....	90
5.3.2. Derivado 2a.....	100
5.3.3. Composto CP3.....	101
5.3.4. Composto CP4.....	103
5.3.5. Composto CP5.....	106
5.3.6. Tocotrienóis.....	112
5.4. Composto CP6.....	114
5.5. Composto CP7.....	116
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	117
7. PERSPECTIVAS.....	119
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	121

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesão ulcerada de leishmaniose cutânea. ....	15
Figura 2. Ciclo de vida <i>Leishmania</i> sp.....	16
Figura 3. Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose. ....	18
Figura 4. <i>Clusia pernambucensis</i> G. Mariz (Clusiaceae). Caule e flor, folha e fruto. ....	36
Figura 5. Benzofenonas isoladas de resinas florais de <i>Clusia</i> . ....	38
Figura 6. Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> .....	56
Figura 7. Estrutura do composto CP1, denominado clusiauxantona.....	62
Figura 8. Cromatograma do grupo G-15 do extrato AcOEt da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> . ....	63
Figura 9. Espectro de absorção em infravermelho (cm <sup>-1</sup> ) do composto CP1. .	64
Figura 10. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto CP1 (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N). ....	66
Figura 11. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto CP1 (125 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N). ....	68
Figura 12. Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° do composto CP1 (125 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N). ....	68
Figura 13. Espectro HSQC do composto CP1. ....	69
Figura 14. Espectro HMBC do composto CP1. ....	71
Figura 15. Espectro COSY do composto CP1. ....	73
Figura 16. Espectro de massas do composto CP1 em alta resolução ESI-MS em modo positivo [M+H] <sup>+</sup> . ....	74
Figura 17. Espectro de massas do composto CP1 em alta resolução ESI-MS (erro de 16 ppm) em modo negativo [M-H] <sup>-</sup> . ....	75
Figura 18. Estrutura básica de xantonas. ....	75
Figura 19. Biosíntese geral de xantonas. ....	76
Figura 20. Composto 1a, derivado semi-sintético da clusiauxantona (CP1). ....	78
Figura 21. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do derivado 1a (500 MHz, MeOD). ....	79
Figura 22. Espectro de RMN <sup>13</sup> C do derivado 1a (125 MHz, MeOD). ....	80
Figura 23. Espectro HSQC do derivado 1a. ....	81
Figura 24. Espectro HMBC do derivado 1a. ....	82
Figura 25. Espectro de massas do derivado 1a em alta resolução ESI-MS (erro de 0 ppm) em modo positivo [M+H] <sup>+</sup> . ....	84
Figura 26. Lâminas de microscopia óptica dos ensaios com amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> intra-macrófago. ....	86
Figura 27. Núcleo xantônico do composto CP1 e seu derivado 1a. ....	88



Figura 28. Cromatograma do grupo G-19 do extrato AcOEt da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> . .....	90
Figura 29. Estrutura do ácido Z- $\delta$ -tocotrienólico (CP2). .....	90
Figura 30. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CP2 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	92
Figura 31. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ do composto CP2 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	92
Figura 32. Espectro HSQC do composto CP2. .....	94
Figura 33. Espectro HMBC do composto CP2. .....	95
Figura 34. Espectro COSY do composto CP2. .....	97
Figura 35. Espectro de massas do composto CP2 em alta resolução ESI-MS (erro de 25 ppm) em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ . .....	98
Figura 36. Hipótese de ionização de CP2. .....	98
Figura 37. Composto 2a, derivado semi-sintético do composto CP2. ....	100
Figura 38. Estrutura do $\delta$ -tocotrienol (CP3). .....	101
Figura 39. Espectro de massas do composto CP3 em alta resolução ESI-MS em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ . .....	102
Figura 40. Proposta de mecanismo de ionização do composto CP3 em espectrometria de massas. ....	102
Figura 41. Estrutura do $\delta$ -tocotrienol-metil-éster (CP4). .....	103
Figura 42. Espectro de massas do composto CP4 em alta resolução ESI-MS em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ . .....	104
Figura 43. Proposta de mecanismo de ionização do composto CP4 em espectrometria de massas. ....	104
Figura 44. Estrutura do álcool $\delta$ -tocotrienólico (CP5). .....	106
Figura 45. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto CP5 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	107
Figura 46. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 $^\circ$ do composto CP5 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	108
Figura 47. Espectro HSQC do composto CP5. .....	109
Figura 48. Espectro HMBC do composto CP5. .....	110
Figura 49. Espectro COSY do composto CP5. .....	111
Figura 50. Estrutura geral de tocoferóis e tocotrienóis. ....	112
Figura 51. Estrutura química do ácido betulínico, isolado a partir do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> . ....	114
Figura 52. Estrutura química do $\beta$ -sitosterol, isolado a partir do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> . ....	116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leishmaniose tegumentar americana - Casos confirmados notificados, Brasil, 2010. ....	17
Tabela 2. Revisão da literatura sobre compostos avaliados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em <i>Leishmania</i> spp entre 2011 e 2012. ....	27
Tabela 3. Atividade de extratos de plantas do Cerrado em <i>L. (L.) amazonensis</i> e citotoxicidade em células NIH-3T3. ....	52
Tabela 4. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> . ....	55
Tabela 5. Compostos isolados da casca do caule de <i>C. pernambucensis</i> e derivados semi-sintéticos. ....	58
Tabela 6. Atividade dos compostos em amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> (CI <sub>50</sub> - µg/mL) e avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos (CC <sub>50</sub> - µg/mL) ....	61
Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C para o composto CP1.....	67
Tabela 8. Correlações HSQC e HMBC do composto CP1.....	72
Tabela 9. Correlações HSQC do derivado 1a. ....	83
Tabela 10. Fracionamento do grupo G-19 do extrato acetato de etila da casca do caule de <i>Clusia pernambucensis</i> em RP-CLAE. ....	89
Tabela 11. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C para o composto CP2.....	93
Tabela 12. Correlações HSQC e HMBC do composto CP2.....	96
Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C para CP5. ....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{l}$  - microlitro  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> – poder rotatório  
 $\mu\text{g}$  - micrograma  
AcOEt – Acetato de Etila  
Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATP – Adenosina trifosfato  
c - concentração  
C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N – piridina  
CC<sub>50</sub> Concentração responsável por cinquenta por cento do efeito citotóxico  
CCD – Cromatografia em camada delgada  
CD<sub>3</sub>OD – metanol deuterado  
CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
cm<sup>-1</sup> – unidade de infravermelho  
CO<sub>2</sub> - ácido carbônico  
COSY - espectroscopia de correlação (*correlated spectroscopy*)  
d - dubleto  
dd - duplo dubleto  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNDi – Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas  
ESI-TOF-MS - Espectrometria de massas com ionização por eletrospray e tempo de vôo (*electrospray ionization time of flight mass spectrometry*)  
g - grama  
G – unidade de força centrífuga  
GTP – Guanosina trifosfato  
h - hora  
H<sub>2</sub>O - água  
HMBC - *heteronuclear multiple bond coherence*  
HR-ESI-MS – Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (*high resolution electrospray ionization mass spectrometry*)  
HSQC - *heteronuclear single-quantum coherence*  
HTS – Triagem de alta resolução (*high throughput screening*, em inglês)  
Hz - hertz  
CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória de 50% do efeito leishmanicida  
J – constante de acoplamento  
K<sup>+</sup> - íon potássio  
KBr – Brometo de potássio  
kg - quilograma  
Kgf – quilograma-força  
km - quilômetro  
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

m - multiplete  
m/z – relação massa/carga  
MeCN - Acetonitrila  
MeOH - Metanol  
mg - miligrama  
MHz - megahertz  
min - minuto  
mL - mililitro  
mm - milímetro  
MTS – Triagem de média resolução (*medium throughput screening*)  
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
NIH-3T3 – linhagem celular de fibroblastos embrionários de camundongo Swiss  
nm - nanômetro  
°C - celsius  
ODS - Octadecilsilano  
PBS – solução tampão fosfato  
PDA – Arranjo de fotodiodo (*Photodiode array*)  
ppm – parte por milhão  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze  
RMN <sup>13</sup>C DEPT 135° - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 – Intensificação da Distorção por Transferência de Polarização  
RMN <sup>13</sup>C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 – Desacoplamento com Pulso Composto  
RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
RP-CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa  
rpm – rotação por minuto  
s - singleto  
Sb<sup>3+</sup> - antimônio trivalente  
Sb<sup>5+</sup> - antimônio pentavalente  
SFB - soro fetal bovino inativado  
SINAN/SVS – Sistema de Informações de Agravos de Notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde  
t - tripleto  
TMS - tetrametilsilano  
UnB – Universidade de Brasília  
UV - Ultravioleta  
δ – deslocamento químico

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é uma doença endêmica que provoca lesões destrutivas e persistentes na pele e mucosas. Os medicamentos disponíveis apresentam toxicidade considerável e observa-se o crescente aparecimento de resistência medicamentosa, o que demonstra a necessidade da busca por compostos mais específicos para tratar esse agravo. A investigação do potencial de substâncias naturais se mostra uma abordagem eficiente, inclusive como parâmetro para a obtenção de compostos semi-sintéticos e sintéticos. Neste estudo, foi testada a atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos das espécies do bioma Cerrado *Austroplenckia populnea* (Reissek) Lundell (Celastraceae); *Clusia pernambucensis* G. Mariz (Clusiaceae) e *Maprounea guianensis* Aubl. (Euphorbiaceae) entre 100 e 1,56 µg/mL em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. O extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis* apresentou atividade com  $CI_{50} = 65,0$  µg/mL, e a menor citotoxicidade observada em fibroblastos da linhagem celular NIH-3T3, com  $CC_{50} = 100,5$  µg/mL, sendo selecionado para os estudos químicos. O fracionamento desse extrato por cromatografia em coluna e CLAE permitiu o isolamento de sete substâncias, identificadas por espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear  $^1H$  e  $^{13}C$  e espectrometria de massas de alta resolução. Foi isolada e caracterizada uma xantona ainda não relatada na literatura, 6,9-dihidróxi-3,3-dimetil-5-(3-metilbut-2-enil)pirano[2,3-c]xanten-7(3H), denominada pelo nosso grupo de clusioxantona (**CP1**). Esse composto apresentou  $CI_{50} = 25,3$  µg/mL em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* no interior de macrófagos peritoneais coletados de camundongos Balb/C, enquanto seu derivado semi-sintético metil éter (**1a**) obteve  $CI_{50} = 22,5$  µg/mL. Quatro tocotrienóis ainda não descritos nessa espécie também foram isolados e identificados: ácido Z-δ-tocotrienólico (**CP2**), δ-tocotrienol (**CP3**), δ-tocotrienol-metil-éster (**CP4**), e álcool δ-tocotrienólico (**CP5**). Os compostos **CP3** e **CP4** foram isolados pela primeira vez de fonte natural. Em relação a atividade em macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis*, o ácido Z-δ-tocotrienólico (**CP2**) mostrou  $CI_{50} = 77,3$  µg/mL, enquanto que o seu derivado metilado (**2a**) e os compostos **CP3**, **CP4** e **CP5** não apresentaram ação leishmanicida. O ácido betulínico (**CP6**) e o β-sitosterol (**CP7**) também foram isolados. A citotoxicidade em macrófagos murinos mostrou  $CC_{50} = 17,22$  µg/mL para a clusioxantona (**CP1**), 32,56 µg/mL para o derivado **1a** e 78,04 µg/mL para o δ-tocotrienol-metil-éster (**CP4**). Outros derivados serão propostos para diminuir a citotoxicidade e aumentar a atividade leishmanicida. Os compostos isolados e já caracterizados servirão como base para avançar na busca por candidatos a compostos líderes.

Palavras-chave: Cerrado, *Clusia pernambucensis*, clusioxantona, série de tocotrienóis, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, formas amastigotas, macrófagos murinos.

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, is an endemic disease that causes destructive and persistent lesions in skin and mucous. The available drugs present significant toxicity and the increasing drug resistance is observed, which demonstrates the need to search for more specific compounds to treat this disease. The investigation of the potential of natural substances shows itself an efficient approach, including as a parameter for obtaining semi-synthetic and synthetic compounds. In this study, we tested the *in vitro* leishmanicidal activity of extracts from species of the Cerrado biome *Austroplenckia populnea* (Reissek) Lundell (Celastraceae); *Clusia pernambucensis* G. Mariz (Clusiaceae) and *Maprounea guianensis* Aubl. (Euphorbiaceae) between 100 and 1.56 µg/mL in promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The ethyl acetate extract of the stem bark of *Clusia pernambucensis*, showed leishmanicidal activity with  $IC_{50} = 65.0$  µg/mL, and the lowest cytotoxicity observed in NIH-3T3 cell line fibroblasts with  $CC_{50} = 100.5$  µg/mL, being selected for chemical studies. Fractionation of this extract by column chromatography and HPLC allowed the isolation of seven substances, identified with infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR and high-resolution mass spectrometry. It was isolated and characterized one xanthone not yet reported in the literature, 6,9-dihydroxy-3,3-dimethyl-5-(3-methylbut-2-enyl)pyrano[2,3-c]xanthen-7(3H), named clusiaxanthone (**CP1**) by our group. This compound showed  $IC_{50} = 25.3$  µg/mL in amastigotes of *L. (L.) amazonensis* within peritoneal macrophages harvested from Balb/C mice, while its methyl ether semi-synthetic derivative (**1a**) obtained  $IC_{50} = 22.5$  µg/mL. Four tocotrienols not yet described in this specie were also isolated and identified: Z- $\delta$ -tocotrienoloic acid (**CP2**),  $\delta$ -tocotrienol (**CP3**),  $\delta$ -tocotrienol-methyl-ester (**CP4**), and alcohol- $\delta$  tocotrienolic (**CP5**). The compounds **CP3** and **CP4** were first isolated from a natural source. Regarding the activity in murine macrophages infected with *L. (L.) amazonensis*, the Z- $\delta$ -tocotrienoloic acid (**CP2**) showed  $IC_{50} = 77.3$  µg/mL, whereas its semi-synthetic methylated derivative **2a** and the compounds **CP3**, **CP4** and **CP5** did not show anti-leishmanial activity. Betulinic acid (**CP6**) and  $\beta$ -sitosterol (**CP7**) were also isolated. The cytotoxicity in murine macrophages showed  $CC_{50} = 17.22$  µg/mL for clusiaxanthone (**CP1**), 32.56 µg/mL for the derivative **1a** and 78.04 µg/mL for the  $\delta$ -tocotrienol-methyl ester (**CP4**). Other derivatives will be proposed to decrease cytotoxicity and increase the leishmanicidal activity. The compounds isolated and already characterized will serve as the basis for progress in the search for candidate lead compounds.

Keywords: Cerrado, *Clusia pernambucensis*, clusiaxanthone, series of tocotrienols, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, amastigote forms, murine macrophages.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias se mantêm dentre os problemas de saúde pública mais relevantes, com milhões de pessoas infectadas anualmente, resultando em consequências sociais e econômicas devastadoras, e aumento significativo na mortalidade mundial (Renslo & McKerrow, 2006; Hotez *et al.*, 2007; Borborema *et al.*, 2011). A leishmaniose integra o grupo das seis endemias mundiais consideradas prioritárias pela Organização Mundial de Saúde, juntamente com a malária, a doença de Chagas, a tuberculose, a tripanossomíase africana e o dengue (Organização Mundial de Saúde, 2010).

A classificação da doença, feita de acordo com suas manifestações clínicas, compreendem duas formas: a visceral e a tegumentar (Bories *et al.*, 2008). No caso da leishmaniose tegumentar americana (LTA), existem as formas cutânea, mucocutânea e difusa (David & Craft, 2009). As três principais espécies do parasito responsáveis pela transmissão da LTA ao homem, no Brasil, são: a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que é o agente etiológico mais presente na leishmaniose mucocutânea, a *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Esta última está mais diretamente relacionada às formas cutânea e cutânea difusa (França-Costa, 2012; Brasil, 2006). Os sinais apresentados durante cada uma dessas manifestações clínicas são determinados pela espécie de *Leishmania* envolvida, ou seja, os mecanismos que o parasito utiliza para promover sua infecção e a capacidade de resposta do hospedeiro (Ameen, 2010).

As lesões provocadas pela forma cutânea costumam persistir por vários meses ou anos e suas características podem variar de acordo com a espécie (Figura 1, p. 15) (Lucas *et al.*, 2010). Já a forma mucocutânea leva o paciente a sofrer

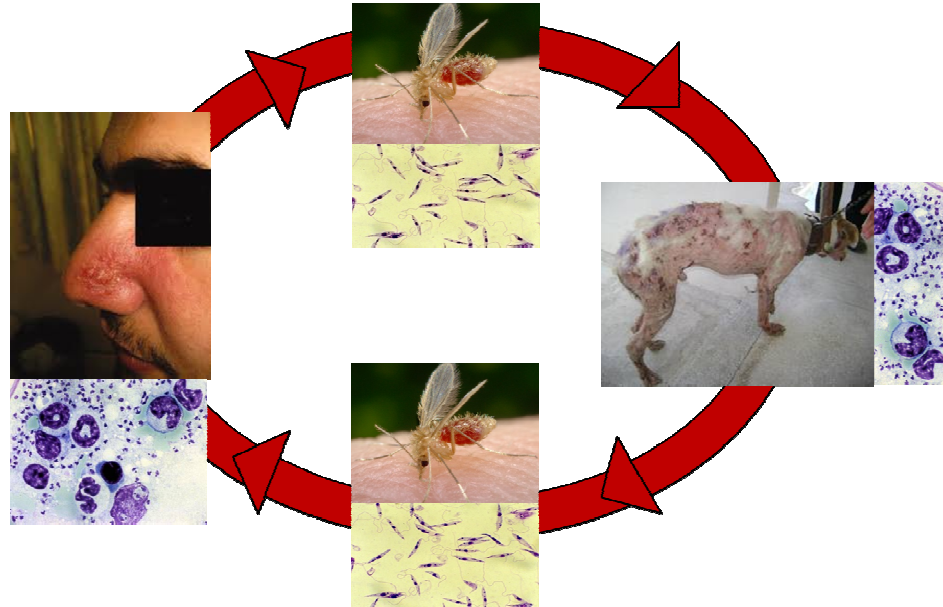
ulcerações destrutivas que progressivamente se estendem para as mucosas do nariz e da boca, podendo atingir laringe e faringe (Santos *et al.*, 2008).



**Figura 1. Lesão ulcerada de leishmaniose cutânea. Fonte: Antinori *et al.*, 2012.**

O inseto vetor da LTA é um flebotomíneo fêmea com hábito hematófago (Reithinger *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008), pertencente ao gênero *Lutzomyia*. Esse inseto é conhecido popularmente como tatuquira, mosquito palha, birigui, etc. (Brasil, 2007). A espécie que atua como principal vetor do parasito *L. (L.) amazonensis* é *Lutzomyia flaviscutellata*, que possui ampla distribuição por dezessete estados brasileiros (Brasil, 2006). Durante o ciclo de vida (Figura 2, p. 16), a forma extracelular promastigota flagelada está presente no sistema digestivo do inseto vetor, então o inseto vetor infectado é capaz de inocular o parasito em um organismo vertebrado. Uma vez no interior do hospedeiro, o parasito é internalizado por células fagocíticas, e em seguida convertido na forma amastigota, que é aflagelada e arredondada (Carvalho *et al.*, 2008).





**Figura 2. Ciclo de vida *Leishmania* sp.**

A leishmaniose atinge 98 países e territórios de forma endêmica, com prevalência mundial de 12 milhões de pessoas, além da incidência anual de 2 milhões de casos, em média. Mais de 90% dos casos da forma tegumentar ocorrem no Irã, Síria, Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil e Peru (Borborema *et al.*, 2011; Dujardin *et al.*, 2010; Organização Mundial de Saúde, 2010). No Brasil foram notificados em 2009, 23.608 casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana (Tabela 1, p. 17) ressaltando a importância epidemiológica dessa doença no país (SINAN/SVS, 2010).

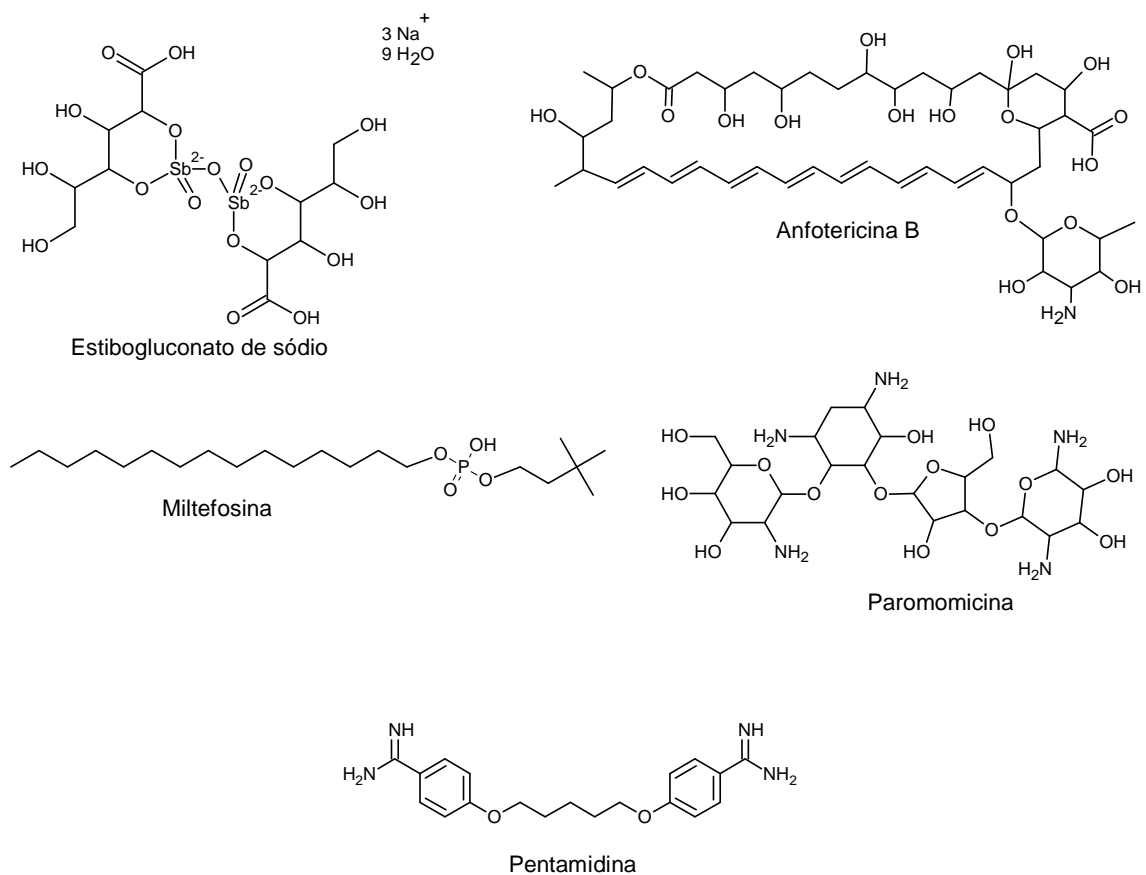
**Tabela 1. Leishmaniose tegumentar americana - Casos confirmados notificados, Brasil, 2010.**

UF Notificação	Leishmaniose Cutânea	Leishmaniose Mucosa	Total
Acre	815	223	1038
Alagoas	79	4	83
Amapá	557	8	565
Amazonas	1500	71	1571
Bahia	3567	119	3686
Ceará	1027	27	1054
Distrito Federal	27	19	46
Espírito Santo	100	16	116
Goiás	455	57	512
Maranhão	1727	34	1761
Mato Grosso	3924	205	4129
Mato Grosso do Sul	93	31	124
Minas Gerais	1033	109	1142
Pará	3467	98	3565
Paraíba	116	6	122
Paraná	386	76	462
Pernambuco	553	9	562
Piauí	118	9	127
Rio de Janeiro	104	19	123
Rio Grande do Norte	61	1	62
Rio Grande do Sul	9	0	9
Rondônia	976	149	1125
Roraima	446	25	471
Santa Catarina	48	4	52
São Paulo	357	100	457
Sergipe	12	4	16
Tocantins	578	50	628
<b>Total</b>	<b>22135</b>	<b>1473</b>	<b>23608</b>

Fonte: SINAN/SVS, 2010.

### 1.1. TRATAMENTO

O tratamento atualmente disponível para leishmaniose consiste principalmente no uso de antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina; a anfotericina B, um agente antimicrobiano disponível em formulação injetável convencional ou formulação lipossomal; a miltefosina; a pentamidina; mais recentemente a paromomicina, também um medicamento parenteral eficaz (Figura 3, p. 18) (Romero & Boelaert, 2010; Sundar & Chakravarty, 2008). A única alternativa de terapia oral em uso é a miltefosina (Alvar *et al.*, 2006).



**Figura 3. Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.**

### 1.1.1. Antimoniais pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes são considerados como tratamento de escolha para a leishmaniose. Sabendo-se que a atividade está relacionada ao  $\text{Sb}^{5+}$ , o esquema terapêutico é calculado em  $\text{mg/Sb}^{5+}/\text{dia}$ . Assim, a utilização de antimoniato de meglumina (ou antimoniato de *N*-metilglucamina) ou estibogluconato de sódio permitirá a administração da mesma quantidade de antimônio pentavalente prevista em protocolo clínico (Brasil, 2006).

O medicamento disponível no Brasil é o antimoniato de *N*-metilglucamina, que é utilizado para administração parenteral, pois não possui boa absorção oral. O período de tratamento é de vinte a trinta dias, com cerca de 90% de eficácia (Den Boer *et al.*, 2011).

A ação dos antimoniais pentavalentes é pouco expressiva quando testada *in vitro* em formas promastigotas do parasito. No entanto, a atividade observada em formas intracelulares amastigotas é completamente diferente (Ameen, 2010). A redução de  $\text{Sb}^{5+}$  em  $\text{Sb}^{3+}$  no sistema de células fagocíticas hospedeiras é provavelmente uma das razões que permite aos antimoniais pentavalentes uma resposta clínica relevante (Decuypere *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação dessa classe de medicamentos envolve a redução do aporte de ATP e GTP, essenciais para a manutenção biológica do protozoário. Os antimoniais agem através de duas vias, primeiramente estimulando os macrófagos infectados a provocar estresse oxidativo no parasito intracelular e também pela ação direta do antimônio reduzido ( $\text{Sb}^{3+}$ ) no equilíbrio redox do microrganismo (Decuypere *et al.*, 2012).

Existem desvantagens na terapia da leishmaniose cutânea com antimoniais pentavalentes, como a administração por via parenteral por longo período, o que

dificulta o tratamento em zonas rurais e desvantagens como elevação dos níveis séricos de transaminases hepáticas, que caracteriza a hepatotoxicidade como efeito adverso mais grave. Um dos principais efeitos tóxicos do antimoniato de meglumina está relacionado à função cardíaca, com aparecimento de alterações presentes em eletrocardiograma. Por isso, existe a necessidade frequente de acompanhamento do surgimento de arritmias cardíacas. Além disso, também são notados reações dérmicas locais, anorexia, náuseas, vômitos, mialgia, linfocitose e eosinofilia (Neves *et al.*, 2009; Siqueira-Neto *et al.*, 2010).

Outro ponto desfavorável é o crescente surgimento de cepas de parasitos resistentes aos antimoniais pentavalentes. Por exemplo, taxas de cura variando entre 50 e 90% em regiões endêmicas de *L. braziliensis* no Brasil resultam no uso de esquemas terapêuticos não-responsivos, ocorrência de recidivas, descontinuidade do tratamento e, conseqüentemente, no fracasso do controle da doença (Brendle *et al.*, 2002, Machado *et al.*, 2010).

### **1.1.2. Anfotericina B**

A anfotericina B é um agente antimicrobiano poliênico com potente atividade tanto para a forma promastigota extracelular como para a forma amastigota intracelular. O fármaco atua inibindo o metabolismo de ergosterol presente na membrana plasmática do parasito.

Sua administração requer atendimento hospitalar, visto que o medicamento é disponibilizado na forma de pó liofilizado de desoxicolato sódico de anfotericina B para solução injetável e deve ser mantido em ambiente resfriado (2 a 8 °C). A baixa solubilidade faz com que seja necessário ressuspender o pó em solução diluente para administração. O risco de precipitação também é uma dificuldade a ser

constantemente monitorada. O esquema terapêutico em dias alternados com 1 mg/kg/dia por vinte dias custa cerca de vinte dólares (Organização Mundial da Saúde, 2010).

A toxicidade da anfotericina B está relacionada a diversos aspectos. Ocorre flebite no local da infusão, além do risco de hiperpotassemia quando o volume total da medicação é infundida em período menor que uma hora, provocando distúrbios cardiovasculares, às vezes com parada cardíaca. Com o uso contínuo pode ocorrer hipopotassemia devido à excreção renal de íon  $K^+$ , e a principal complicação que é o comprometimento renal de até 40% dos usuários.

Com o objetivo de reduzir a toxicidade foi desenvolvida a formulação lipossomal de anfotericina B. No entanto, o custo elevado desta formulação torna praticamente inviável sua disseminação para o tratamento da leishmaniose cutânea. No Brasil, a anfotericina B lipossomal não está registrada com indicação para leishmaniose tegumentar, somente para leishmaniose visceral (Anvisa, 2012). No entanto, seu uso pode ocorrer para a forma tegumentar de modo *off label*, ou seja, o médico leva em conta critérios e evidências clínicas que demonstram os benefícios do tratamento (Brasil, 2006). O tratamento de vinte dias custa cerca de quatrocentos e oitenta dólares (Organização Mundial de Saúde, 2010), dificultando qualquer política de medicamentos embasada nesse esquema terapêutico.

### **1.1.3. Miltefosina**

A miltefosina se apresenta como único tratamento oral para a leishmaniose visceral (Ramesh *et al.*, 2008, Berman *et al.*, 2006). Trata-se de uma hexafluorofosfina, cuja eficácia contra a leishmaniose tornou-se conhecida em meados dos anos 80. No entanto, sua comercialização como primeiro agente oral

contra a leishmaniose visceral na Índia ocorreu apenas em 2002 e contra leishmaniose cutânea na Colômbia em 2005. As desvantagens e restrições do seu uso incluem risco de teratogenicidade, potencial de desenvolvimento de resistência e estreita janela terapêutica (Godinho *et al.*, 2012; Natera *et al.*, 2007, Luque-Ortega & Rivas, 2007). Destaca-se ainda o fato de que esse medicamento não está disponível para LTA no Brasil.

Em ensaio clínicos realizado no Brasil para leishmaniose, foi relatado que a eficácia da miltefosina em comparação com o antimoniato de meglumina para leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* foi de 79% versus 45%, respectivamente (Machado *et al.*, 2010). Em outro estudo é descrita eficácia de 69% do antimoniato de meglumina e 83% da miltefosina no para indivíduos tratados em áreas endêmicas de *L. panamensis* e *L. guyanensis* na Colômbia (Rubiano *et al.*, 2012).

#### **1.1.4. Pentamidina**

A pentamidina é utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea com esquema de administração em três doses diárias de 2 a 4 mg/kg intramuscular ou intravenoso, por sete dias consecutivos ou dias alternados. Seu uso contínuo pode induzir diabetes (Ameen, 2010), porém é considerado uma boa alternativa em relação ao tratamento com antimoniais (Antinori *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação desse medicamento envolve a interferência na síntese de DNA, alterações na morfologia do parasito e fragmentação da mitocôndria (David & Craft, 2009).

### 1.1.5. Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico inicialmente indicado para infecção bacteriana. Seu mecanismo de ação antibacteriano envolve a associação a subunidades ribossomais, interferindo na síntese protéica. Antes de ser desenvolvido para o tratamento da leishmaniose cutânea, já havia indicação de uso para giardíase, amebíase e criptosporidiose (Sinha *et al.*, 2011; Chawla *et al.*, 2011).

Embora não se conheça amplamente o modo de ação da paromomicina em *Leishmania*, são propostas vias como a interferência na fluidez da membrana, na síntese protéica e no transporte ativo de moléculas (Chawla *et al.*, 2011; Maarouf *et al.*, 1997). O efeito foi relatado em estudos clínicos fase III na Índia, que demonstraram uma taxa de 94% de eficácia no tratamento intramuscular de leishmaniose visceral (Sundar *et al.*, 2007).

A grande vantagem no esquema terapêutico para a leishmaniose cutânea é a sua administração tópica, evitando efeitos colaterais de vias sistêmicas, sendo relatada apenas irritação no local da aplicação. A formulação desenvolvida consiste na incorporação do fármaco em uréia 10% ou cloreto de benzetônio 12% (Croft & Olliaro, 2011; Ameen, 2010).

## 1.2. PERSPECTIVAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Há diversos obstáculos no desenvolvimento de novos medicamentos para doenças negligenciadas, devido à pequena perspectiva econômica. Em revisão sistemática, Romero e Boelaert (2010) sugerem o estudo da eficácia dos tratamentos de escolha em uso nas Américas, com o objetivo de determinar esquemas terapêuticos mais simples, eficazes e seguros que os atuais. Aguiar *et al.*



(2010) concordam que esta é também uma ação estratégica para o controle da leishmaniose cutânea.

Levando-se em consideração as deficiências no tratamento existente, o surgimento de cepas de parasitos resistentes (Ejara *et al.*, 2010; Seifert & Croft, 2006), há uma necessidade urgente de novos medicamentos para a leishmaniose (Calderon *et al.*, 2009; Kolodziej & Kiderlen, 2005).

Como ponto de partida na pesquisa de novos medicamentos para doenças parasitárias, podemos exemplificar que no ano 2000 apenas 0,1% de todo investimento em pesquisa em saúde foi direcionado a doenças tropicais, como leishmaniose, malária e tripanossomíases (Médecins Sans Frontières, 2001; Global Forum for Health Research, 2004).

Existem diversas vertentes na busca de novos fármacos para doenças parasitárias. Para a leishmaniose, uma ferramenta importante é a combinação de fármacos já existentes para promover a possibilidade de sinergismo, redução de toxicidade e de tempo de tratamento, além de retardar o desenvolvimento da resistência medicamentosa (Vanaerschot *et al.*, 2011; Pink *et al.*, 2005). Outra possibilidade é a procura por atividades inéditas de substâncias já conhecidas, como no caso da miltefosina, que teve seu uso indicado primeiramente como antineoplásico (Ramesh *et al.*, 2008). Nwaka & Hudson (2006) abordam o interesse de formulações tópicas para o tratamento da leishmaniose cutânea.

A Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi, em inglês) é uma parceria público-privada que viabiliza a busca por soluções terapêuticas para doenças negligenciadas. Entre as ações desenvolvidas, encontra-se em nível pré-clínico o desenvolvimento de formulação da hidróxi-naftoquinona buparvaquona (Venkatesh *et al.*, 2010). Após a observação de potencial anti-*Leishmania* em testes

*in vitro* e *in vivo* (Garnier *et al.*, 2007), o próximo objetivo é aumentar a biodisponibilidade oral do composto, em paralelo a ensaios toxicológicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos.

Uma formulação tópica de anfotericina B está em desenvolvimento para leishmaniose cutânea e uma nova formulação lipossomal de anfotericina B também está em fase pré-clínica pelo DNDi, visando a obtenção de polímeros que superem as limitações da forma lipossomal disponível, cujo alto custo impede a disseminação de seu uso em regiões endêmicas (Romero & Morilla, 2008; Golenser & Domb, 2006; DNDi, 2012).

Foi realizada uma revisão bibliográfica na base de dados Scopus buscando informações científicas sobre testes de compostos puros em *Leishmania* ssp. O termo “leishmania” foi pesquisado, com utilização dos limites: “ano de publicação 2011 e 2012” e tipo de documento “article”. A busca resultou em 1.416 publicações. Foram selecionados apenas artigos contendo ensaios *in vitro* com formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intramacrófago e ensaios *in vivo*. Ao final, foram selecionadas cinquenta e duas publicações entre 2011 e 2012 (Tabela 2, p. 27).

Nesse período, um total de duzentos e oitenta e um compostos, sendo cento e oitenta e dois sintéticos ou semi-sintéticos (64,8%), oitenta e quatro de origem natural (29,9%) e quinze produtos comerciais (5,3%), foram avaliados em espécies causadoras de leishmaniose. Noventa e sete substâncias foram testadas em formas amastigotas intracelulares *in vitro* (27,9%), cinquenta e três em amastigotas axênicas (15,2%), cento e noventa e três em formas promastigotas (55,5%), e somente cinco foram utilizados em testes *in vivo* (1,4%), totalizando trezentos e quarenta e oito testes.

Uma porção considerável dos fármacos aprovados para uso nos últimos vinte e cinco anos foi obtida direta ou indiretamente (modificação química e síntese de análogos) a partir de origem natural (Newman & Cragg, 2007).

Tabela 2. Revisão da literatura sobre compostos avaliados *in vitro* e *in vivo* em *Leishmania* spp entre 2011 e 2012.

Composto	Ensaio	Espécie de <i>Leishmania</i>	CI <sub>50</sub> <i>in vitro</i>	Dose efetiva <i>in vivo</i>	Fonte	Referência
Binaftalimidopropil-diamino-octano	<i>In vivo</i>	<i>L. infantum</i>	-	1 mg/kg	Síntese	Tavares <i>et al.</i> , 2012
Asiaticosídeo	Amastigotas	<i>L. donovani</i>	0,1 nM	1 mg/kg	<i>Centella asiatica</i> (Apiaceae)	Bhaumik <i>et al.</i> , 2012
4-[(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5-(5-nitrofurano-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-aminas	Amastigotas	<i>L. major</i>	12,2 µM	-	Síntese	Tahghighi <i>et al.</i> , 2012
Ramiflorina A Ramiflorina B	Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	18,5 µg/mL 12,6 µg/mL	-	<i>Aspidosperma ramiflorum</i> (Apocinaceae)	Cunha <i>et al.</i> , 2012
2H-cromeno-2-tiona Benzo[ <i>f</i> ]cromeno-2-tiona	Promastigotas Amastigotas axênicas Amastigotas	<i>L. donovani</i>	450 / 198 / 17 µM 97 / 36 / 22 µM	-	Síntese	Verma <i>et al.</i> , 2012
Buparvaquona	Promastigotas Amastigotas	<i>L. infantum</i>	2,24/ 1,50 µM	-	Síntese	Reimão <i>et al.</i> , 2012
		<i>L. (L.) amazonensis</i>	4,19/ - µM			
		<i>L. major</i>	- / 3,28 µM			
		<i>L. (V.) braziliensis</i>	- / 1,50 µM			
Benzotiazol cianina 1 Benzotiazol cianina 2	Amastigotas	<i>L. donovani</i>	21 nM -	1 mg/kg 1 mg/kg	Comercial	Xiaohua <i>et al.</i> , 2012
14-oxoprunitifolina Strictosamida	Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	16,0 µg/mL 40,7 µg/mL	-	<i>Psychotria prunifolia</i> (Rubiaceae)	Kato <i>et al.</i> , 2012
(-) mammea A/BB (-) mammea B/BB Fenilcroman-2-ona Hidróxi-fenilcumarina 1 Hidróxi-fenilcumarina 2 Hidróxi-fenilcumarina 3 Hidróxi-fenilcumarina 4	Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	7,4 µM 30,1 µM 0,9 µM 2,4 µM 15,1 µM 1,9 µM 60,2 µM	-	<i>Calophyllum brasiliense</i> (Clusiaceae)/ Derivados semi-sintéticos/ Síntese	Brenzan <i>et al.</i> , 2012
Diaminas N,N'-substituídas  1 2 3 4 5 6 7 8 9	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	11,01 µM 18,63 µM 13,83 µM 10,17 µM 1,75 µM 1,24 µM 8,52 µM 6,73 µM 1,56 µM	-	Síntese	Camino <i>et al.</i> , 2012

10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21			1,45 µM 0,26 µM 0,031 µM 0,24 µM 1,14 µM 4,60 µM 4,50 µM 0,23 µM 0,24 µM 0,21 µM 0,22 µM 1,20 µM			
Triazolopirimidina 1 Triazolopirimidina 2 Triazolopirimidina 3 Triazolopirimidina de cobre 1 Triazolopirimidina de cobre 2 Triazolopirimidina zíncica	Promastigotas	<i>L. infantum</i>	42,4 µM 36,7 µM 56,4 µM 67,1 µM 37,7 µM 29,8 µM	-	Síntese	Caballero <i>et al.</i> , 2012
		<i>L. braziliensis</i>	65,4 µM 71,7 µM 61,8 µM 63,1 µM 40,9 µM 27,5 µM			
Imidazol benzoftalazina 1 Imidazol benzoftalazina 2 Imidazol benzoftalazina 3 Imidazol benzoftalazina 4 Pirazol benzoftalazina 1 Pirazol benzoftalazina 2	Promastigotas Amastigotas axênicas Amastigotas	<i>L. infantum</i>	15,3 / 16,2 / 24,2 µM 12,6 / 14,3 / 20,4 µM 15,4 / 17,7 / 21,2 µM 20,1 / 31,3 / 46,9 µM 17,3 / 28,4 / 26,5 µM 10,0 / 11,5 / 20,3 µM		Síntese	Erfe <i>et al.</i> , 2012
		<i>L. (V.) braziliensis</i>	30,5 / 43,8 / 68,1 µM 10,8 / 12,3 / 26,2 µM 22,4 / 47,5 / 20,9 µM 27,2 / 32,4 / 37,9 µM 21,3 / 20,7 / 23,3 µM 12,9 / 21,9 / 19,9 µM			

			µM			
β-aescina em nanopartícula β-aescina	Amastigotas	<i>L. infantum</i>	0,48-0,76 µg/mL 1,23-1,87 µg/mL	-	Comercial	Van den ven <i>et al.</i> , 2012
Hidróxi-hex-2-en-1-ona 1 Hidróxi-hex-2-en-1-ona 2 Hidróxi-hex-2-en-1-ona 3 Isoxazol 3,5-disubstituído	Promastigotas Amastigotas	<i>L. (V.) braziliensis</i>	21,77/14,29 µg/mL 12,44/8,41 µg/mL 16,02/16,29 µg/mL 3,17/3,97 µg/mL	-	Comercial	Gangwar <i>et al.</i> , 2012
Sakuranetina 59	Promastigotas Amastigotas	<i>L. (L.) chagasi</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) major</i> <i>L. (V.) braziliensis</i>	38,41/43,66 µg/mL 51,89/ - µg/mL 52,60/ - µg/mL 45,12/ - µg/mL	-	<i>Baccharis retusa</i> (Asteraceae)	Grecco <i>et al.</i> , 2012
Diarylheptanosídeo 1 Diarylheptanosídeo 1a Diarylheptanosídeo 1b Diarylheptanosídeo 2a Diarylheptanosídeo 2b Diarylheptanosídeo 2c Diarylheptanosídeo 3 Diarylheptanosídeo 3a Diarylheptanosídeo 4a Diarylheptanosídeo 4b Diarylheptanosídeo 4c Diarylheptanosídeo 5 Diarylheptanosídeo 6 Diarylheptanosídeo 7 Diarylheptanosídeo 8	Amastigotas	<i>L. donovani</i>	39,7 µM 53,0 µM 35,0 µM 31,2 µM 37,4 µM 66,8 µM 10,5 µM 33,2 µM 58,5 µM 33,3 µM 67,5 µM 26,1 µM 41,4 µM 33,0 µM 34,6 µM	-	<i>Pyrostria major</i> (Rubiaceae) Semi-síntese	Beniddir <i>et al.</i> , 2012
1,6a-dihidropirrol[1,2,3]triazol-(3,5)-dionas A B C D E F G H I J K	Amastigota	<i>L. donovani</i>	1,6 µM 3,2 µM 3,5 µM 4,1 µM 2,2 µM 3,6 µM 2,0 µM 3,4 µM 3,5 µM 3,7 µM 4,5 µM	-	Síntese	Durust <i>et al.</i> , 2012
Tirosil caprilato Tirosil capriato Tirosil laurato	Promastigotas	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>	38,09 µg/mL 19,21 µg/mL 60,34 µg/mL 62,8 µg/mL 38,73 µg/mL	-	Síntese	Aissa <i>et al.</i> , 2012



			0,19 0,81 0,34 0,23 1,1 4,8 1,7 0,28 0,29			
Amorfaquinona Pendulona	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	0,63 µg/mL 0,43 µg/mL	-	<i>Abrus schimperi</i> (Fabaceae)	Rahman <i>et al.</i> , 2011
Piperina Fenilamida	Promastigotas Amastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	14,2 / 28 µM 28,9 / 24,5 µM	-	<i>Piper nigrum</i> (Piperaceae) Síntese	Ferreira <i>et al.</i> , 2011
Anlodipino Bepidil Lercanidipino Nicardipino Nimodipino	Promastigotas Amastigotas	<i>L. (L.) chagasi</i>	0,85/ 2,93 µg/mL 1,73/ - µg/mL 7,8/ - µg/mL 10,59/ - µg/mL 30,3/ 26,53 µg/mL	-	Comercial	Reimão & Tempone, 2011
5 (N-benzil 1-(4-metóxi)fenil-9H-beta-carbolina-3- carboxamida)	Promastigotas Amastigotas axênicas Amastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	2,6 µM 1,0 µM 1,0 µM	-	Síntese	Pedroso <i>et al.</i> , 2011
Citreoserina Emodina Janthinona	Promastigotas	<i>L. (V.) braziliensis</i>	- 320 µg/mL -		<i>Penicillium herquei</i> (Trichomaceae)	Marinho <i>et al.</i> , 2011
Plumericina Isoplumericina	Promastigotas Amastigotas	<i>L. donovani</i>	3,17/ 1,41 µM 7,2/ 4,1 µM	-	<i>Plumeria bicolor</i> (Apocynaceae)	Sharma <i>et al.</i> , 2011
Ácido 4-(bromometil)benzóico Ácido 4-(bromometil)-3-nitrobenzóico 4-(bromometil)-3-nitrobenzoato Ácido 4-hidróximetil-3-nitrobenzóico 4-(bromometil)-3-nitro-N-(2-hidróxietil)benzamida 4-(clorometil)-3-nitro-N-(2-hidróxietil)benzamida 4-(clorometil)-3-nitro-N-(2-cloroetil)benzamida 4-(clorometil)-N-(2-hidróxietil)benzamida	Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	> 100 µM > 100 µM 39,3 µM > 100 µM 23,1 µM 59,5 µM 50,6 µM > 100 µM	-	Comercial/Síntese	Lopes <i>et al.</i> , 2011
Mono- <i>t</i> -butilóxicarbonil-diaminas 1 2 3 4 5 6 7 8	Amastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	> 50 µg/mL 34,65 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL 29,16 µg/mL 19,59 µg/mL	-	Síntese	Pinheiro <i>et al.</i> , 2011



9 10 11 12 13 14 15 16 17 18			26,34 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL > 50 µg/mL 10,38 µg/mL 3,78 µg/mL			
(4R,9S,14S)-4α-acetóxi-9β,14α-dihidróxi-dolast-1(15),7-dieno	Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	2,0 µg/mL	-	<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Dictyotaceae)	Dos Santos <i>et al.</i> , 2011
2-n-propil-quinolina	<i>In vivo</i>	<i>L. donovani</i>	-	60 µM/kg	<i>Galipea longiflora</i> (Rutaceae)	Vieira <i>et al.</i> , 2011
Pandarosídeo G Pandarosídeo G metil éster Pandarosídeo K Pandarosídeo L Pandarosídeo M Pandarosídeo K metil éster Pandarosídeo L metil éster Pandarosídeo M metil éster	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	1,3 µM 0,051 µM 63,1 µM 101,6 µM 100,4 µM 63,1 µM 57,2 µM 26,1 µM	-	<i>Pandaros acanthifolium</i> (Microcionidae)	Regalado <i>et al.</i> , 2011
Omubiosídeo Catimborina Seselina Suberosina Desmetilsuberosina Rutarina Haploperosídeo 5-hidróxi-noracronicina 1,5-hidróxi-2,3-metóxi-10-metil-9-acridona Trigonelina 7-α-obacunil acetato	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	> 125 µg/mL > 125 µg/mL > 125 µg/mL > 125 µg/mL > 125 µg/mL 120 µg/mL > 125 µg/mL 11,2 µg/mL 20,4 µg/mL > 125 µg/mL 45 µg/mL	-	<i>Citropsis articulata</i> (Rutaceae)	Lacroix <i>et al.</i> , 2011
TMC2O TMC2O Twin	Promastigotas Amastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	14/ 9,5 µM 58,1/ 9,9 µM 10,5/ 2,9 µM	-	Síntese	Monzote <i>et al.</i> , 2011
Ácido 6β-O-2',3'-dihidro-cinamoil-12-hidróxi-(13)15-en-16,12-olídeo-18-cassaneóico Ácido 6β-O-cinamoil-12-hidróxi-(13)15-en-16,12-olídeo-18-cassaneóico Ácido 6β-O-6',7' dihidróxi-cinamoil-18-vouacapaneóico 6β-O-cinamoil-18-vouacapaneol Ácido 6β-hidróxi-18-vouacapaneóico Ácido lambertiânico	Amastigotas axênicas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	56 µg/mL 69 µg/mL 26 µg/mL 43 µg/mL 27 µg/mL 62 µg/mL	-	<i>Caesalpinia echinata</i> (Leguminosae)	Cota <i>et al.</i> , 2011

Euglobal Ia <sub>1</sub> Euglobal Ia <sub>2</sub> Euglobal BI-1 Euglobal Ib Euglobal Ic Euglobal IIa Loxofleveno Grandinal Sideroxilonal A Sideroxilonal B Sideroxilonal C Loxoflebal A	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	228,28 µM 204,18 µM 188,13 µM 210 µM 219,43 µM 235,39 µM - 244 µM 1,8 µM 1,0 µM 1,1 µM -	-	<i>Eucalyptus loxophleba</i> (Myrtaceae)	Sidana <i>et al.</i> , 2011
5-fenil-imino-benzo(a)fenoxazinas 3a 3b 3c 3d 3e 3f 3g 3h 3i	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	20,1 µM 10,7 µM 5,2 µM 2,9 µM 23,3 µM 28,6 µM > 205 µM 70,5 µM 90,6 µM	-	Síntese	Shi <i>et al.</i> , 2011
Tetromicina 1 Tetromicina 2 Tetromicina 3 Tetromicina 4 Tetromicina B	Promastigotas	<i>L. major</i>	> 100 µM > 100 µM 36,80 µM > 100 µM > 100 µM	-	<i>Streptomyces axinellae</i> (Streptomytaceae)	Pimentel-Elardo <i>et a.</i> , 2011
<i>N</i> -2-(3',4',5'-trimetóxiifenil)etil-2-hidróxi- benzamida 2'-hidróxi-3',4',6'-trimetóxi-chalcona Cardamonina Pinocebrina	Amastigotas axênicas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	> 40 µM 0,8 µM 8,0 µM > 40 µM	-	<i>Piper hispidum</i> (Piperaceae)	Ruiz <i>et al.</i> , 2011
Sceptrumlabdalactona A Sceptrumlabdalactona B	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	25,0 µM 5,7 µM	-	<i>Aframomum sceptrum</i> (Zingiberaceae)	Cheikh-Ali <i>et al.</i> , 2011
8,13-diacetil-piptocarpol 8-acetil-13-O-etil-piptocarpol Ácido ursólico	Amastigotas axênicas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0,2 µM 0,37 µM 0,99 µM	-	<i>Pseudelephantopus spicatus</i> (Asteraceae)	Odonne <i>et al.</i> , 2011b
Angelato de encecalol	Amastigotas axênicas	<i>L. donovani</i>	14,6 µg/mL	-	<i>Ageratum conyzoides</i> (Asteraceae) / Síntese	Harel <i>et al.</i> , 2011
Ácido ursólico Ácido oleanólico 1a 1b 1c 1d1e	Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	360,3 µM 439,5 µM 406 µM 340,4 µM 240,4 µM 174,9 µM 458,7 µM	-	<i>Miconia langsdorffii</i> (Melastomataceae) / Semi-síntese	Peixoto <i>et al.</i> , 2011

Dihidrocloreto de 4,4'-bis(imidazol-inil-amino)difenilamina 1-Alcóxi-2-aryl-amino-imidazolinas 6 7 10a 10b 12 13 14 15 16 17	Amastigotas axênicas	<i>L. donovani</i>	- 36 µM 69 µM 68 µM 14 µM 39 µM 62 µM 104 µM 41 µM 58 µM 120 µM	-	Síntese	Nieto <i>et al.</i> , 2011
Yangambina	Promastigotas	<i>L. (L.) chagasi</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	50 µg/mL 65 µg/mL	-	<i>Ocotea duckei</i> (Lauraceae)	Neto <i>et al.</i> , 2011
Aucubina Melampirosídeo Mussaenosídeo Ácido mussaenosídico 8-epi-loganina Apigenina Luteolina Luteolina 7-O-β-glicopiranosídeo Deshidro-diconiferil-álcool 9-O-β-glicopiranosídeo Ácido benzóico β-sitosterol	Amastigotas axênicas	<i>L. donovani</i>	> 90 µg/mL 52,7 µg/mL > 90 µg/mL 88,1 µg/mL 41,1 µg/mL 7,5 µg/mL 3,0 µg/mL 7,0 µg/mL 7,0 µg/mL 68,80 µg/mL 71,5 µg/mL 27,8 µg/mL	-	<i>Melampyrum arvense</i> (Scrophulariaceae)	Kirmizibekmez <i>et al.</i> , 2011
Ivermectina 1 Δ <sup>2,3</sup> -ivermectina 2 Ivermectina monossacarídeo 5 Ivermectina aglicona 6 Ivermectina etil secoester 7 Δ <sup>2,3</sup> -ivermectina etil secoester 8 Ivermectina 10 Ivermectina 11	Promastigotas Amastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i>	7,0 / 5,0 µM 13,8 / 3,6 µM 7,7 / 29,7 µM 8,3 / 32,0 µM 10,7 / 6,5 µM 2,8 / 4,6 µM 17,1 / 13,2 µM 65,7 / 41,5 µM	-	Síntese	Noel <i>et al.</i> , 2011
Colina monocatiônica T1 Sal de amônio quaternário G25 Sal de tiazólio T3 Sal de tiazólio T4 Sal de 2-amino piridínio MS1 Alquilamidina MS3 Alquilamidina MS38	Promastigotas Amastigotas	<i>L. mexicana</i>	0,28 / 1,7 µM 2,1 / 4,8 µM 33 / 38 µM 6,9 / 13 µM 0,42 / 3,0 µM - / 3,4 µM 0,95 / 2,9 µM	-	Síntese	Ibrahim <i>et al.</i> , 2011

Imidoselenocarbamato 2 Imidoselenocarbamato 4 Imidoselenocarbamato7 Imidoselenocarbamato 13 Imidoselenocarbamato 14 Imidoselenocarbamato 15	Promastigotas Amastigotas	<i>L. infantum</i>	31,6 / 4,68 $\mu\text{M}$ 3,74 / 3,03 $\mu\text{M}$ 18,2 / 14,9 $\mu\text{M}$ 28,5 / 13,4 $\mu\text{M}$ 29,0 / 17,6 $\mu\text{M}$ 30,9 / 16,6 $\mu\text{M}$	-	Síntese	Moreno <i>et al.</i> , 2011
Agelasinas 2a 2b 2c 2d 2e 2f 2g 3a	Promastigotas	<i>L. donovani</i>	< 0.04 $\mu\text{M}$ 0.25 $\mu\text{M}$ 0.97 $\mu\text{M}$ 15 $\mu\text{M}$ - $\mu\text{M}$ - - > 29 $\mu\text{M}$	-	Síntese	Roggen <i>et al.</i> , 2011

### 1.3. *CLUSIA PERNAMBUCENSIS* G. MARIZ

O gênero *Clusia* possui mais de 250 espécies, reunidas na família Clusiaceae, a qual anteriormente era denominada Guttiferae (gota, do latim: *guttos*), em alusão ao látex obtido das plantas dessa família, em geral de cor amarela e pegajoso. As plantas desse gênero ocorrem em regiões tropicais e subtropicais na América Central e América do Sul (Moura *et al.*, 2008). A literatura descreve a presença principalmente de triterpenos, flavonóides (Compagnone *et al.*, 2008; Chedier *et al.*, 1999) e benzofenonas (Teixeira & Cruz, 2005) em espécies de *Clusia*.



**Figura 4.** *Clusia pernambucensis* G. Mariz (Clusiaceae). Caule e flor (acima), folha e fruto (abaixo).

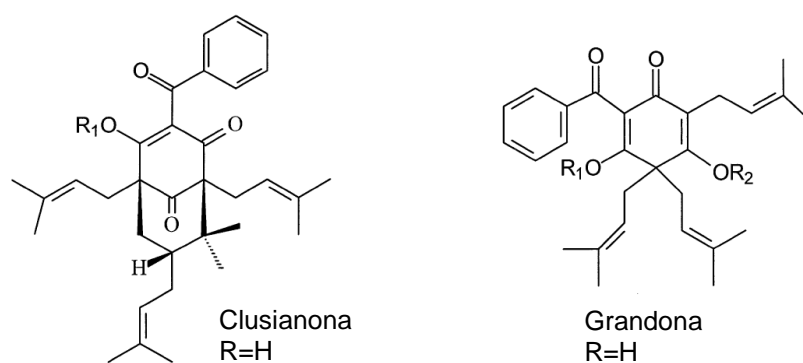
A espécie *Clusia pernambucensis* G. Mariz (Mariz, 1972) (Figura 4, p. 36) ocorre em mata ciliar, que é um dos ecossistemas do bioma Cerrado. Consiste em um arbusto ramoso (com diversos ramos) de até 3 metros de altura. Arbusto compreende um tipo de hábito de crescimento que não forma tronco, madeira e copa definida, diferentemente da árvore (De Paula & Costa, 2011). As folhas dessa planta são coreácea-cartilaginosas, glabras e os frutos ocorrem em cápsula. As flores têm de cinco a seis pétalas brancas, estames numerosos, possuem sexos separados e ovário súpero. São polistêmones, ou seja, apresentam mais estames do que pétalas. Há vários estaminóides na flor, que são estames não desenvolvidos (Prof. Dr. José Elias de Paula, comunicação pessoal).

A análise química de 11 tipos de resinas florais do gênero *Clusia*, que aliás é o único estudo da literatura que inclui a espécie *Clusia pernambucensis* (Figura 4, p. 36), demonstrou a presença principalmente de benzofenonas em sua constituição. O estudo das resinas estaminais revelou a presença majoritária de ácidos graxos livres (Porto *et al.*, 2000). Esse trabalho também mostrou, através do teste de bioautografia, que benzofenonas presentes nas resinas florais de *C. grandiflora* e *C. spiritu-sanctensis* foram ativas em cepas de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. As benzofenonas de *C. grandiflora* ainda apresentaram atividade em *Candida albicans*. Benzofenonas são também descritas por suas atividades anti-inflamatória, anti-fúngica, antibacteriana (Moura *et al.*, 2008) e anti-HIV (Huerta-Reyes *et al.*, 2004).

Das folhas e galhos de *Clusia columnaris* foi isolado um triterpeno do tipo eufano, juntamente com as benzofenonas poliisopreniladas machuona e clusiacromeno A, e nove flavonóides característicos de Clusiaceae

(Compagnone *et al.*, 2008).

Benzofenonas são compostos orgânicos com um núcleo básico de 13 carbonos distribuídos em dois anéis ligados por uma carbonila (Figura 5, p. 38). O anel A é derivado do ácido chiquímico, enquanto o anel B é formado pela via do acetato. Essa unidade básica pode sofrer condensação de cadeias de resíduos de isoprenila, geranila e ciclizações secundárias dessas ramificações (Piccinelli *et al.*, 2009; Baggett *et al.*, 2005).



**Figura 5. Benzofenonas isoladas de resinas florais de *Clusia* (Porto *et al.*, 2000).**

Já foram isolados mais de 150 compostos dessa classe, sendo que mais da metade são procedentes de três gêneros da família Clusiaceae: *Clusia*, *Garcinia* e *Hypericum* (Baggett *et al.*, 2005). Diversos tipos de atividade biológica já foram relatados para essas moléculas, como antibacteriana antifúngica, antiretroviral (Porto *et al.*, 2000; Teixeira e Cruz, 2005), antioxidante, antitumoral, (Díaz-Carballo *et al.*, 2008, 2010; Chaturvedula *et al.*, 2002;).

A atividade de espécies de *Clusia* em *Leishmania* ssp. é pouco descrita. Peraza-Sanchez *et al.* (2007) avaliaram o potencial leishmanicida do extrato metanólico das folhas de *C. flava*, órgão usado popularmente para tratamento de feridas, sífilis e dor de cabeça, que apresentou  $CI_{50}$  de 32  $\mu\text{g/mL}$  em promastigotas de *L. major*.

No Peru, a partir do uso tradicional de plantas utilizadas no tratamento de leishmaniose cutânea e muco-cutânea, a atividade de extratos de *C. amazonica* e outras trinta e sete espécies foi investigada em amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Os extratos de folhas e galhos de *C. amazonica*, preparados por decocção, demonstraram  $CI_{50}$  igual a 32,9 e 34,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Odonne *et al.*, 2009).

Como pôde ser observado, já foram descritos estudos que relatam o possível potencial farmacológico de algumas espécies de *Clusia*, o que pode representar futuramente a possibilidade da sua utilização para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas promissores, eficientes no tratamento da doença e com efeitos tóxicos reduzidos.



## 2. JUSTIFICATIVA

A necessidade de novos fármacos para tratamento da leishmaniose cutânea está amplamente evidenciada por publicações científicas e organizações de saúde pública de alcance mundial. Os efeitos destrutivos da doença na pele e mucosas dos indivíduos levam ao comprometimento físico e psicológico. A falta de acesso ao medicamento devido ao custo elevado é uma das barreiras limitantes do tratamento. Além dos esquemas terapêuticos com problemas de eficácia, efeitos tóxicos e longos períodos de administração.

A abordagem visando uma formulação tópica para o tratamento da leishmaniose cutânea evita a exposição sistêmica, protege a lesão de infecções e facilita a concentração eficiente do fármaco no local da ferida (Croft & Olliaro, 2011). E o foco crescente na busca por soluções terapêuticas a partir de recursos naturais é de extrema relevância.

Diante desses desafios, nosso objeto de estudo foi a biodiversidade vegetal oferecida pelo Cerrado, segundo maior bioma do Brasil, com uma área de 2 milhões de Km<sup>2</sup> e 44% da flora endêmica (Klink & Machado, 2005). Buscou-se investigar extratos de plantas do Cerrado para empreender ações químicas e biológicas direcionadas para *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, uma das espécies do parasito que causa a leishmaniose cutânea.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade de extratos e substâncias isoladas de três espécies de plantas do bioma Cerrado em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer os valores de  $CI_{50}$  em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* dos extratos de *Austroplenckia populnea*, *Clusia pernambucensis* e *Maprounea guianensis*
- Determinar a citotoxicidade dos extratos em células de mamíferos
- Realizar o fracionamento químico do extrato ativo
- Elucidar as estruturas moleculares isoladas
- Definir a atividade das substâncias isoladas em amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*
- Determinar a citotoxicidade das substâncias isoladas em macrófagos murinos

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

A atividade de acesso ao patrimônio genético foi autorizada sob o N° 06/2012 de acordo com a Resolução CGEN N° 35, após análise vinculada às informações e termos do processo 02000.002272/2006-73. A coleta e a identificação do material vegetal das espécies *Austroplenckia populnea* (Reissek) Lundell (Celastraceae), *Clusia pernambucensis* G. Mariz (Clusiaceae) e *Maprounea guianensis* Aublet (Euphorbiaceae) foram realizadas em parceria com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula/UnB. Exsicatas são mantidas no Herbário da Universidade de Brasília (UnB). A seleção das espécies foi feita com base na triagem de atividade biológica previamente realizada.

Os órgãos vegetais foram separados em casca e madeira do caule e da raiz, fruto, sementes e folhas; e submetidos à dessecação e estabilização de forma espontânea ou em estufa de ventilação forçada; e em seguida pulverizados em moinho de facas. O pó do material vegetal foi submetido a extrações por maceração com os solventes hexano e acetato de etila, visando extrair compostos com polaridade distinta. A escolha desses solventes foi baseada na expectativa de obter compostos com lipofilicidade suficiente para atravessar a membrana de células nos ensaios propostos adiante.

As soluções extrativas foram recuperadas por filtração com papel de filtro e concentradas em aparelho rotaevaporador, resultando nos diferentes extratos brutos, que foram armazenados em refrigerador a -20 °C para

posterior utilização nesse estudo. Alíquotas desses extratos foram ressuspendidas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 mg/mL para a avaliação biológica, em concentração final no teste inferior a 1%.

## 4.2. FRACIONAMENTO POR MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA

### 4.2.1. Cromatografia em coluna

O fracionamento por cromatografia em coluna foi realizado utilizando sílica-gel (0,04-0,063 mm ou 230-400 mesh). As dimensões da coluna de vidro foram determinadas de acordo com a quantidade de material e de sílica-gel utilizados.

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi feita em cromatoplasmas de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> em alumínio (Merck®). Os solventes utilizados como eluentes para cromatografia em coluna e CCD foram hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila (anteriormente destilados) e metanol, em misturas com gradiente crescente de polaridade. A revelação das placas de cromatografia em camada delgada foi feita em luz UV-254 nm e com o revelador químico vanilina sulfúrica (solução etanólica de ácido sulfúrico 5% e solução etanólica de vanilina 1%).

Para cromatografia em coluna “flash” foi utilizada sílica-gel com granulometria de 0,04-0,063 mm ou 230-400 mesh, empacotada em fluxo contínuo. A separação foi feita com pressão contínua através de bomba de ar.

### 4.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em

equipamento Waters<sup>®</sup>, modelo 1525, acoplado a um detector UV arranjo de fotodiodo (190-800 nm), série 2996, com forno termostático regulável. Para CLAE semi-preparativa foi utilizada uma coluna Phenomenex Prep sílica (10x250 mm, 10 µm). A fase móvel constituiu-se de uma mistura binária isocrática de hexano:acetato de etila (95:5), com injeção de 1 mL (20 mg/mL) e fluxo de 3 mL/min, pré-filtrados em membranas de nylon de 0,45 µm e desgaseificados a vácuo em sonificador por 15 minutos. A detecção foi realizada a 275 nm.

Foi também utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo SL6Vp acoplado a um detector UV arranjo de fotodiodo (190-800 nm), com desgaseificador. A fase móvel foi constituída de uma mistura ternária isocrática de H<sub>2</sub>O:MeOH:MeCN (8:32:60). Para CLAE analítica foi utilizada uma coluna Shimadzu octadecilsilano (4,6x250 mm, 5 µm) operando em modo reverso, com injeção de 20 µL (2 mg/mL) e fluxo de 1 mL/min. Para CLAE preparativa foi usada a coluna Shimadzu Prep octadecilsilano-C<sub>18</sub> (20x250 mm, 10 µm), com injeção de 1 mL (20 mg/mL) e fluxo de 9 mL/min. A detecção foi monitorada a 190 nm, 209 nm e 254 nm.

#### **4.2.3. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis***

A partir da maceração em acetato de etila de 197,11 g de cascas do caule de *C. pernambucensis* foram obtidos 22 g de extrato bruto. Para o fracionamento cromatográfico, esse material foi retirado de refrigeração, foram ressuspensas 17,3 g em acetato de etila e foi separada uma porção insolúvel (3,15 g).

A parte solúvel (14,15 g) foi incorporada em gel de sílica para depósito a seco em cromatografia em coluna contendo 150 g de sílica-gel, previamente empacotada com ciclohexano. O gradiente utilizado na fase móvel foi ciclohexano-AcOEt-MeOH. Foram coletadas trezentas e doze frações de 100 mL. O fluxo de eluição foi determinado pelo uso contínuo de uma bomba de pressão a cada troca de sistema eluente.

### 4.3. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

#### 4.3.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  unidimensionais e bidimensionais foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance DRX500 equipado com uma sonda de detecção inversa. Foram aplicadas as frequências 500,13 e 125,77 MHz para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente.

Os solventes usados para dissolver os compostos foram: clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ou piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ). Os deslocamentos químicos estão expressos em partes por milhão (ppm) relativa ao tetrametilsilano (TMS), com constantes de acoplamento (J) apresentada em hertz (Hz). As bandas de absorção de hidrogênio múltiplas nos espectros  $^1\text{H}$  seguem as indicações: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto) e m (multiplete).

#### 4.3.2. Espectrometria de massas

Os dados de espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-MS) foram

obtidos em espectrômetro Bruker Ultrotof e Microtof. Foi realizada ionização por *eletrospray* utilizando analisador por tempo de voo (ESI-TOF-MS). A análise foi feita em modos positivo e negativo.

#### 4.3.3. Espectroscopia de Infra-vermelho

Para análise de infravermelho o material foi incorporado em pastilha de KBr a 10000 kgf e utilizado espectrofotômetro de infravermelho (Perkin-Elmer RX-1).

#### 4.4. ANÁLISE FÍSICA

##### 4.4.1. Determinação de rotação óptica

Os dados de rotação óptica foram coletados para o composto **CP1** em solução de MeOH ( $c=0,1$ ), utilizando-se polarímetro modelo DIP-370.

#### 4.5. ANIMAIS

Nos testes *in vitro* com macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos Balb/C e para manutenção da cultura de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* foram utilizados camundongos C57Bl/6. Todos os animais foram mantidos no Biotério FS/FM em gaiolas de polipropileno com água e ração Purina<sup>®</sup> (Labina) *ad libitum*, temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) umidade de 40 –50 % ( $\pm 10$ ) e ciclo de claro/escuro de 12 h. O local teve o mínimo de ruídos. Os animais apresentaram entre 25 e 30 g para testes e tempo de vida entre um e três 3 meses.

#### 4.5.1 Aspectos éticos

O número de animais utilizados foi o menor possível, resguardada a quantidade necessária para garantir redução de erros experimentais. Todos os procedimentos seguem os princípios éticos de experimentação animal da Resolução Nº 592/92. O projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Brasília.

#### 4.6. CULTURA DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*

A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa MHOM/BR/PH8) foi mantida em patas de camundongos C57Bl/6, no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde/Medicina (Universidade de Brasília). A obtenção dos parasitos foi feita a partir da aspiração do sangue após inoculação de solução salina 0,9% na pata traseira infectada desses animais. Os parasitos obtidos foram cultivados em meio de cultura McNeal, Novy e Nicolle (meio NNN), pH 7,2 a 22 °C por sete dias e, posteriormente, no meio Schneider (Sigma-Aldrich®) suplementado com 20% de soro fetal bovino e gentamicina 0,25% (pH 7,2 a 22 °C).

#### 4.7. ENSAIO DOS EXTRATOS BRUTOS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. (L.) AMAZONENSIS*

Em uma placa de cultura celular de 96 poços foi colocado, em cada poço, meio de cultura Schneider estéril (Sigma-Aldrich®). Foi realizada diluição seriada com os extratos ressuspensos em DMSO (10 mg/mL), atingindo



concentrações de 100 a 1,56 µg/mL no teste e a concentração final de DMSO no poço não excedeu 0,1%. Em seguida, foram adicionadas  $10^5$  formas promastigotas por poço, contadas em câmara de Neubauer. A placa foi incubada por 48 h a 22-26 °C. Então adicionou-se 100 µg/poço de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) em PBS a 5 mg/mL (Sigma-Aldrich®), por 4 h à 37 °C. A leitura foi feita após adição de 100 µL de DMSO para liberação dos cristais de formazana. Nesse experimento foram usados promastigotas na fase log para otimizar a leitura, realizada em espectrofotômetro a 570 nm (Dutta *et al.*, 2005).

Foi utilizado como controle positivo anfotericina B em concentrações de 10,0 a 0,125 µg/mL e o controle negativo contendo DMSO a 0,1%. Os experimentos foram realizados em triplicata, permitindo a determinação da concentração capaz de inibir em 50% o crescimento do parasito ( $CI_{50}$ ) pelo programa Microsoft Excel®.

#### 4.8. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS EM CÉLULAS NIH-3T3

A cultura de células NIH-3T3, linhagem embrionária de fibroblastos de camundongos Swiss mantida continuamente em cultura, foi adicionada a placa de 96 poços, na concentração de  $8 \times 10^3$  células em meio DMEM (Gibco®), contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram incubadas por 12 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi removido e então adicionado cada extrato diluído em meio de cultura de 5 a 200 µg/mL, permanecendo incubado nas mesmas condições descritas da estufa. Após 24 h, a viabilidade celular foi verificada pela adição de 100 µg/poço de solução de MTT em PBS (5 mg/mL)

por 4 h. O meio de cultura foi retirado e 100 µL de DMSO foram adicionados para liberação dos cristais de formazana. A quantificação de formazana foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

#### 4.9. ENSAIO DOS COMPOSTOS EM FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *L. (L.) AMAZONENSIS*

Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C foram coletados e centrifugados em meio de cultura RPMI 1640 puro (Gibco®) a 1190 rpm ou 300G. Os pellets foram recuperados e ressuspensos para contagem das células viáveis com azul de tripan (Sigma®) em câmara de Neubauer. Em uma placa de 24 poços com lamínulas de 13 mm foram colocados  $4 \times 10^5$  macrófagos/poço por 24 h a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. As células não-aderentes foram removidas após o período de incubação e os macrófagos foram incubados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária numa razão de 10:1 por 4 h a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, o sobrenadante com promastigotas livres foi retirado e os macrófagos infectados foram tratados com os compostos isolados e semi-sintéticos em concentrações entre 100 e 2,5 µg/mL por um período de 48 h. No final do experimento, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Os controles positivos foram feitos com miltefosina, anfotericina B, antimoniato de meglumina em concentrações de 10,0 a 0,125 µg/mL e o controle negativo contendo DMSO a 0,1%. Para cada concentração testada foram contados 200 macrófagos em microscópio óptico (Olympus). A atividade leishmanicida foi calculada pela razão de células infectadas entre células tratadas com os compostos e as não tratadas (controle negativo). Os

testes foram realizados em triplicata.

#### 4.10. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS MURINOS

Macrófagos foram coletados do peritônio de camundongos Balb/C com meio de cultura RPMI 1640 puro (Gibco®). Após centrifugação a 1190 rpm ou 300G, o sobrenadante foi desprezado e o material sedimentado foi ressuspensionado para contagem das células viáveis com azul de tripan (Sigma®) em câmara de Neubauer. Foram distribuídas  $10^6$  células por poço em microplaca de 96 poços, contendo 200  $\mu$ L de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB).

As placas foram incubadas por 12 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio de cultura foi renovado e então adicionou-se cada composto a ser avaliado nas concentrações de 5 a 200  $\mu$ g/mL. Para a leitura da viabilidade celular, após 24 h foram acrescentados 100  $\mu$ g/poço de MTT em PBS (5 mg/mL) por 4 h, seguido da retirada do meio de cultura e da adição de 100  $\mu$ L de DMSO. A viabilidade foi verificada pela quantificação de formazan em espectrofotômetro a 570 nm.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos nesse estudo foram submetidos a testes de triagem em relação a sua atividade em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Um extrato bruto preparado a partir da planta inteira ou de suas partes contém centenas de moléculas distintas, pertencentes a diversas vias biossintéticas, e conseqüentemente, constitui uma biblioteca natural de substâncias potencialmente ativas (Schmidt *et al.*, 2012a). Portanto, a investigação da atividade de extratos deve ser interpretada como a avaliação de uma coleção inteira de compostos de uma só vez (Schmidt *et al.*, 2012a).

Dentre os testes realizados em estudo prévio do Laboratório de Farmacognosia, cinco extratos de plantas do Cerrado apresentaram atividade acima de 90% em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* a 100 µg/mL. A partir deste resultado foi então testada a capacidade de cada um desses extratos em inibir 50% da atividade dos parasitos, determinando assim os respectivos valores de  $CI_{50}$ .

O extrato hexânico da casca do caule de *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) apresentou  $CI_{50} = 85,13$  µg/mL, e o da folha  $CI_{50} = 45,19$  µg/mL. Os extratos hexânico e acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis* (Clusiaceae) apresentaram  $CI_{50} = 65,0$  µg/mL. A literatura relata que outra espécie do gênero, *Clusia amazonica*, demonstra atividade em amastigotas axênicas de *L. amazonensis* (Odonne *et al.*, 2009) para extratos etanólicos de galhos e folhas, com  $CI_{50}$  de 32,9 e 34,6 µg/mL, respectivamente.

O potencial leishmanicida do extrato hexânico da casca do caule de

*Maprounea guianensis* (Euphorbiaceae) foi verificado, com  $CI_{50} = 29,58 \mu\text{g/mL}$ . O uso tradicional de *M. guianensis* para tratar topicamente a leishmaniose é relatado em comunidades indígenas Oyapock (Odonne *et al.*, 2011a) na Guiana Francesa, a partir da aplicação de cataplasma das folhas no local da lesão.

Buscando informações que fossem ao encontro dos resultados que observamos e com os relatos de uso etnofarmacológico, foi verificado que alquilferulatos, isolados juntamente com triterpenos do caule de *M. guianensis* (David *et al.*, 2004), apresentaram potencial inibitório em proteases (Santos *et al.*, 2012). Os autores destacam que essas enzimas são importantes para a interação parasito-hospedeiro, facilitando a invasão do parasito na célula do hospedeiro mamífero e promovendo a degradação de proteínas do hospedeiro.

A avaliação dos extratos em fibroblastos da linhagem NIH-3T3 (Tabela 3, p. 52) permitiu comparar os valores absolutos de  $CI_{50}$  nessa linhagem, sendo que o extrato acetato de etila da casca do caule de *C. pernambucensis* apresentou menor citotoxicidade, com  $CI_{50} = 100,5 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 3. Atividade de extratos de plantas do Cerrado em *L. (L.) amazonensis* e citotoxicidade em células NIH-3T3.**

Família Espécies	Parte da planta, solvente	<i>L. (L.) amazonensis</i> $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Células NIH-3T3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Índice de Seletividade
<b>Celastraceae</b> <i>Austroplenckia populnea</i> (Reissek) Lundell	Casca do caule, H Folha, H	$85,13 \pm 1,12$ $45,19 \pm 2,32$	99,24 53,57	0,86 1,19
<b>Clusiaceae</b> <i>Clusia pernambucensis</i> G. Mariz	Casca do caule, AcOEt Casca do caule, H	$65,0 \pm 2,45$ $65,0 \pm 1,33$	100,5 16,65	1,54 0,26
<b>Euphorbiaceae</b> <i>Maprounea guianensis</i> Aubl.	Casca do caule, H	$29,58 \pm 2,99$	65,21	2,20

Teste em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Teste de citotoxicidade realizado em células NIH-3T3. Solventes utilizados: H: hexano, AcOEt: acetato de etila.

Sabendo que o ideal para triagem de compostos ativos em protozoários é relacionar a atividade à citotoxicidade (Ioset *et al.*, 2009), nossos resultados com extratos foram incluídos como parâmetros para continuidade do trabalho. Porém, somente com a purificação das substâncias foi possível avaliar melhor o efeito em células de mamíferos.

Para selecionar um extrato ativo para isolamento de constituintes químicos, foi utilizada a combinação dos seguintes critérios: atividade em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, citotoxicidade em fibroblastos NIH-3T3, e revisão bibliográfica em bases de dados científicas (SCOPUS, Web of Science).

Foi escolhida a espécie *Clusia pernambucensis* para dar continuidade aos nossos estudos, considerando-se vários aspectos. Primeiramente, trata-se de uma espécie com apenas um estudo fitoquímico, sendo apenas da resina floral (Porto *et al.*, 2000). Além disso, não há atividade descrita de extratos ou compostos dessa planta para o gênero *Leishmania*.

No gênero *Clusia*, Peraza-Sanchez *et al.* (2007) demonstraram a atividade do extrato metanólico das folhas de *C. flava* em *L. major*. Odonne *et al.* (2009) mostraram que os extratos aquosos de folhas e galhos de *C. amazonica*, espécie utilizada tradicionalmente para o tratamento de leishmaniose cutânea e mucocutânea no Peru, são ativos em *L. amazonensis*.

A atividade do extrato bruto, a citotoxicidade moderada e a perspectiva de isolar compostos ativos a partir de uma espécie cujo gênero possui relatos de uso etnofarmacológico para leishmaniose cutânea determinaram a seleção do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis* para estudo fitoquímico.

O fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia*

*pernambucensis* por cromatografia em coluna resultou em 21 grupos (G-1 a G-21), reunidos de acordo com o perfil cromatográfico em CCD (Tabela 4, p. 55).

**Tabela 4. Fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis*.**

<b>Grupo (CP)</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (g)</b>
1	1-2	0
2	2-4	0,12
3	5-11	0
4	12-19	0,629
5	20-26	0,937
6	27-34	0,0077
7	35-69	0,0529
8	70-72	0,0185
9	73-80	0,4256
10	81-83	0,0261
11	84-122	3,5481
12	123-144	0,1952
13	145-160	0,2626
14	161-195	0,4109
15	196-204	0,2062
16	205-215	0,195
17	216-250	0,8123
18	251-268	0,9898
19	269-293	2,1749
20	294-303	0,5715
21	304-312	0,7254
<b>Total</b>		<b>12,30</b>



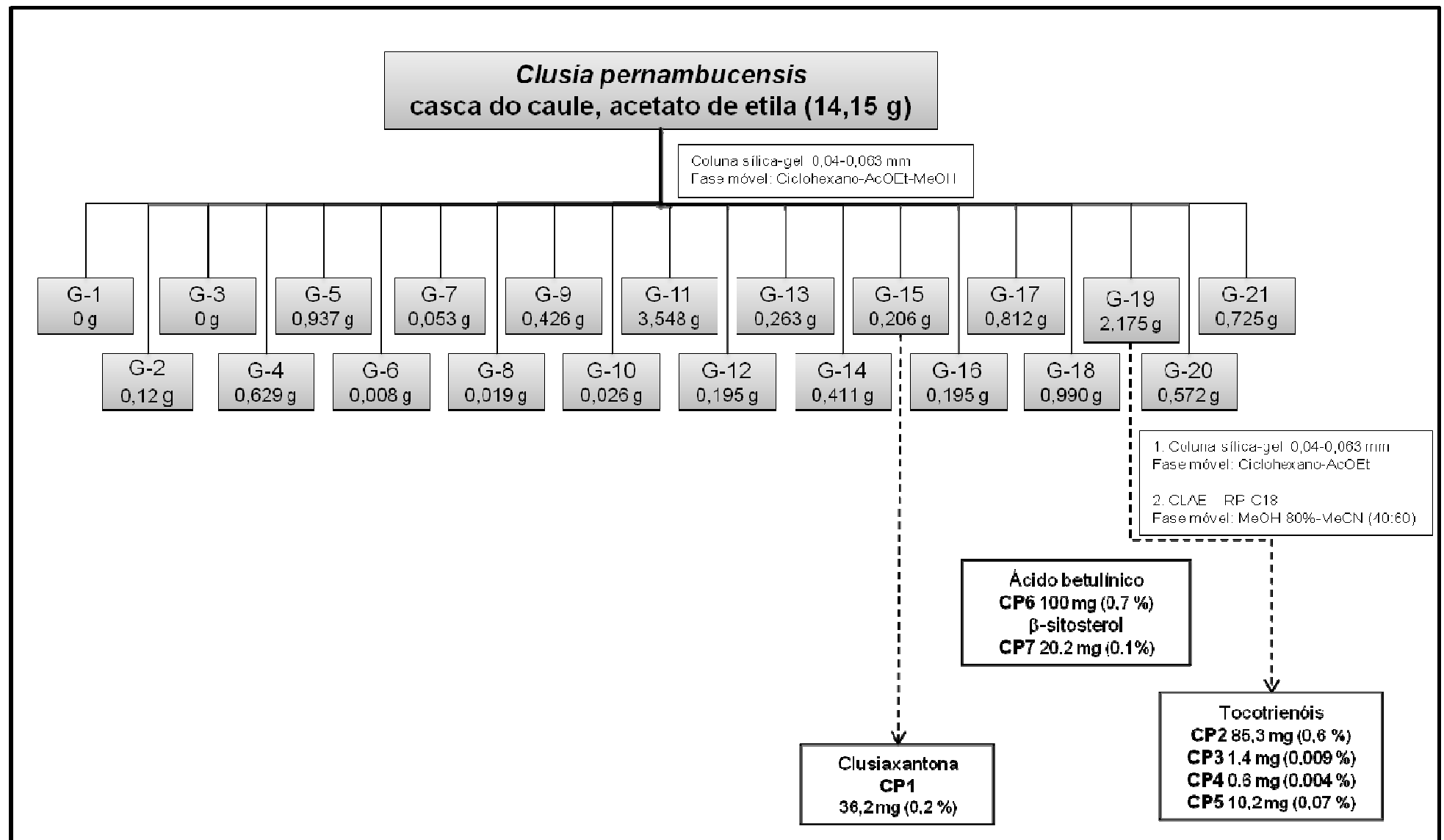


Figura 6. Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis*.

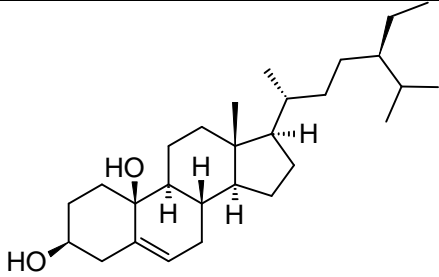
O grupo G-15 foi purificado em coluna novamente para obtenção do composto **CP1** (36,2 mg; 0,2 %). A purificação do grupo G-19 foi realizada em CLAE, operando em fase reversa com sistema isocrático da mistura ternária isocrática H<sub>2</sub>O:MeOH:MeCN (8:32:60). Ao final desse processo foram isolados quatro compostos: ácido Z- $\delta$ -tocotrienólico (**CP2**; 85,3 mg; 0,6 %),  $\delta$ -tocotrienol (**CP3**; 1,4 mg; 0,009 %),  $\delta$ -tocotrienol-metil-éster (**CP4**; 0,6 mg; 0,004 %), e álcool  $\delta$ -tocotrienólico (**CP5**; 10,2 mg; 0,07%). Também foram isolados o ácido betulínico (**CP6**; 100 mg; 0,7 %) e  $\beta$ -sitosterol (**CP7**; 20,2 mg; 0,1 %) (Figura 6, p. 56).

A partir do composto **CP1**, intitulado clusiaxantona, foi obtido o derivado metil éter (**1a**), por meio de reação de metilação com diazometano. E a partir da metilação de uma hidroxila e da carboxila terminal do ácido Z- $\delta$ -tocotrienólico (**CP2**) foi obtido o composto **2a** (Tabela 5, p. 58).

Tabela 5. Compostos isolados da casca do caule de *C. pernambucensis* e derivados semi-sintéticos.

Grupo de origem	Compostos	Sigla	Nomenclatura química oficial	Fórmula molecular	Estrutura química
G-15	Clusioxantona	CP1	6,9-dihidroxi-3,3-dimetil-5-(3-metilbut-2-enil)pirano[2,3- <i>c</i> ]xanten-7(3 <i>H</i> )-ona	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	
Modificação estrutural	-	1a	6-hidroxi-9-metóxi-3,3-dimetil-5-(3-metilbut-2-enil)pirano[2,3- <i>c</i> ]xanten-7(3 <i>H</i> )-ona	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	
G-19	Ácido Z-δ-tocotrienolico	CP2	Ácido 2,6,10-tridecatrienóico, 13-[(2 <i>R</i> )-3,4-dihidro-6-hidróxi-2,8-dimetil-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-il]-2,6,10-trimetil	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	

Modificação estrutural	-	<b>2a</b>	Ácido 2,6,10-tridecatrienóico, 13-(3,4-dihidro-6-metóxi-2,8-dimetil-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-il)-2,6,10-trimetil-, metil éster	$C_{29}H_{42}O_4$	
G19	$\delta$ -tocotrienol	<b>CP3</b>	2 <i>H</i> -1-Benzopiran-6-ol,3,4-dihidro-2,8-dimetil-2-(4,8,12,16-tetrametil-3,7,11,15-heptadecatetraen-1-il)	$C_{32}H_{48}O_2$	
G19	$\delta$ -tocotrienol-metil-éster	<b>CP4</b>	Ácido 2,6,10-tridecatrienóico,13-(3,4-dihidro-6-metóxi-2,8-dimetil-2 <i>H</i> -1-benzopiran-2-il)-2,6,10-trimetil-, metil éster	$C_{28}H_{40}O_4$ ,	
G-19	Álcool $\delta$ -tocotrienólico	<b>CP5</b>	2 <i>H</i> -1-benzopiran-6-ol, 3,4-dihidro-2-[(3 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i> )-13-hidróxi-4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrien-1-il]-2,8-dimetil	$C_{27}H_{38}O_3$	
G-18	Ácido betulínico	<b>CP6</b>	Ácido lup-20(29)-en-28-óico, 3 $\beta$ -hidróxi	$C_{30}H_{50}O_3$	

G-18	β-sitosterol	<b>CP7</b>	Estigmast-5-en-3β-ol	$C_{28}H_{48}O_2$	 <p>The chemical structure of β-sitosterol is a steroid with a four-ring nucleus. It features a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-5, and a methyl group at C-10. The side chain at C-13 consists of a propyl group with a methyl branch at the terminal carbon, and a methyl group at C-14. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
------	--------------	------------	----------------------	-------------------	---

Para avaliar a atividade dos compostos isolados em *Leishmania*, foi utilizado o modelo de amastigota intra-macrófago (Tabela 6, p. 61), que tem a vantagem de levar em conta as barreiras celulares que todo composto deve ultrapassar para alcançar o parasito alvo (Dutta *et al.*, 2011; Loiseau *et al.*, 2011).

**Tabela 6. Atividade dos compostos em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (CI<sub>50</sub> - µg/mL) e avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos (CC<sub>50</sub> - µg/mL)**

Composto	CI <sub>50</sub> (µg/mL) amastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>	CC <sub>50</sub> (µg/mL) macrófagos murinos	Índice de Seletividade
Clusiaxantona (CP1)	25,3 ± 2,3	17,22 ± 2,9	0,68
Derivado 1a	22,5 ± 1,6	32,56 ± 3,3	1,45
Ácido Z-δ-tocotrienólico (CP2)	77,3 ± 3,4	>200,0	-
Derivado 2a	> 100,0	> 200,0	-
δ-tocotrienol (CP3)	> 100,0	> 200,0	-
δ-tocotrienol-metil-éster (CP4)	> 100,0	78,04 ± 7,1	-
Álcool δ-tocotrienólico (CP5)	> 100,0	> 200,0	-
Ácido betulínico (CP6)	> 100,0	> 200,0	-
Anfotericina B	0,2 ± 0,1	-	-
Antimoniato de meglumina	9,15 ± 0,8	-	-
Miltefosina	0,45 ± 0,2	-	-

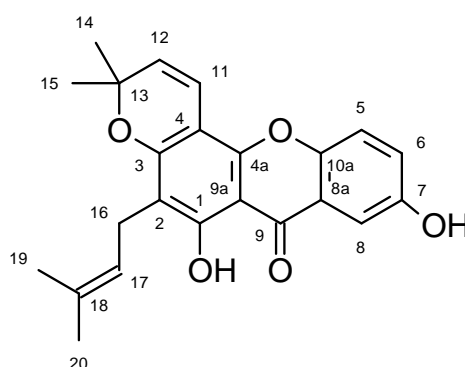
Atividade anti-*Leishmania* calculada a partir da razão entre os resultados após o tratamento e o controle negativo. Os compostos também foram testadas em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados observados em relação à atividade dos compostos isolados em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e a citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/C relatados na tabela 6 estão discutidos posteriormente, após descrição dos compostos.

### 5.1. COMPOSTO CP1

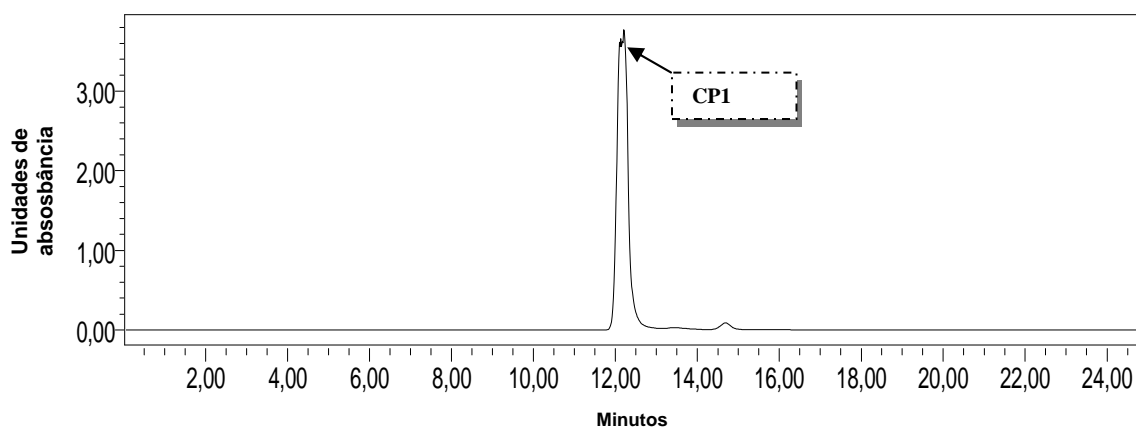
O fracionamento do grupo G-15 do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis* levou à obtenção de um sólido cristalino amarelo com  $[\alpha]_D = -57,376$  (MeOH,  $c = 0,1$ ), que foi nomeado **CP1** e submetido a análises espectrométricas.

A interpretação conjunta dos dados permitiram a proposta estrutural para o composto **CP1**, denominado clusioxantona, com nomenclatura sistemática 6,9-dihidroxi-3,3-dimetil-5-(3-metilbut-2-enil)pirano[2,3-c]xanten-7(3*H*)-ona. A fórmula molecular estabelecida foi  $C_{23}H_{22}O_5$ . Este composto ainda não havia sido descrito na literatura (Figura 7, p. 62).



**Figura 7. Estrutura do composto CP1, denominado clusioxantona.**

O grupo G-15 foi recromatografado e, após recristalização com acetato de etila, foi recuperado um precipitado amarelo amorfo. O volume de 1 mL deste material foi injetado a 20 mg/mL em aparelho CLAE (Figura 8, p. 63), cujo pico observado no cromatograma apresentou tempo de retenção igual a 12,1 minutos, em corrida com fase móvel composta por hexano/acetato de etila (95:5).



**Figura 8. Cromatograma do grupo G-15 do extrato AcOEt da casca do caule de *Clusia pernambucensis*. CLAE com coluna prep Phenomenex (10 mm x 250 mm), em fase normal. Fase móvel: hexano/acetato de etila (95:5), fluxo: 3 mL/min. Detecção por arranjo de fotodiodo (DAD) 275 nm.**



No espectro de absorção na região do infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 9, p. 64) foi observada uma banda intensa em  $3.224 \text{ cm}^{-1}$  relacionada à deformação axial de ligação O-H, e os sinais em  $2.970$  e  $2.919$  referem-se aos estiramentos simétricos e assimétricos de ligações C-H com carbonos  $\text{sp}^3$ . A banda de absorção a  $1.647 \text{ cm}^{-1}$  ocorre em decorrência de estiramentos C=O. Os sinais em  $1.606$ ,  $1.480$ ,  $1.465$  e  $1.357 \text{ cm}^{-1}$  indicam deformações axiais C=C e angulares C-H em carbonos  $\text{sp}^2$ .

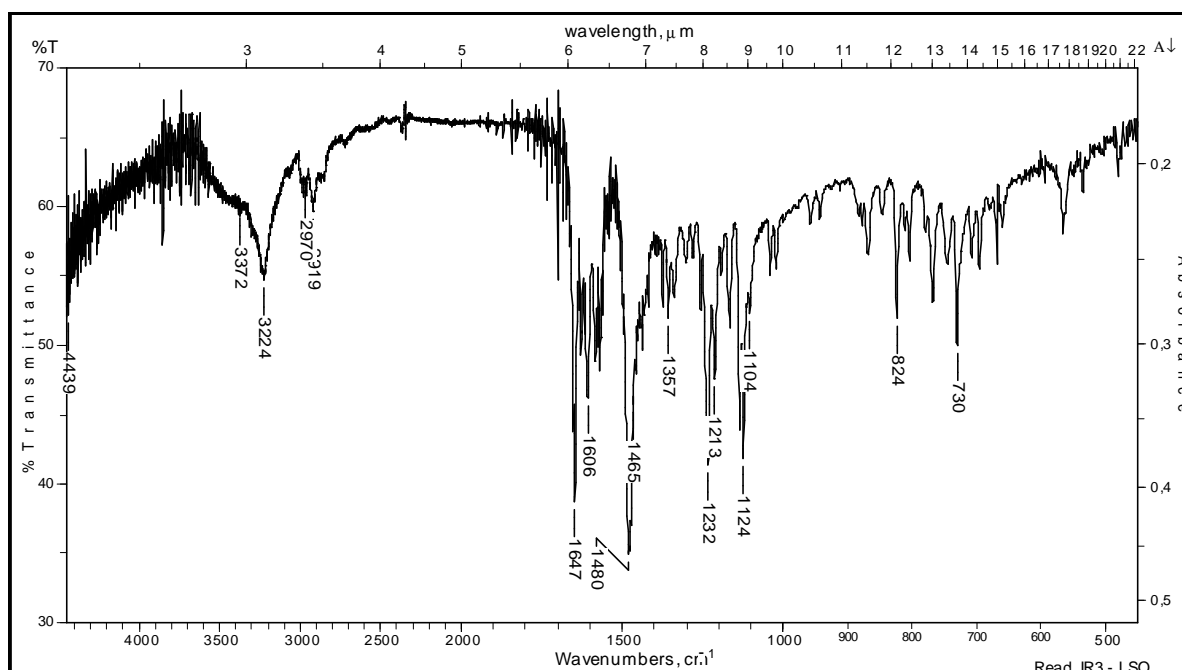


Figura 9. Espectro de absorção em infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) do composto CP1.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (Figura 10, p. 66) foram observados dois dubletos em  $\delta$  7,53 ( $\text{H}_5$ , d,  $J = 10,0$  Hz) e 8,04 ( $\text{H}_8$ , d,  $J = 3,0$  Hz) e um duplo-dublete em  $\delta$  7,58 ( $\text{H}_6$ , dd,  $J = 10,0; 3,0$  Hz). Esses valores indicam a possibilidade de pelo menos um anel aromático, com hidrogênios em posições *orto* e *para* entre si. O grupo hidroxila em  $\text{C}_1$  foi caracterizado pelo sinal em  $\delta$  13,86 (s).

Os sinais em  $\delta$  1,96 ( $\text{H}_{19}$ , sl), 1,74 ( $\text{H}_{20}$ , sl), 3,62 ( $\text{H}_{16}$ , d,  $J = 7,8$  Hz), e 5,49 ( $\text{H}_{17}$ , t,  $J = 7,8$  Hz), são característicos de fragmento prenila. Um núcleo 2,3-desidro-pirano também foi identificado pela presença dos sinais em  $\delta$  1,49 ( $\text{H}_{14}$ , s);  $\delta$  1,49 ( $\text{H}_{15}$ , s),  $\delta$  5,65 ( $\text{H}_{12}$ , d,  $J = 10,0$  Hz) e  $\delta$  6,97 ( $\text{H}_{11}$ , d,  $J = 10,0$  Hz).

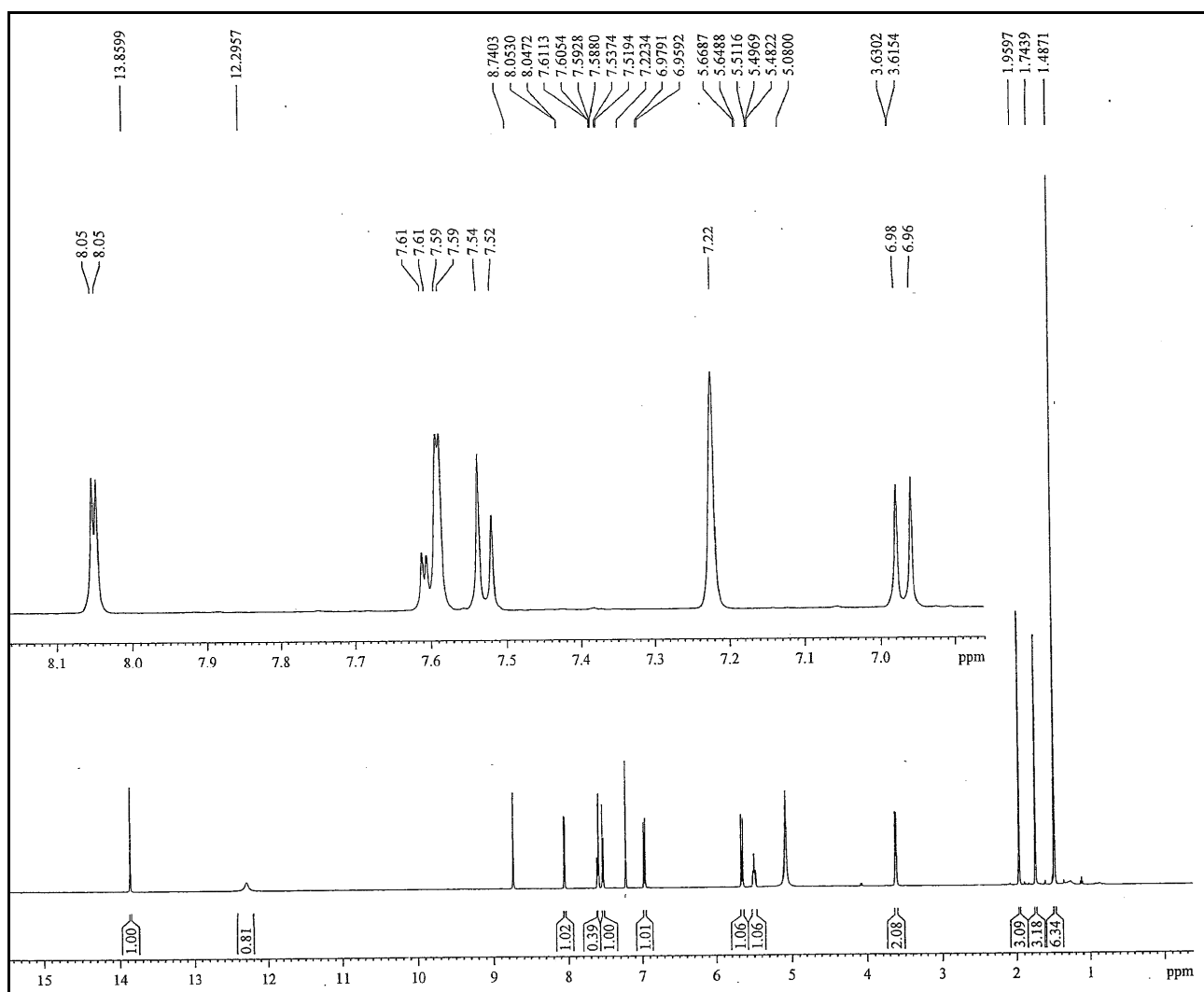


Figura 10. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto CP1 (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) do composto **CP1** (Tabela 7, p. 67) apresentou 23 linhas espectrais (Figura 11, p. 68). Esses sinais, apoiados pelos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  (Figura 12, p. 68), mostraram seis metinos ( $\delta$  109,21; 119,78; 125,68; 123,35; 116,49 e 128,21), doze carbonos não hidrogenados ( $\delta$  121,80; 150,47; 155,97; 181,87; 104,08; 155,16; 107,88; 158,67; 104,86; 156,56; 131,76 e 78,78), e duas metilas ligadas ao anel benzopirano ( $\delta$  28,55 para ambas). As duas metilas do grupo prenila foram observadas pelos deslocamentos químicos  $\delta$  18,48 ( $\text{C}_{19}$ ) e 26,24 ppm ( $\text{C}_{20}$ ).

**Tabela 7. Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  para o composto CP1**

C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
1	155,16	5	119,78	16	22,28	14	28,55
2	107,88	6	125,68			15	28,55
3	158,67	8	109,21			19	18,48
4	104,86	11	116,49			20	26,24
4a	156,56	12	128,21				
7	155,97	17	123,35				
8a	121,80						
9	181,87						
9a	104,08						
10a	150,47						
13	78,78						
18	131,76						
12 C		6 CH		1 CH <sub>2</sub>		4 CH <sub>3</sub>	

Foi possível observar a presença dos carbonos olefínicos a  $\delta = 123,35$  ( $\text{C}_{17}$ ) e 131,76 ( $\text{C}_{18}$ ). O hidrogênio olefínico a  $\delta = 5,49$  ( $\text{H}_{17}$ ) está correlacionado com os carbonos a  $\delta = 22,28$  ( $\text{C}_{16}$ ), 18,48 ( $\text{C}_{19}$ ) e 26,24 ppm ( $\text{C}_{20}$ ). O carbono aromático hidróxi-substituído a  $\delta = 155,16$  ppm também apresentou correlação com o metileno a  $\delta = 3,62$  ppm ( $\text{H}_{16}$ ). Esses dados confirmam a presença de um grupo prenila ligado no anel aromático (Tabela 7, p. 67).

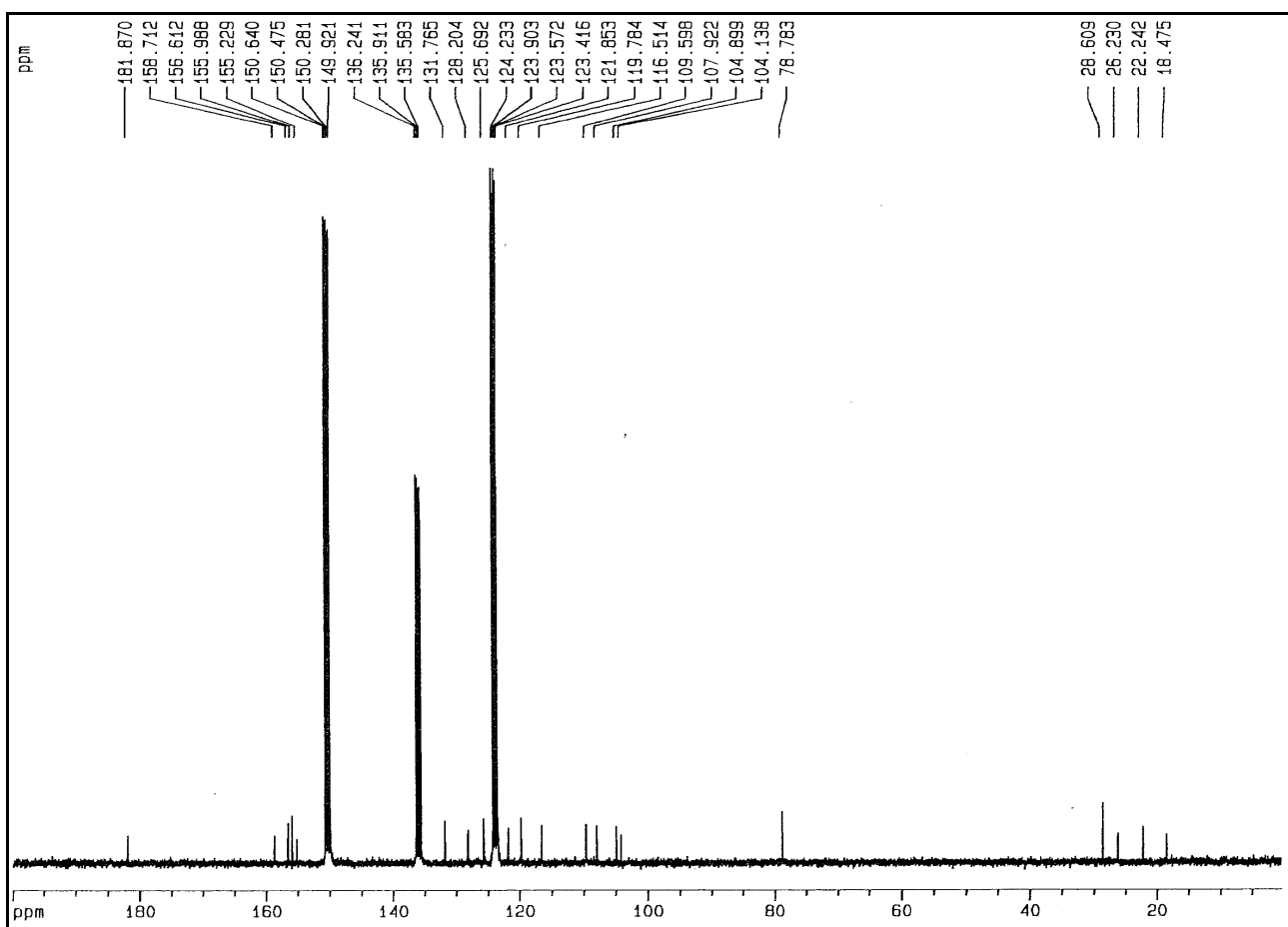


Figura 11. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto CP1 (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

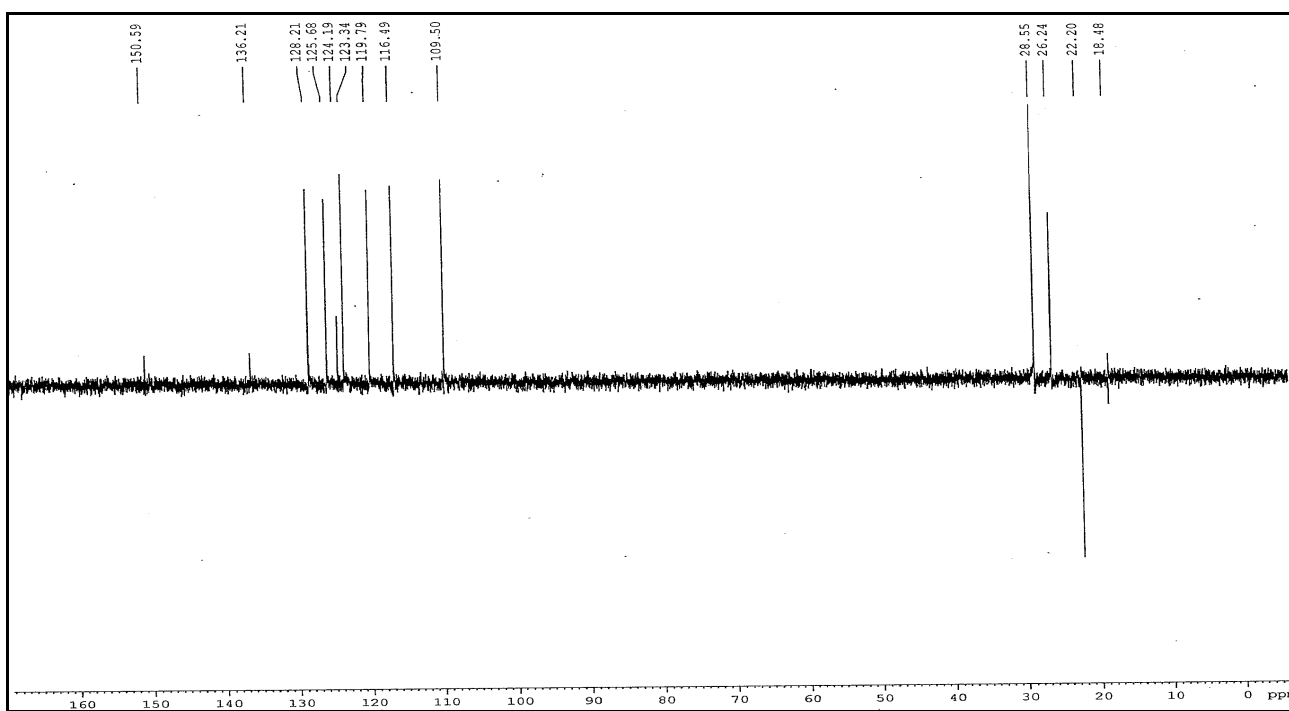


Figura 12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  do composto CP1 (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

A partir da análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  - HSQC (Figura 13, p. 69), foi possível correlacionar cada hidrogênio ao seu respectivo carbono. A confirmação do núcleo 2,3-desidro-pirano foi possível pela correlação entre os sinais de hidrogênio em  $\delta$  1,49 ( $\text{H}_{14}$ , s);  $\delta$  1,49 ( $\text{H}_{15}$ , s); 5,65 ( $\text{H}_{12}$ , d,  $J = 10,0$  Hz) e  $\delta$  6,97 ( $\text{H}_{11}$ , d,  $J = 10,0$  Hz) e os sinais de carbono em  $\delta$  28,55 ( $\text{C}_{14}$ ); 28,55 ( $\text{C}_{15}$ ); 116,49 ( $\text{C}_{11}$ ) e 128,21 ( $\text{C}_{12}$ ).

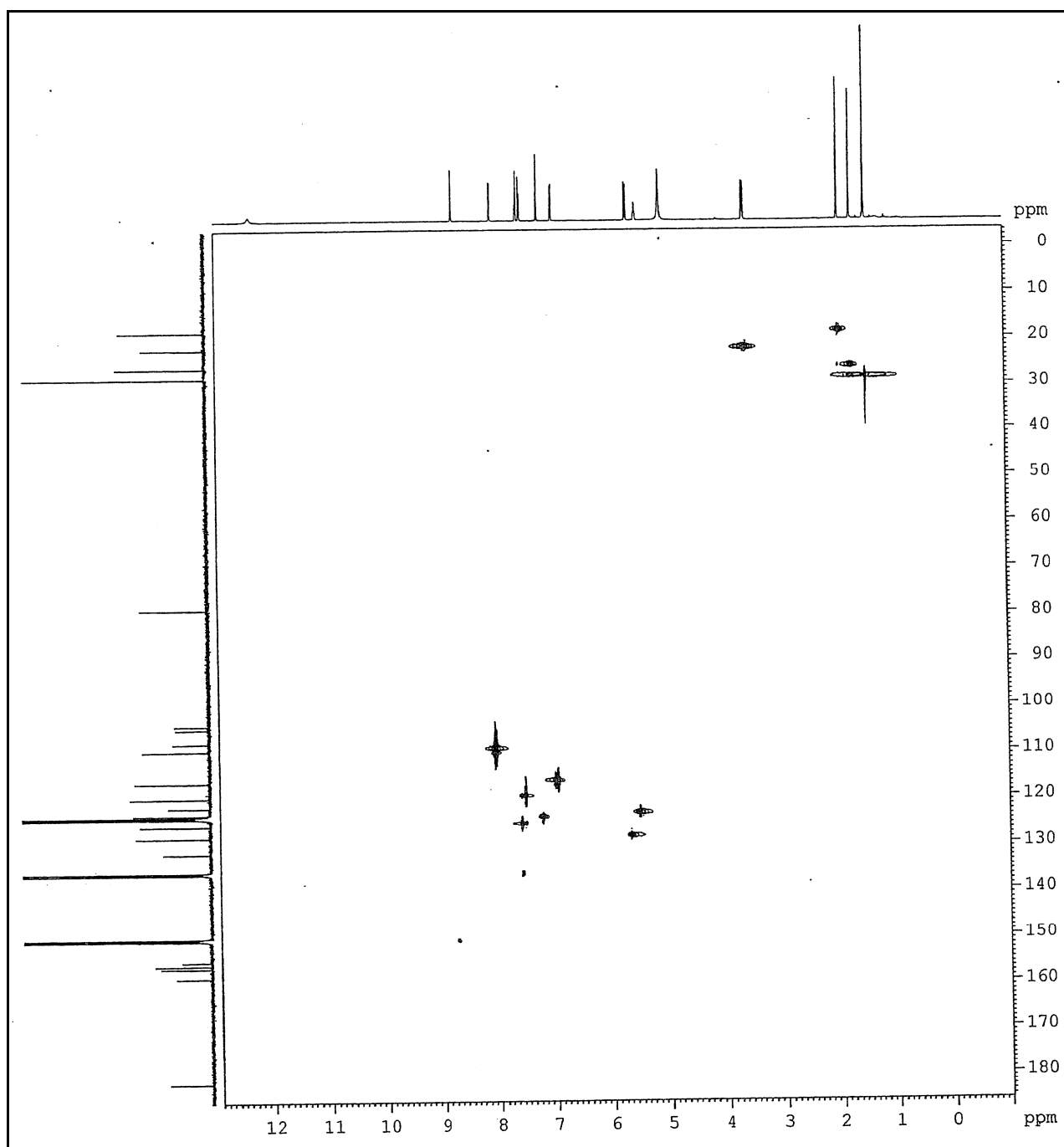


Figura 13. Espectro HSQC do composto CP1.

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC (Figura 14, p. 71) permitiu observar o acoplamento entre hidrogênios e carbonos a duas e três ligações.

A posição do fragmento prenila em  $\text{C}_2$  foi confirmada pelas correlações observadas no espectro HMBC, entre os dois hidrogênios em  $\delta$  3,62 ( $\text{H}_{16}$ ) a duas ligações com os carbonos em  $\delta$  123,35 e 107,88 ( $\text{C}_{17}$  e  $\text{C}_2$ ,  $^2J_{\text{CH}}$ ) e a três ligações com os carbonos em  $\delta$  155,16 e 158,67 ( $\text{C}_1$  e  $\text{C}_3$ ,  $^3J_{\text{CH}}$ ). O acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta$  6,97 ( $\text{H}_{11}$ ) a duas ligações com o carbono em  $\delta$  104,86 ( $\text{C}_4$ ,  $^2J_{\text{CH}}$ ) e a três ligações com o carbono em  $\delta$  156,56 e 158,67 ( $\text{C}_{4a}$  e  $\text{C}_3$ ,  $^3J_{\text{CH}}$ ) determinou a conectividade entre os carbonos  $\text{C}_{11}$  e  $\text{C}_4$ .

Com os dados de HSQC e HMBC foi possível elaborar a tabela de correlação entre carbonos e hidrogênios (Tabela 8, p. 72).

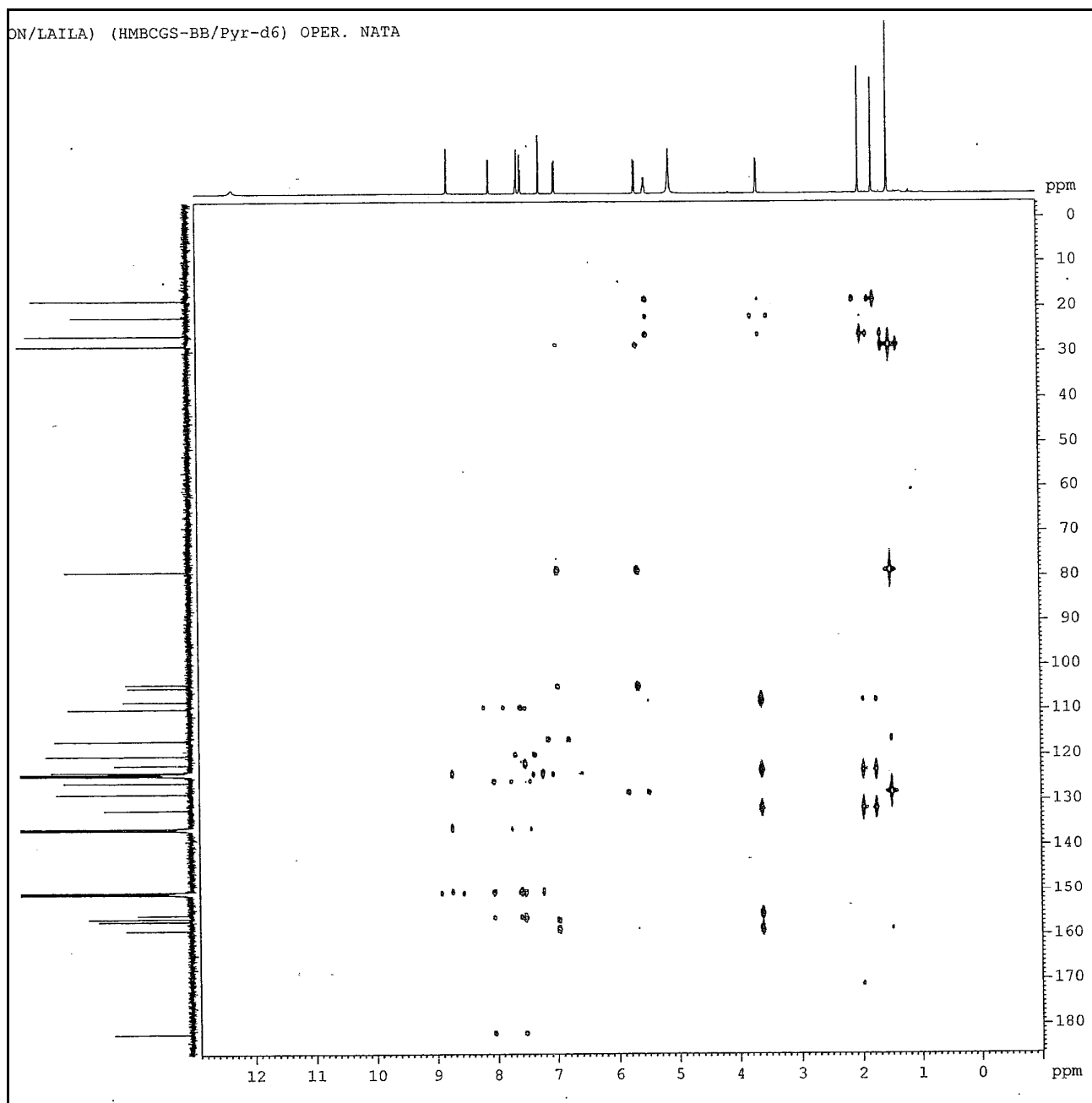


Figura 14. Espectro HMBC do composto CP1.



Tabela 8. Correlações HSQC e HMBC do composto CP1.

	CP1 (em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N)			
	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>				
1	155,16	-		2H-16
2	107,88	-	2H-16	H-17
3	158,67	-		H-11; 2H-16
4	104,86	-	H-11	H-12
4a	156,56	-		H-11
7	155,97	-	H6; H-8	H-5
8a	121,80	-	H-8	H-5
9	181,87	-		H-8
9a	104,08	-		
10a	150,47	-	H-5	H-6; H-8
13	78,78	-	H-12; 3H-14; 3H-15	H-11
18	131,76	-	H-17 3H-19/3H-20	2H16
<b>CH</b>				
2	-	-	-	-
5	119,78	7,53 (d, 10,0)		
6	125,68	7,58 (dd, 10,0, 3,0)		H-8
8	109,21	8,04 (d, 3,0)		H-5
11	116,49	6,97 (d, 10,0)	H-12	
12	128,21	5,65 (d, 10,0)	H-11	3H-14/3H-15
17	123,35	5,49 (t, 7,8)	2H-16	3H-19; 3H-20
<b>CH<sub>2</sub></b>				
16	22,28	3,62 (d, 7,8)		
<b>CH<sub>3</sub></b>				
14	28,55	1,49 (s)		H-12 3H-15
15	28,55	1,49 (s)		H-12; 3H-14
19	18,48	1,96 (sl)		H-17
20	26,24	1,74 (sl)		H-17
HO-1	-	13,86 (s)		

O espectro COSY de **CP1** (Figura 15, p. 73) possibilitou a identificação dos acoplamentos entre hidrogênios.

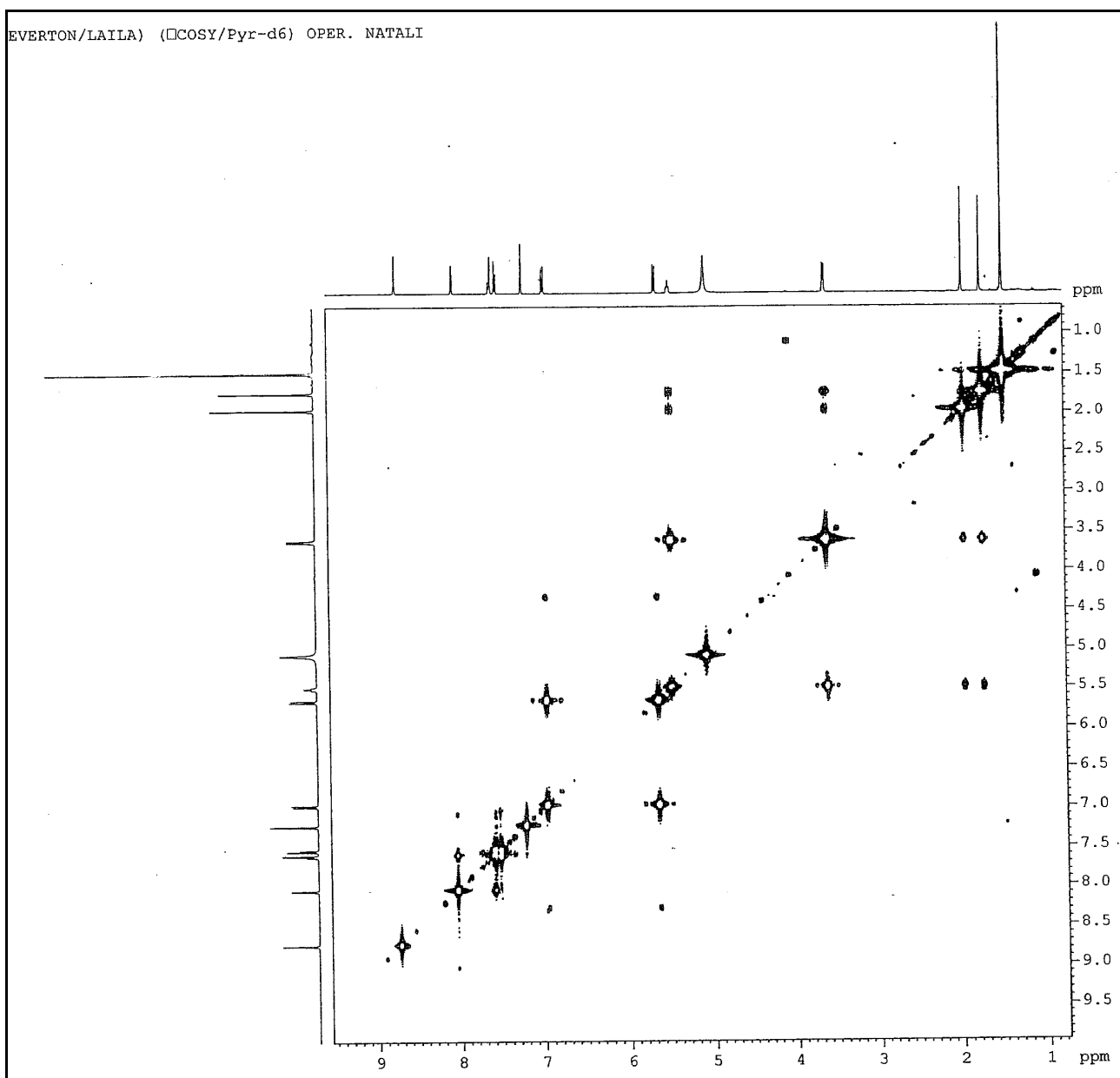
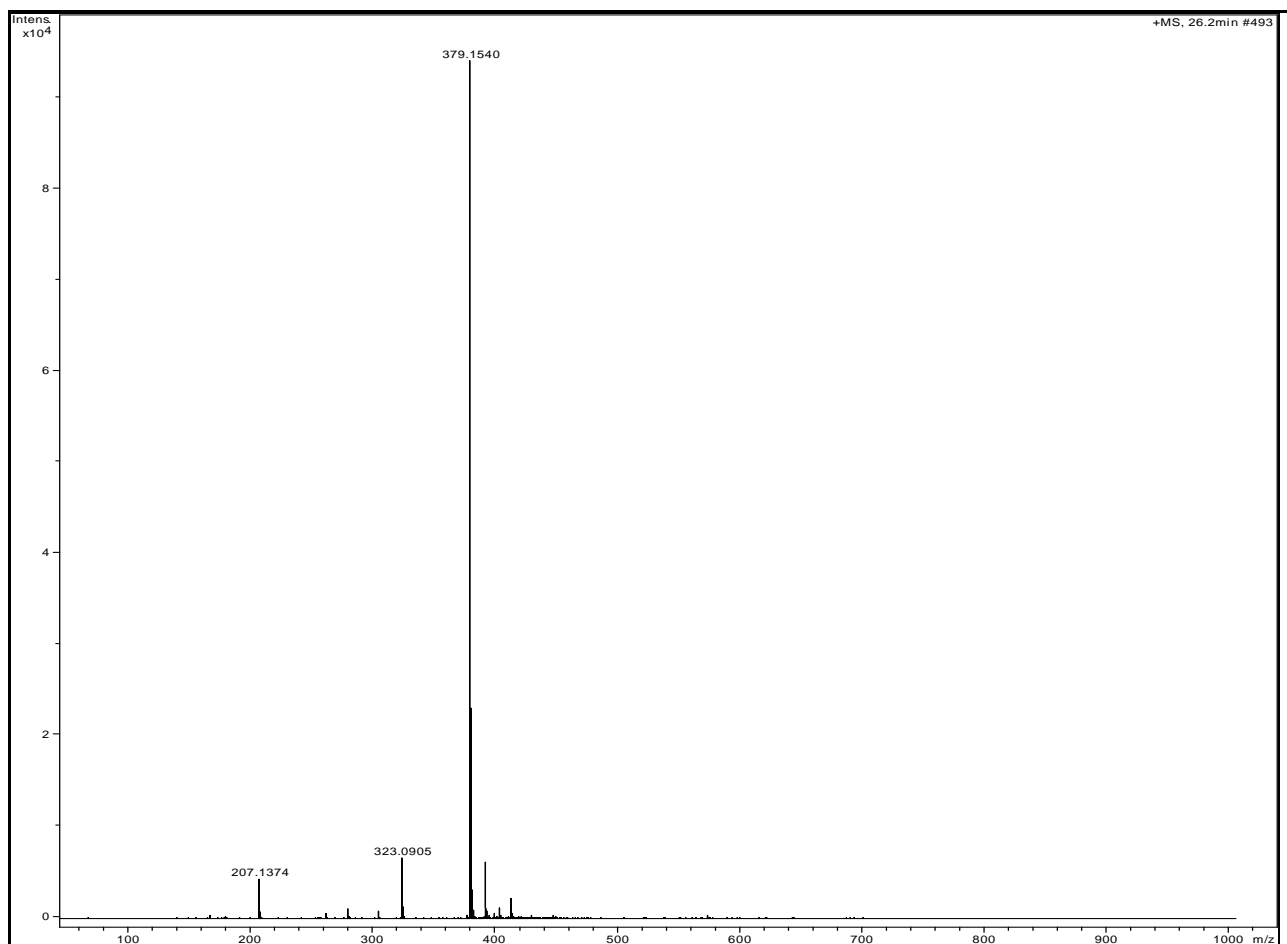
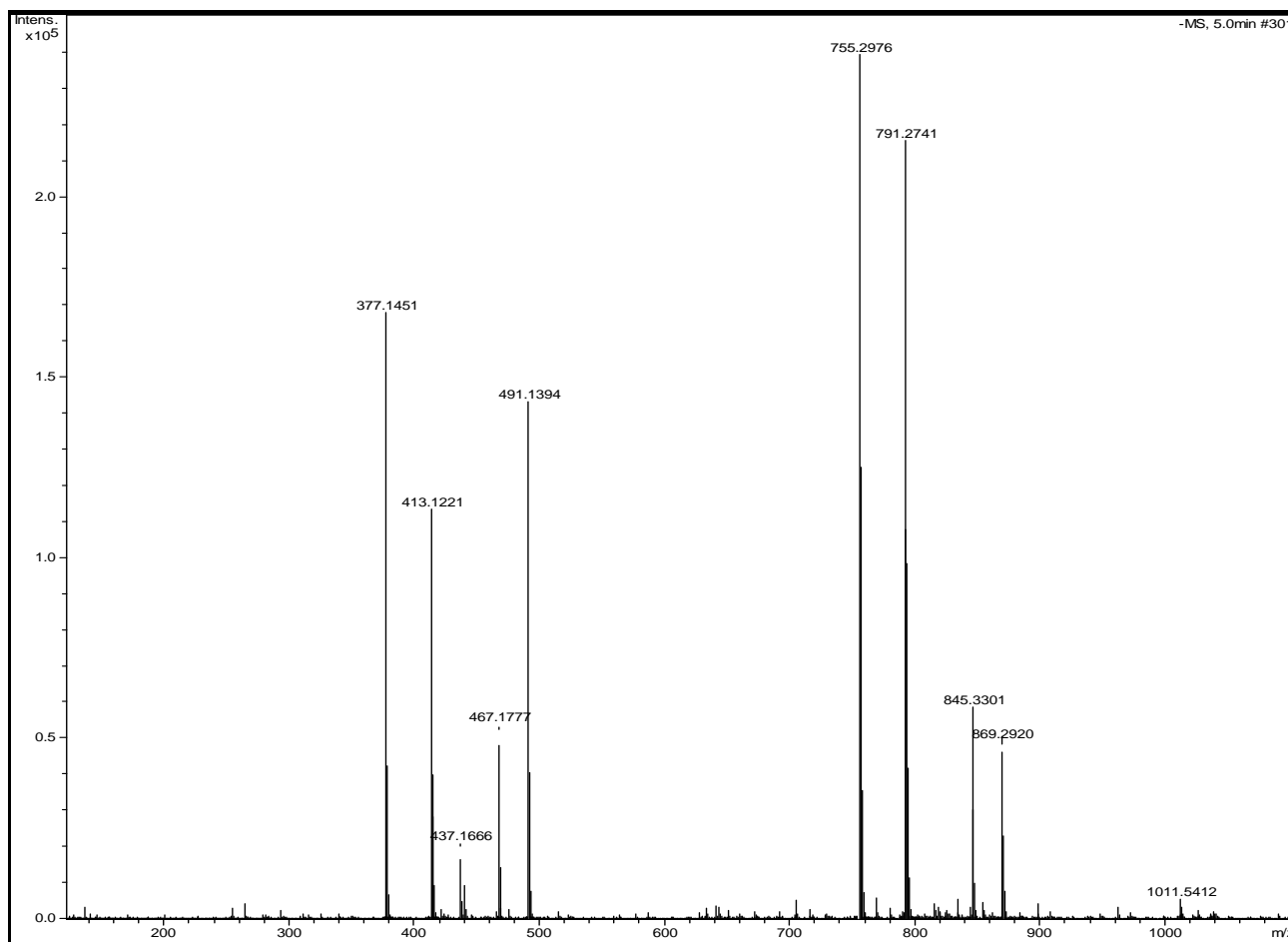


Figura 15. Espectro COSY do composto CP1.

A fórmula molecular  $C_{23}H_{24}O_5$  foi estabelecida conforme dados de HR-ESI-MS, operando no modo positivo. A molécula protonada  $[M+H]^+$  apresentou  $m/z$  379,1540 (erro de 1,0 ppm) (Figura 16, p. 74). Foi realizada também a análise em modo negativo (Figura 17, p. 75), sendo obtida a molécula desprotonada  $[M-H]^-$  com  $m/z$  377,1451 (erro de 16 ppm).

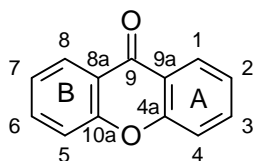


**Figura 16. Espectro de massas do composto CP1 em alta resolução ESI-MS (erro de 1 ppm) em modo positivo  $[M+H]^+$ .**



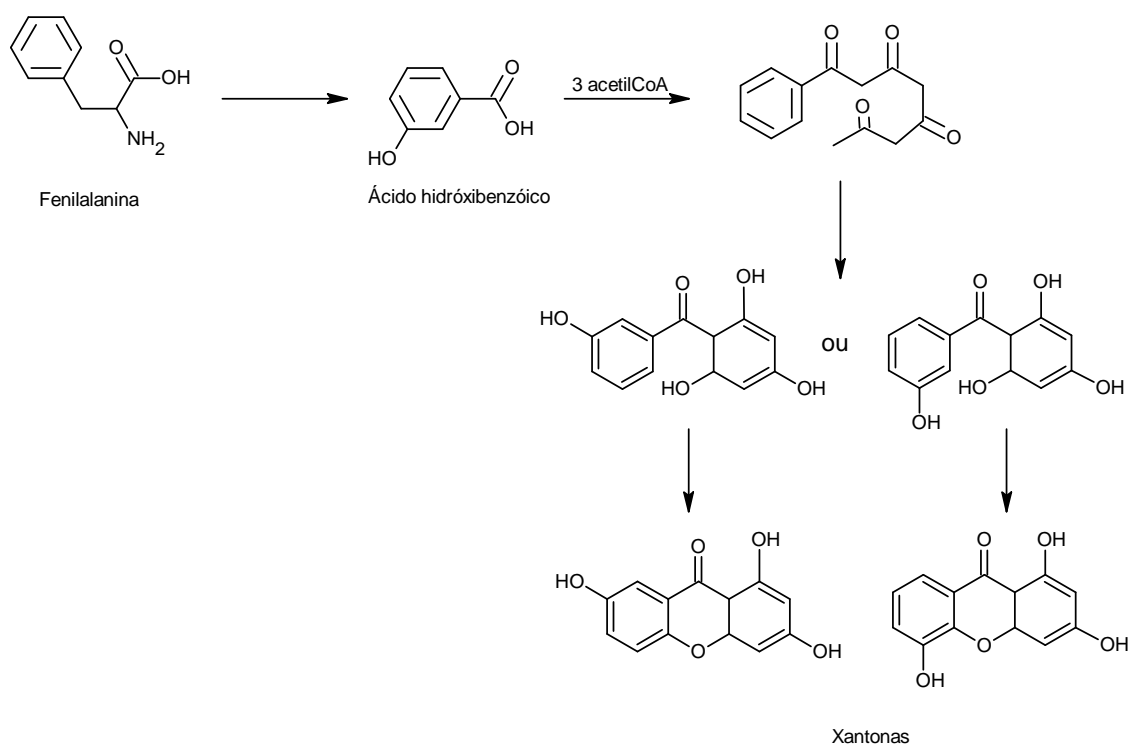
**Figura 17. Espectro de massas do composto CP1 em alta resolução ESI-MS (erro de 16 ppm) em modo negativo [M-H]<sup>-</sup>.**

Xantonas são compostos polifenólicos produzidos por plantas, fungos e líquens. O núcleo básico dessa classe química é tricíclico, com um esqueleto simétrico. O anel A é formado pela via do acetato, envolvendo os carbonos 1-4, enquanto o anel B é derivado da via do ácido chiquímico, constituído pelos carbonos 5-8 (Figura 18, p. 75) (El-Seedi *et al.*, 2010).



**Figura 18. Estrutura básica de xantonas.**

A formação da estrutura primária de treze carbonos desse grupo em plantas tem como base precursora as benzofenonas poliidroxiladas. No início, a fenilalanina, formada na via do chiquimato com a condensação entre ácido corísmico e fosfoenolpiruvato, sofre oxidação para gerar o ácido hidróxibenzóico (El-Seedi *et al*, 2010). A condensação de três unidades de acetato na extremidade carboxílica e o subsequente rearranjo levam à ciclização que produz o anel A. Em sequência, a oxidação de um grupo hidroxila presente em benzofenonas, com a perda de um hidrogênio, causa o fechamento que forma o terceiro e último anel (Figura 19, p. 76) (El-Seedi *et al*, 2010).



**Figura 19. Biosíntese geral de xantonas. Fonte: El-Seedi *et al*, 2010.**

Diferentes xantonas são descritas por sua atividade antiprotozoária (El-Seedi *et al*, 2009). Em nosso trabalho, o extrato AcOEt da casca do caule de *C. pernambucensis* apresentou  $CI_{50}$  igual a 65,0  $\mu\text{g/mL}$  em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Avaliando o potencial leishmanicida do composto **CP1** em

macrófagos peritoneais infectados com formas amastigotas, foi possível observar que a clusiauxantona (**CP1**) apresentou com  $CI_{50}$  igual a 25,3  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 6, p. 61). Em relação à citotoxicidade, a clusiauxantona apresentou  $CC_{50} = 17,22 \mu\text{g/mL}$ . O isolamento do composto **CP1** permitiu aprimorar a atividade observada no extrato bruto. Apesar do efeito moderado observado em formas amastigotas e a citotoxicidade em macrófagos murinos, é possível considerar esse composto como protótipo para obtenção de derivados ativos. O potencial anti-protozoário das xantonas é evidenciado em estudos com *Plasmodium* sp., *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* (Azebaze *et al.*, 2008; Dua *et al.*, 2009).

Um mecanismo sugerido para a ação de xantonas em tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania* sp., é a formação de complexos com grupos heme (presentes na hemoglobina, por exemplo) (Kelly *et al.*, 2003). Essa interação interfere em uma via metabólica essencial para o parasito, e no caso da *Leishmania*, essa dependência ocorre tanto em promastigotas como amastigotas (Kelly *et al.*, 2003, Schmidt *et al.*, 2012b).



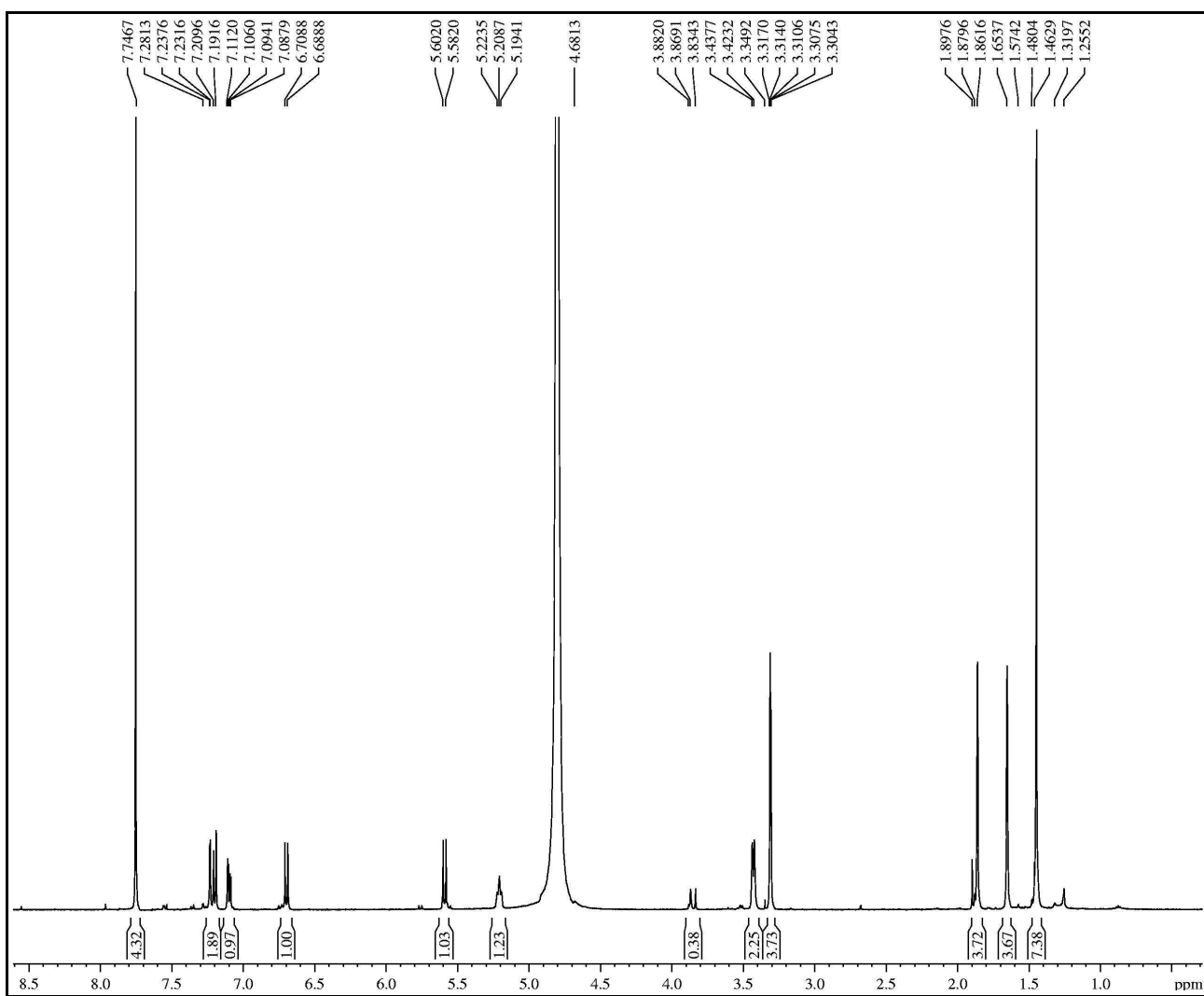


Figura 21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado 1a (500 MHz, MeOD).



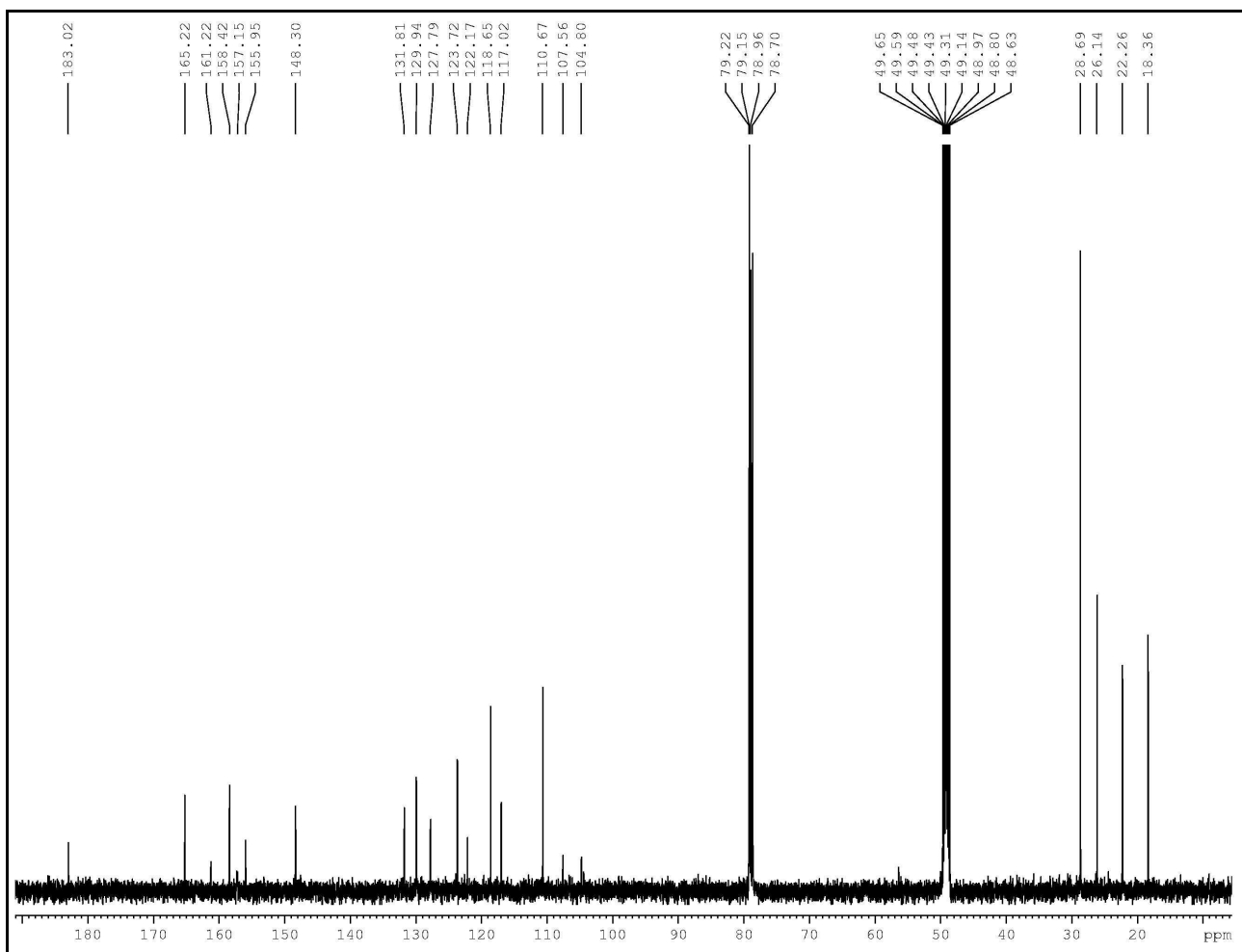
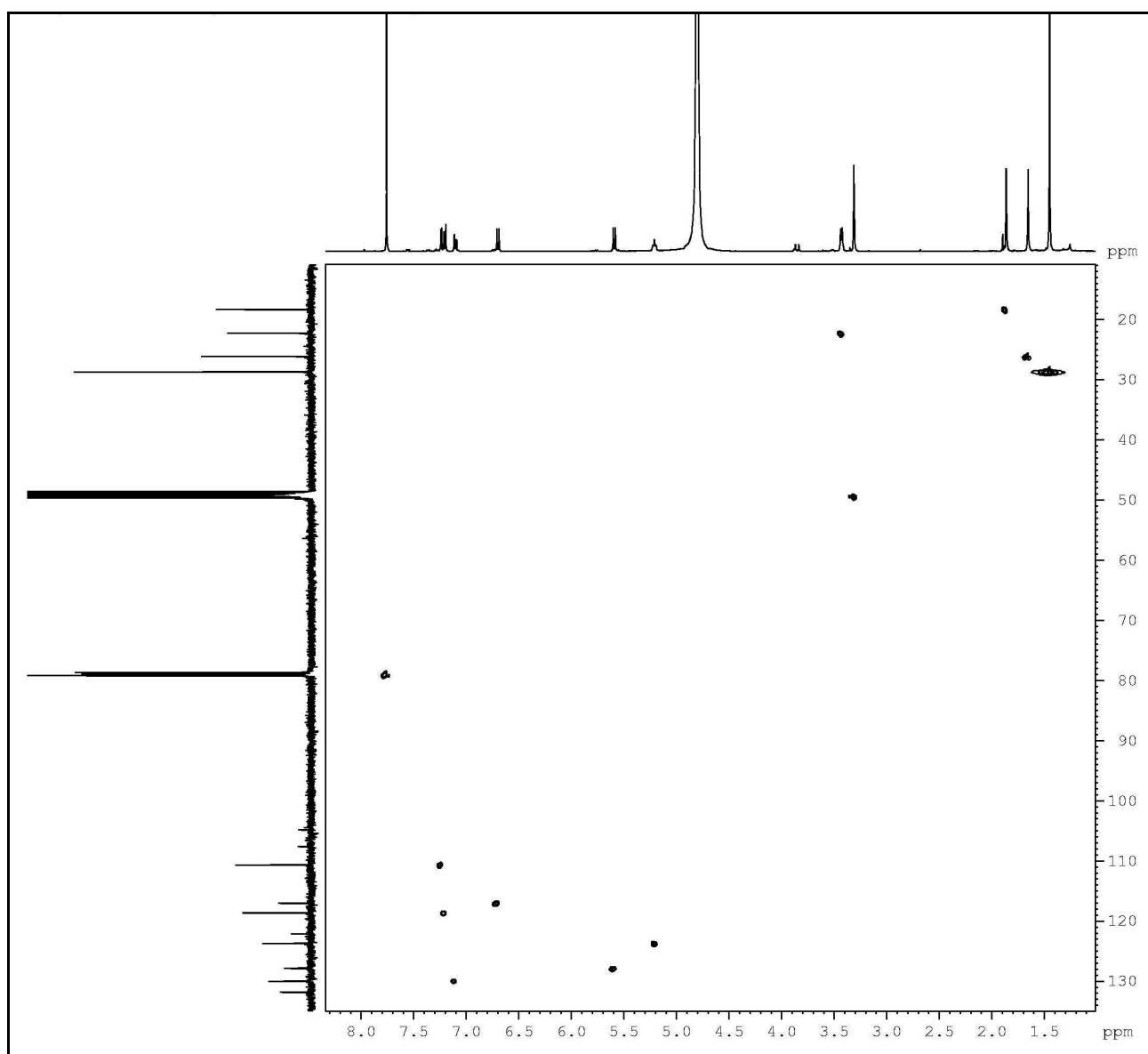


Figura 22. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado 1a (125 MHz, MeOD).

Para correlacionar cada hidrogênio ao seu respectivo carbono, foi analisado o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  - HSQC (Figura 23, p. 81). A tabela 9 (p.83) reúne os dados de HSQC, demonstrando a correlação e os acoplamentos entre carbonos e seus respectivos hidrogênios.



**Figura 23. Espectro HSQC do derivado 1a.**

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear a mais de uma ligação  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  – HMBC do derivado 1a (Figura 24, p. 82) permitiu observar o acoplamento entre hidrogênios e carbonos a duas e três ligações.

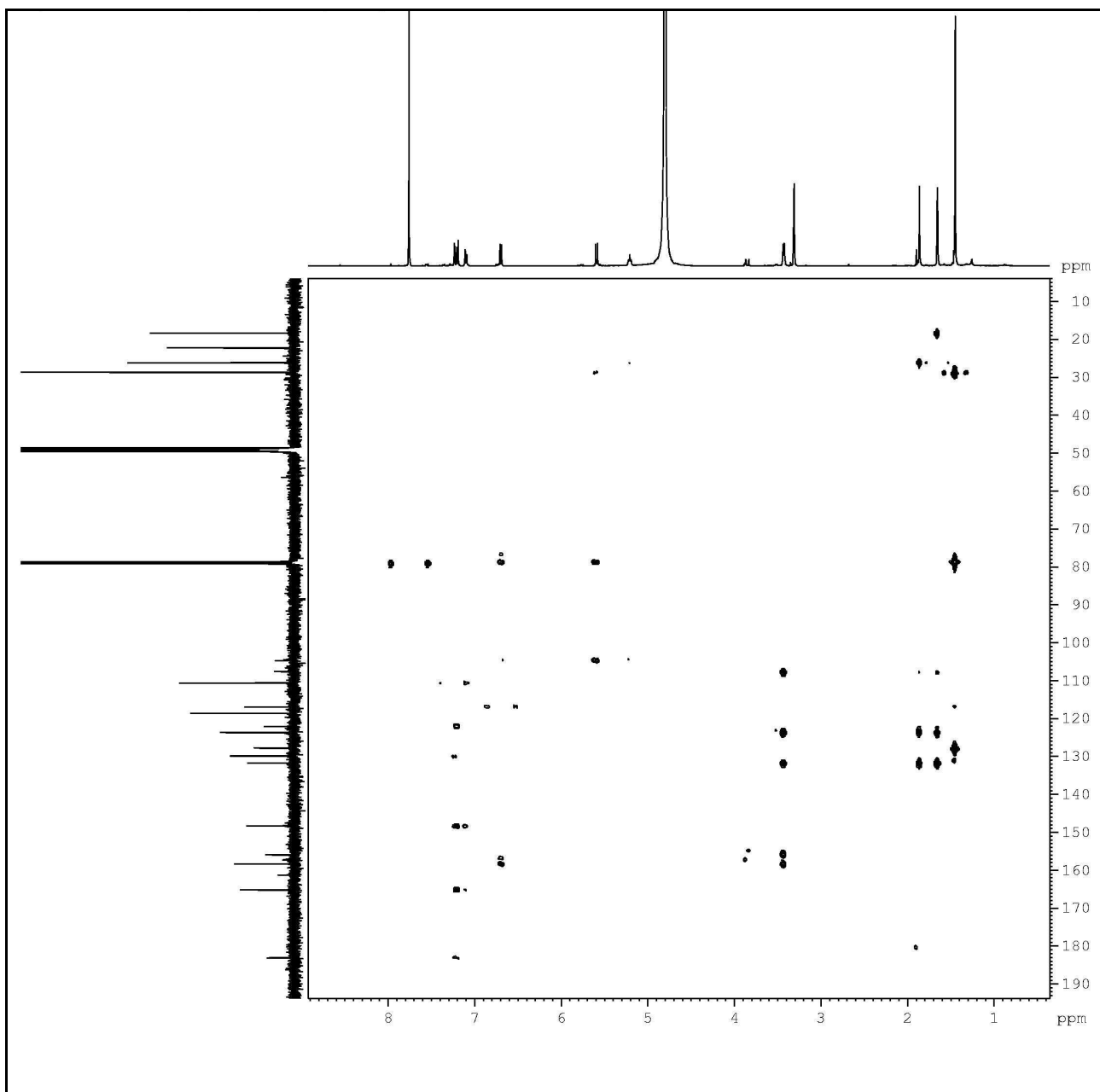
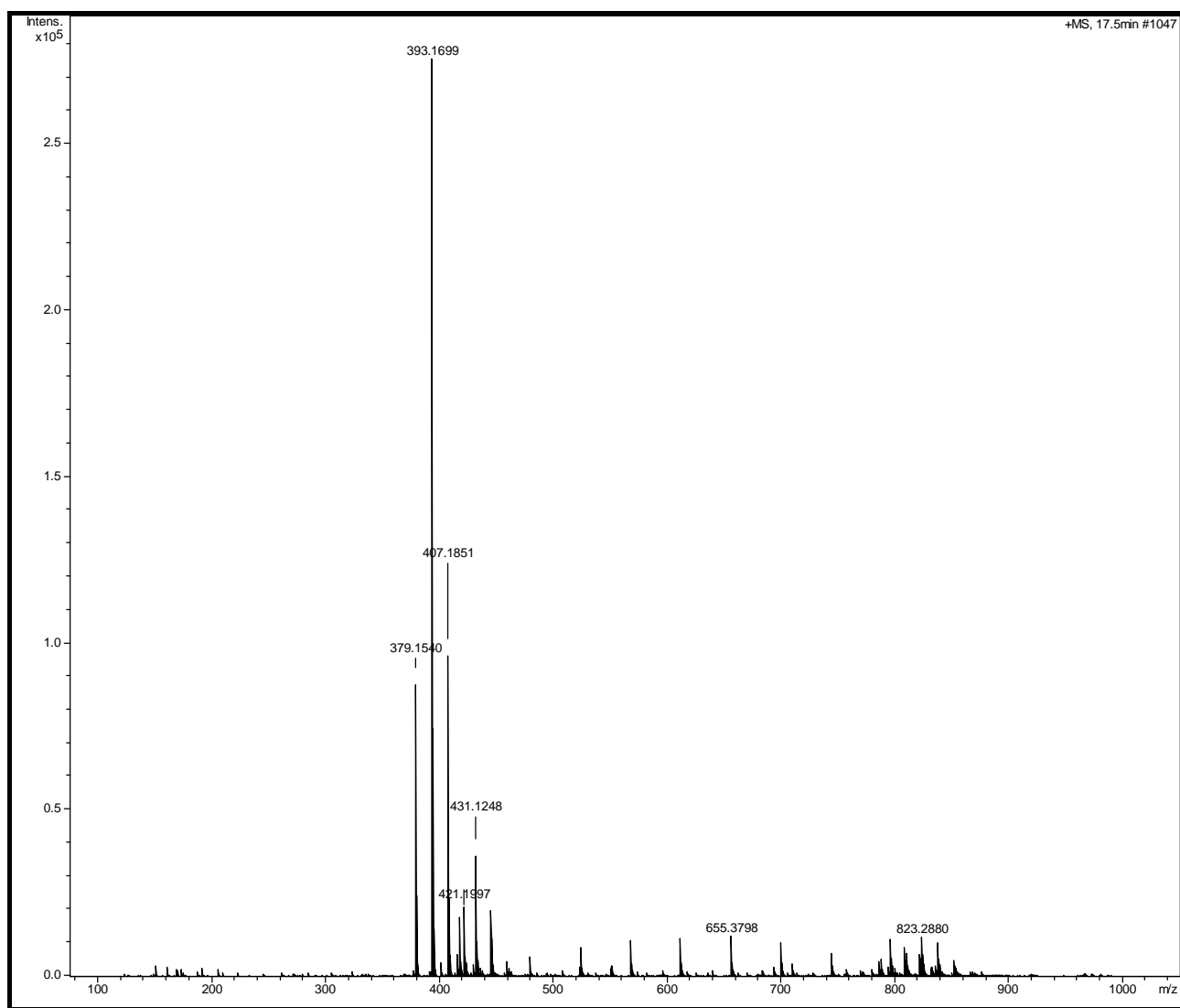


Figura 24. Espectro HMBC do derivado 1a.

Tabela 9. Correlações HSQC do derivado 1a.

Derivado 1a (em CDCl <sub>3</sub> +CD <sub>3</sub> OD)		
HSQC		
	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>C</b>		
1	155,95	-
2	107,54	-
3	158,47	-
4	104,80	-
4 <sup>a</sup>	157,15	-
7	165,22	-
8 <sup>a</sup>	122,17	-
9	183,02	-
9 <sup>a</sup>	104	-
10 <sup>a</sup>	148,56	-
13	78	-
18	131,21	-
<b>CH</b>		
2	-	-
5	119,65	7,23 (d, 3,0)
6	129,94	7,19 (d, 9,0)
8	110,67	7,10 (dd, 9,0, 3,0)
11	117,02	6,69 (d, 10,0)
12	127,79	5,59 (d, 10,0)
17	123,72	5,23 (t, 7,4)
<b>CH<sub>2</sub></b>		
16	22,24	3,43 (d, 7,4)
<b>CH<sub>3</sub></b>		
14	28,69	1,48 (s)
15	28,69	1,48 (s)
19	18,36	1,86 (sl)
20	26,14	1,65 (sl)
MeO	49,20	3,31 (s)

Para o derivado **1a**, com fórmula molecular estabelecida  $C_{24}H_{26}O_5$ , foi obtida  $m/z$  393,1699 (erro de 0 ppm) para a molécula protonada  $[M+H]^+$  em HR-ESI-MS, operando em modo positivo (Figura 25, p. 84).



**Figura 25. Espectro de massas do derivado 1a em alta resolução ESI-MS (erro de 0 ppm) em modo positivo  $[M+H]^+$ .**

Para avaliar a atividade de cada composto é importante garantir uma infecção eficiente dos macrófagos pelas amastigotas. Dessa forma, foi padronizada uma taxa de infecção maior que 80% em todas as condições testadas.

O efeito antileishmania do derivado **1a** foi mantido (Tabela 6, p. 61), notando-se  $CI_{50}$  igual 22,5  $\mu\text{g/mL}$ . O composto natural **CP1** e o produto semi-sintético **1a** tiveram sua atividade leishmanicida observada em microscópio óptico (Figura 26, p. 86). A média da taxa de infecção para os macrófagos não-tratados foi de 4,95 amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. por cada macrófago. O teste com **CP1** a 20  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a infecção para 2,88 parasitos por célula, diminuindo em 42 % a quantidade de parasitos na célula hospedeira. Já os macrófagos murinos tratados com o derivado **1a** na mesma concentração apresentaram, em média, 2,78 amastigotas cada, ou seja, 44 % amastigotas a menos quando comparado ao controle negativo. A 10  $\mu\text{g/mL}$  também houve redução da infecção.

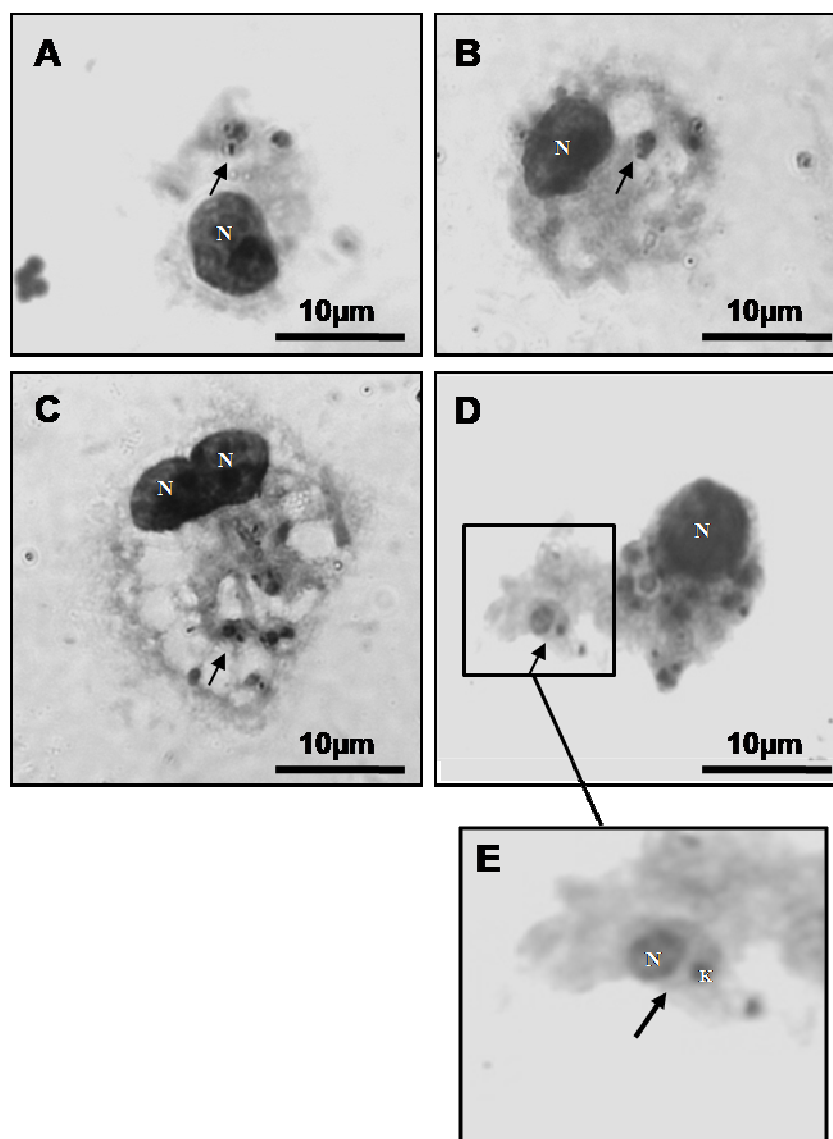


Figura 26. Lâminas de microscopia óptica dos ensaios com amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* intra-macrófago. (A) clusixantona 20 µg/mL, (B) derivado 1a 20 µg/mL, (C) clusixantona 10 µg/mL, (D) controle negativo, (E) detalhe da forma amastigota. (N) refere-se ao núcleo de cada célula, (K) refere-se ao cinetoplasto e as setas indicam a presença de amastigotas infectando as células.

A presença de grupos lipofílicos no derivado **1a** em relação ao composto original **CP1** proporciona melhor internalização da substância pelos macrófagos, tornando-o mais disponível. Quimicamente, há maior possibilidade de penetração do composto para atuação no alvo de interesse (Stec *et al.*, 2012, Audisio *et al.*, 2012).

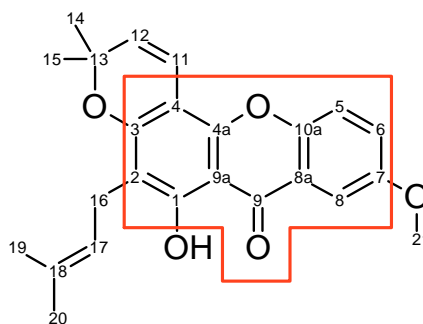
Os compostos **CP1** e **1a** consistem em xantonas com a presença de um grupo prenila na posição C<sub>2</sub>. Azebaze *et al.* (2008) estudaram a atividade de xantonas sintéticas em formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, observando que o potencial leishmanicida foi mais evidente na presença de grupos prenila nas posições 2 e 4. Esses pesquisadores observaram um CI<sub>50</sub> igual a 13,3 µg/mL para uma xantona natural prenilada em C<sub>2</sub>, e nenhuma atividade para xantonas simples sem a cadeia lateral prenila. Considerando que nossos ensaios foram realizados com xantonas preniladas na mesma posição (Figura 6, p. 61; Figura 20, p. 78), sugere-se que a presença de grupos prenila pode proporcionar melhor atividade antileishmania para atingir níveis desejáveis de atividade antileishmania.

Xantonas hidroxiladas e metoxiladas foram isoladas de *Andrographis paniculata* (Acanthaceae), com estruturas similares ao derivado **1a**, que apresenta uma função metóxi em C<sub>7</sub>. Esses compostos também mostraram atividade em amastigotas de *Leishmania infantum* no interior de macrófagos peritoneais (CI<sub>50</sub> = 8,0 µg/mL) (Dua *et al.* 2009).

De acordo com a literatura, o núcleo de xantonas hidroxiladas (Figura 27, p. 87) mostra potencial para o desenvolvimento de derivados ativos em *Leishmania* sp., como observado para 3,6-bis- $\omega$ -dietilaminoalcoxi-xantonas testadas em *L. mexicana* (Kelly *et al.*, 2003), com resultados que corroboram os dados obtidos



pelo nosso grupo com as xantonas (tabela 6, p. 61).



**Figura 27. Núcleo xantônico do composto CP1 e seu derivado 1a.**

A introdução de dietilaminas em dois grupos hidroxila permitiram a Kelly *et al.*, 2003 obter valores de  $CI_{50}$  na ordem de décimos de micrograma por mililitro, ou seja, entre 0,1 e 0,9  $\mu\text{g/mL}$ . Tendo em mãos uma xantona natural com rendimento razoável para obtenção de derivados, como obtivemos com a clusioxantona (36,2 mg), a alternativa de introduzir dietilaminas em cada hidroxila faz parte das perspectivas do nosso grupo para aprimorar a atividade observada.

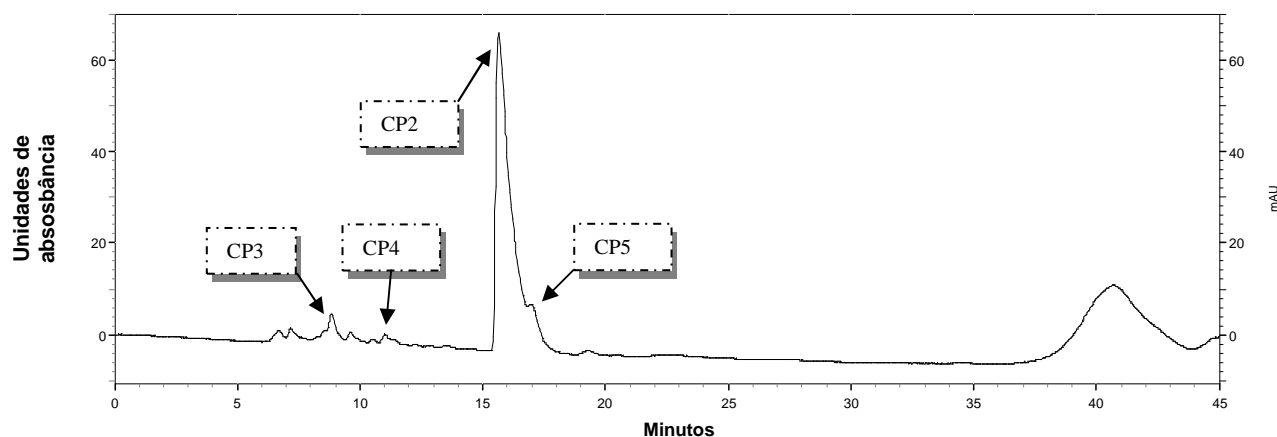
A reação de metilação com diazometano, proposta para obtenção do derivado **1a**, diminuiu a citotoxicidade da molécula original (**CP1**) (Tabela 6, p. 61). A análise das lâminas mostrou que a presença de macrófagos viáveis na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  foi maior no teste com o derivado **1a** do que o composto original, demonstrando menor citotoxicidade do derivado e maior viabilidade celular.

### 5.3. COMPOSTOS CP2 E SEU DERIVADO 2A, CP3, CP4 E CP5

Uma alíquota do grupo G-19 (200,3 mg) foi analisada por CLAE, operando em fase reversa (RP-CLAE), em um sistema eluente isocrático de H<sub>2</sub>O:MeOH:MeCN (8:32:60), com uma coluna preparativa ODS Shimadzu (20x250 mm, 10 µm), com fluxo de 9 mL/min e injeção de 1 mL (20 mg/mL) (Figura 28, p. 90). Foram coletados dez picos (Tabela 10, p. 89). Os picos 3 (1,4 mg), 5 (2,1 mg), 6 (85,3 mg) e 7 (10,2 mg) foram analisados por RMN e espectrometria de massas para identificação estrutural.

**Tabela 10. Fracionamento do grupo G-19 do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis* em RP-CLAE.**

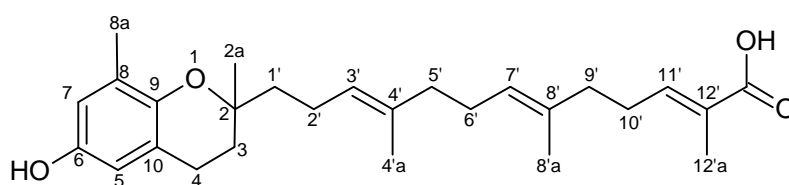
Pico	Massa (mg)
1	1,1
2	1,6
3	1,4
4	2,1
5	0,6
6	85,3
7	10,2
8	0,4
9	1,5
10	3,5
<b>TOTAL</b>	<b>107,7</b>



**Figura 28.** Cromatograma do grupo G-19 (20mg/mL) do extrato AcOEt da casca do caule de *Clusia pernambucensis*. CLAE com coluna ODS Shimadzu analítica (4,6 mm x 250 mm), em fase reversa. Fase móvel: MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20) : MeCN, 40:60, fluxo: 1 mL/min, detecção a 209 nm.

### 5.3.1 Composto CP2

O fracionamento do grupo CP-19 em CLAE (Figura 28, p. 90) permitiu a obtenção de um sólido amorfo de coloração verde, nomeado composto **CP2**, que após análises espectrométricas foi identificado como ácido Z- $\delta$ -tocotrienolóico (Figura 29, p. 90).



**Figura 29.** Estrutura do ácido Z- $\delta$ -tocotrienolóico (**CP2**).

A fórmula molecular de **CP2** é C<sub>27</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>, de nomenclatura sistemática ácido 2,6,10-tridecatrienóico, 13-[(2*R*)-3,4-dihidro-6-hidróxi-2,8-dimetil-2*H*-1-benzopiran-2-il]-2,6,10-trimetil. A presença do ácido Z- $\delta$ -tocotrienolóico ainda não havia sido relatada nessa espécie.

Para **CP2**, observou-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) a presença de dois dubletos em  $\delta$  6,49 ( $\text{H}_7$ , d,  $J = 2,6$  Hz) e 6,38 ( $\text{H}_5$ , d,  $J = 2,6$  Hz), indicando a possibilidade de ao menos um sistema aromático, com hidrogênios em posição *meta* entre si. Uma cadeia de farnesilo foi sugerida pelos singletos em  $\delta$  1,83 ( $\text{H}_{12'a}$ ), 1,60 ( $\text{H}_{8'a}$ ) e 1,59 ( $\text{H}_{4'a}$ ) referentes a três grupos metila, além da presença dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,29 ( $\text{H}_{10'}$ , m), 2,09 ( $\text{H}_{9'}$ , m), 2,07 ( $\text{H}_{6'}$ , m), 1,98 ( $\text{H}_{5'}$ , m), 2,11 ( $\text{H}_{2'}$ , m), 1,64 ( $\text{H}_{1',m}$ ), 1,53 ( $\text{H}_{1'}$ , m) e dois sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  6,89 ( $\text{H}_{11'}$ , dt,  $J = 7,2$  Hz) e 5,13 ( $\text{H}_7$  e  $\text{H}_3$ , t,  $J = 6,6$  Hz).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 30, p. 92) apresentou 27 linhas espectrais, sendo 6 linhas relativas a carbonos aromáticos ( $\delta$  147, 91; 146,13; 127,52; 121,41; 115,81 e 112,78) e 3 linhas de carbonos heterocíclicos pertencentes ao anel benzopirano ( $\delta$  75,51; 31,55 e 22,65). Foram observados ainda 15 sinais correspondentes ao grupo farnesilo ( $\delta$  175,08; 135,06; 133,88; 145,14; 127,03; 125,37; 124,65; 39,69; 38,20; 27,78; 26,63; 22,34; 16,13; 16,01 e 12,21). Com o suporte dos dados de  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (Figura 31, p. 92) foram observados 5 carbonos metílicos, 8 metilênicos, 5 metínicos e 9 não-hidrogenados (Tabela 11, p. 93). O deslocamento químico do grupo metílico em  $\text{C}_{12'a}$ , que mostrou efeito  $\gamma$  protetor do carbono metilênico em  $\text{C}_{10'}$ , permitiu definir a estereoquímica da carboxila em  $\text{C}_{13'}$ .

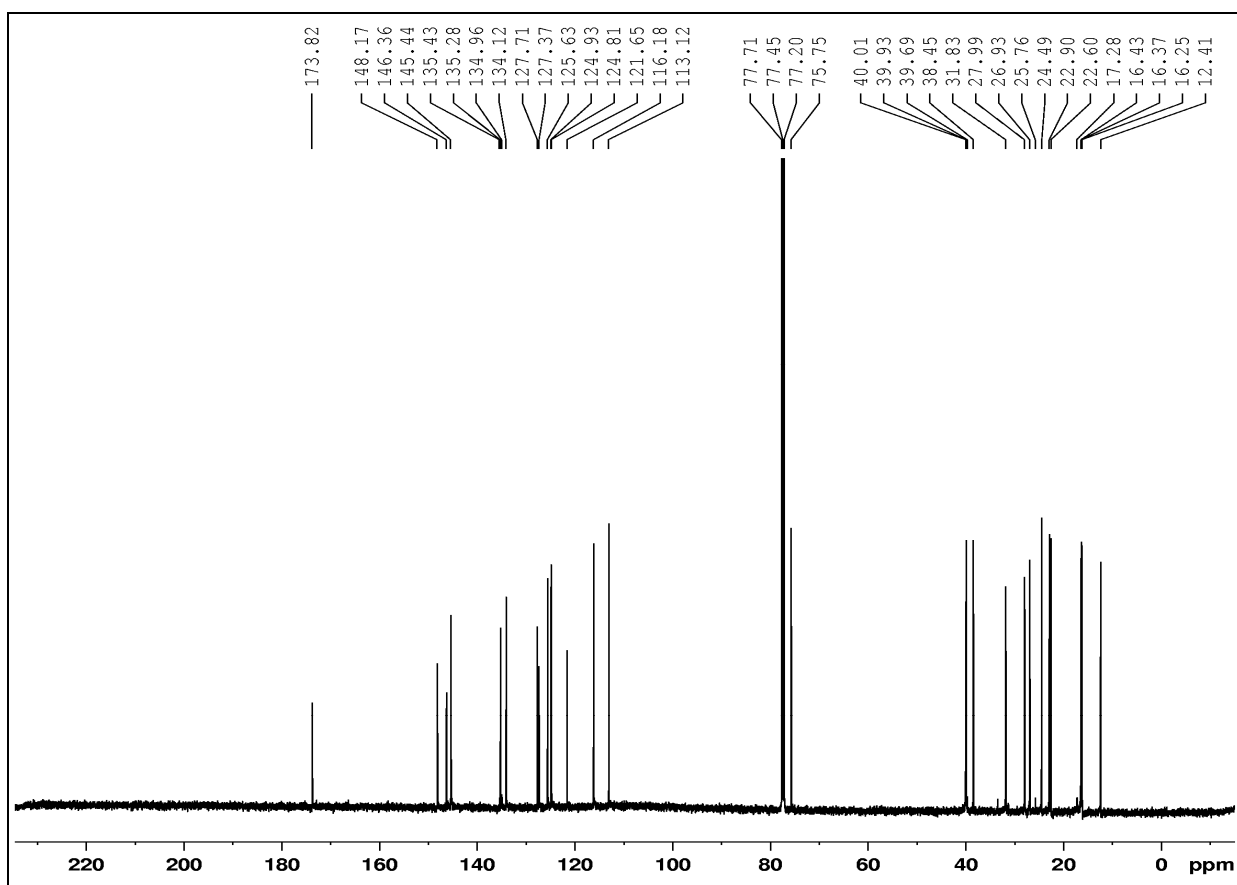


Figura 30. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto CP2 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

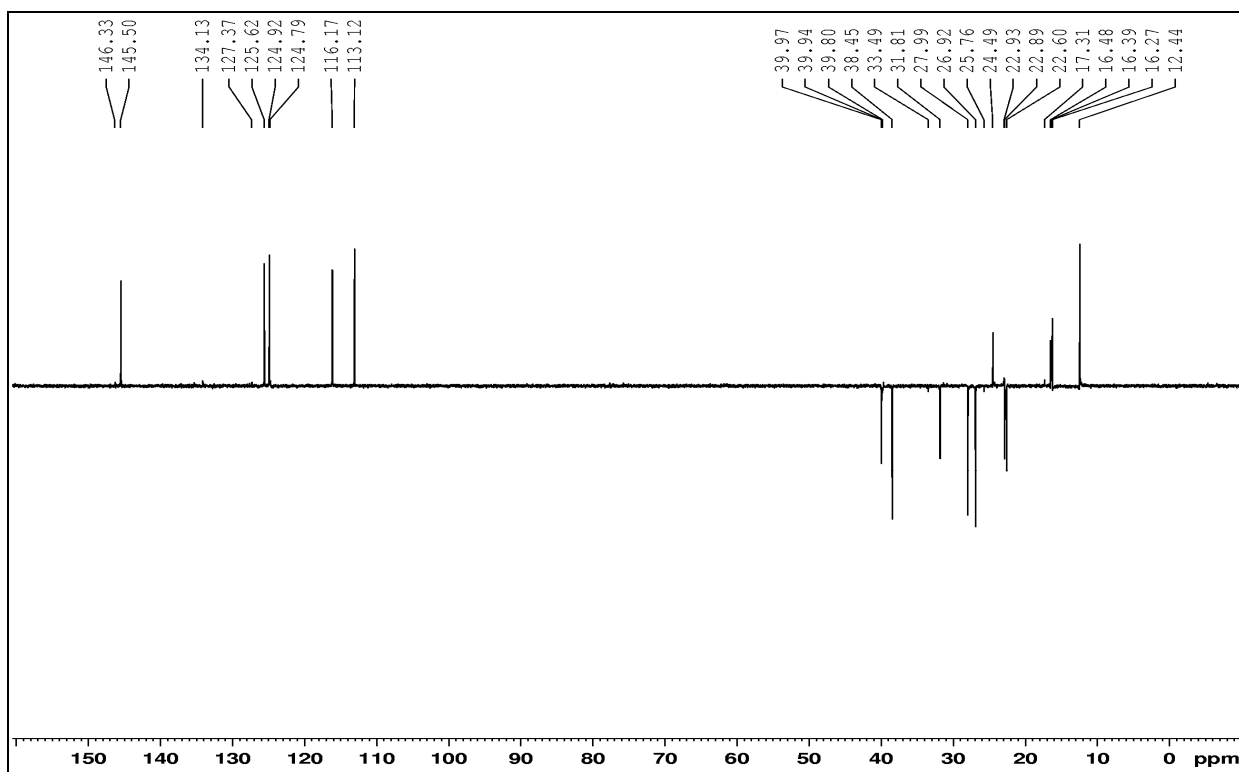


Figura 31. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  do composto CP2 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 11. Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  para o composto CP2**

C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
2	75,51	5	112,78	3	31,55	2a	24,21
6	147,91	7	115,81	4	22,65	8a	16,23
8	127,52	3'	124,65	1'	39,70	4'a	16,01
9	146,13	7'	125,37	2'	22,34	8'a	16,13
10	121,41	11'	145,14	5'	39,69	12'a	12,21
4'	135,06			6'	26,63		
8'	133,88			9'	38,20		
12'	127,03			10'	27,78		
12'b	175,08						
9 C		5 CH		8 CH <sub>2</sub>		5 CH <sub>3</sub>	

A análise do espectro HSQC (Figura 32, p. 94) permitiu associar cada hidrogênio ao seu respectivo carbono, enquanto o espectro de HMBC (Figura 33, p. 95) mostrou as correlações entre hidrogênios e carbonos a 2 e 3 ligações (Tabela 12, p. 96).

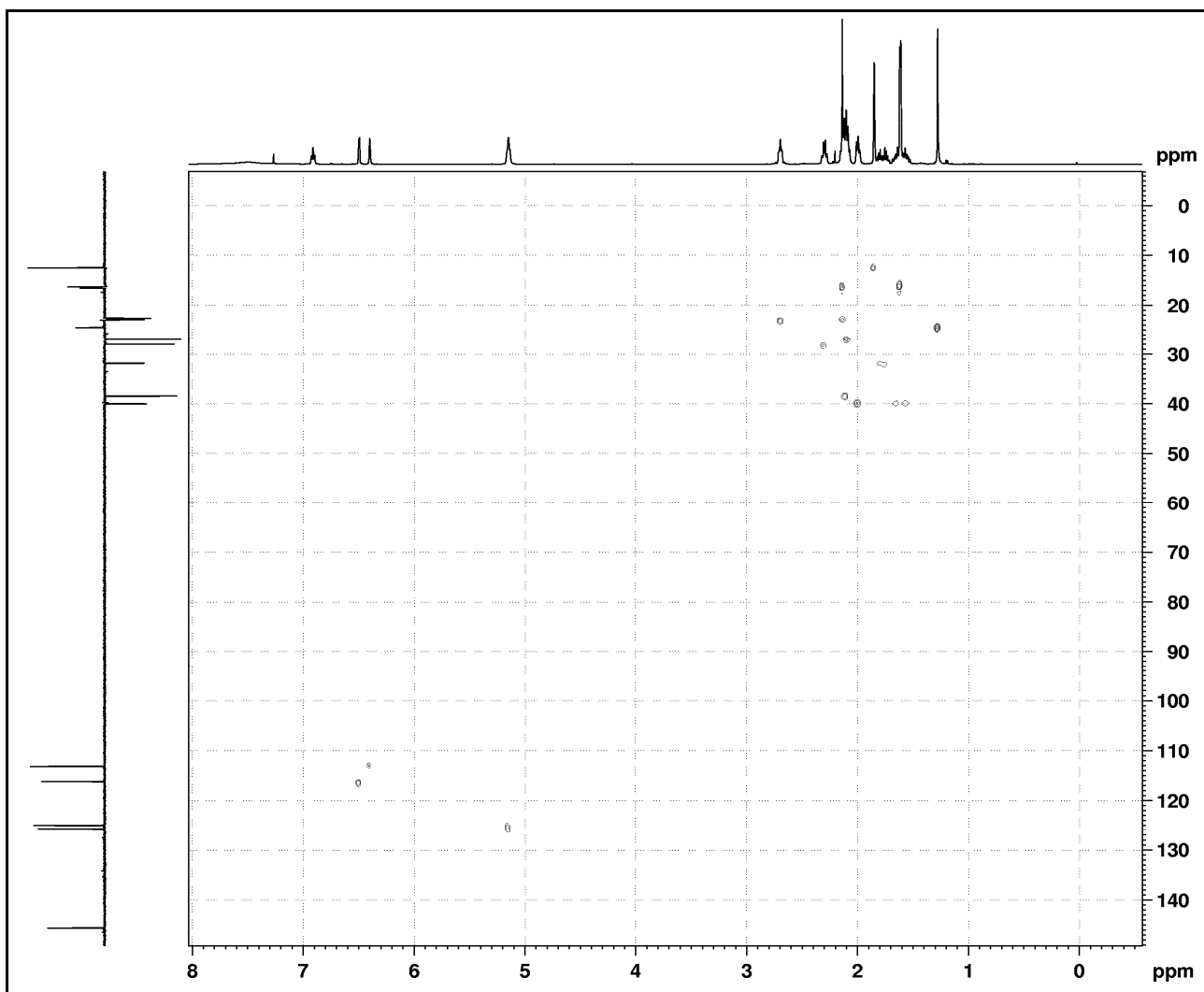


Figura 32. Espectro HSQC do composto CP2.

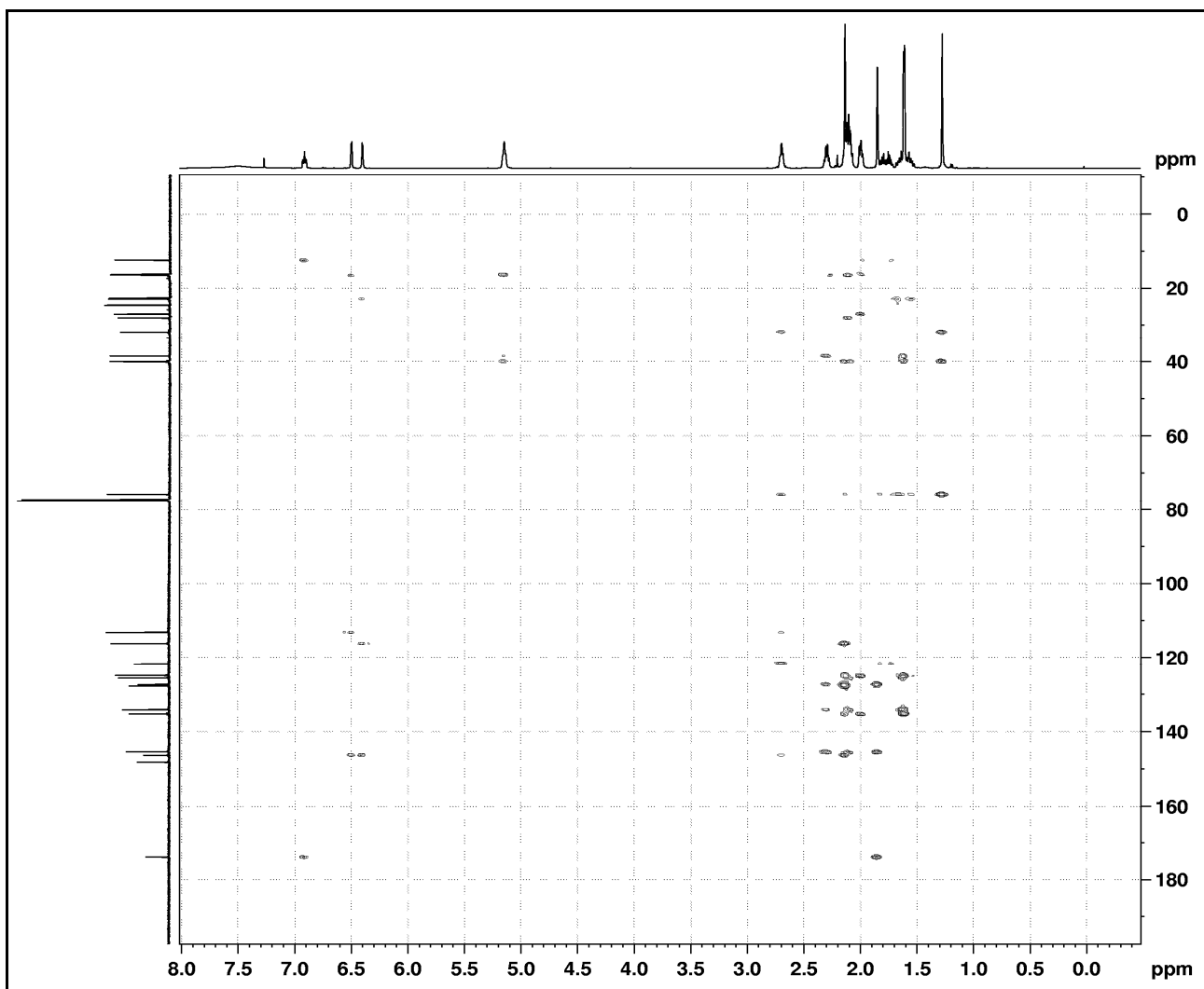


Figura 33. Espectro HMBC do composto CP2.



Tabela 12. Correlações HSQC e HMBC do composto CP2.

Composto CP2 (em CDCl <sub>3</sub> )				
	HSQC		HMBC	
<b>C</b>	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	75.51	-	2H-1'; 2H-3; 3H-2a	2H-2'; 2H-4
6	147.91	-	H-5 ; H-7	
8	127.52	-	3H-8 <sup>a</sup>	
9	146.13	-		H-5 ; 2H-4 ; H-7 ; 3H-8 <sup>a</sup>
10	121.41	-	2H-4	2H-3
4'	135.06	-	2H-5 ; 3H-4'a	2H-2'; 2H-6'
8'	133.88	-	2H-9'; 3H-8'a	2H-6'; 2H-10'
12'	127.03	-	3H-8'a ; H-11'	2H-10'
12'b	175.08	-		2H-10'; H-11'; 3H-12'a
<b>CH</b>				
5	112.78	6.38 (d, 2.6)		2H-4; H-7
7	115.81	6.48 (d, 2.6)		H-5 ; 3H-8 <sup>a</sup>
3'	124.65	5.13 (t, 6.6)	2H-2'	2H-5 ; 3H-4'a
7'	125.37	5.13 (t, 6.6)	2H-6'	2H-5 ; 3H-8'a
11'	145.14	6.89 (dt, 7.2, 1.3)	2H-10'	2H-9' ; 3H-12'a
<b>CH<sub>2</sub></b>				
3	31.55	1.80 (m), 1.73 (m)	2H-4	
4	22.65	2.70 (m)	2H-3	
1'	39.70	1.64 (m), 1.53 (m)	2H-2'	
2'	22.34	2.11(m)	2H-1'; 2H-3'	
5'	39.69	1.98 (m)		
6'	26.63	2.07 (m)		
9'	38.20	2.09 (m)		
10'	27.78	2.29 (m)		
<b>CH<sub>3</sub></b>				
2 <sup>a</sup>	24.21	1.27 (s)		2H-1'; 2H-3
8 <sup>a</sup>	16.23	2.13 (s)		H-7
4'a	16.01	1.59 (s)		H-3' ; 2H-5'
8'a	16.13	1.60 (s)		H-7' ; 2H9'
12'a	12.21	1.83 (sl)		H-11'
12'b	-	-	-	-

O espectro COSY de **CP2** (Figura 34, p. 97), possibilitou a identificação dos acoplamentos entre hidrogênios.

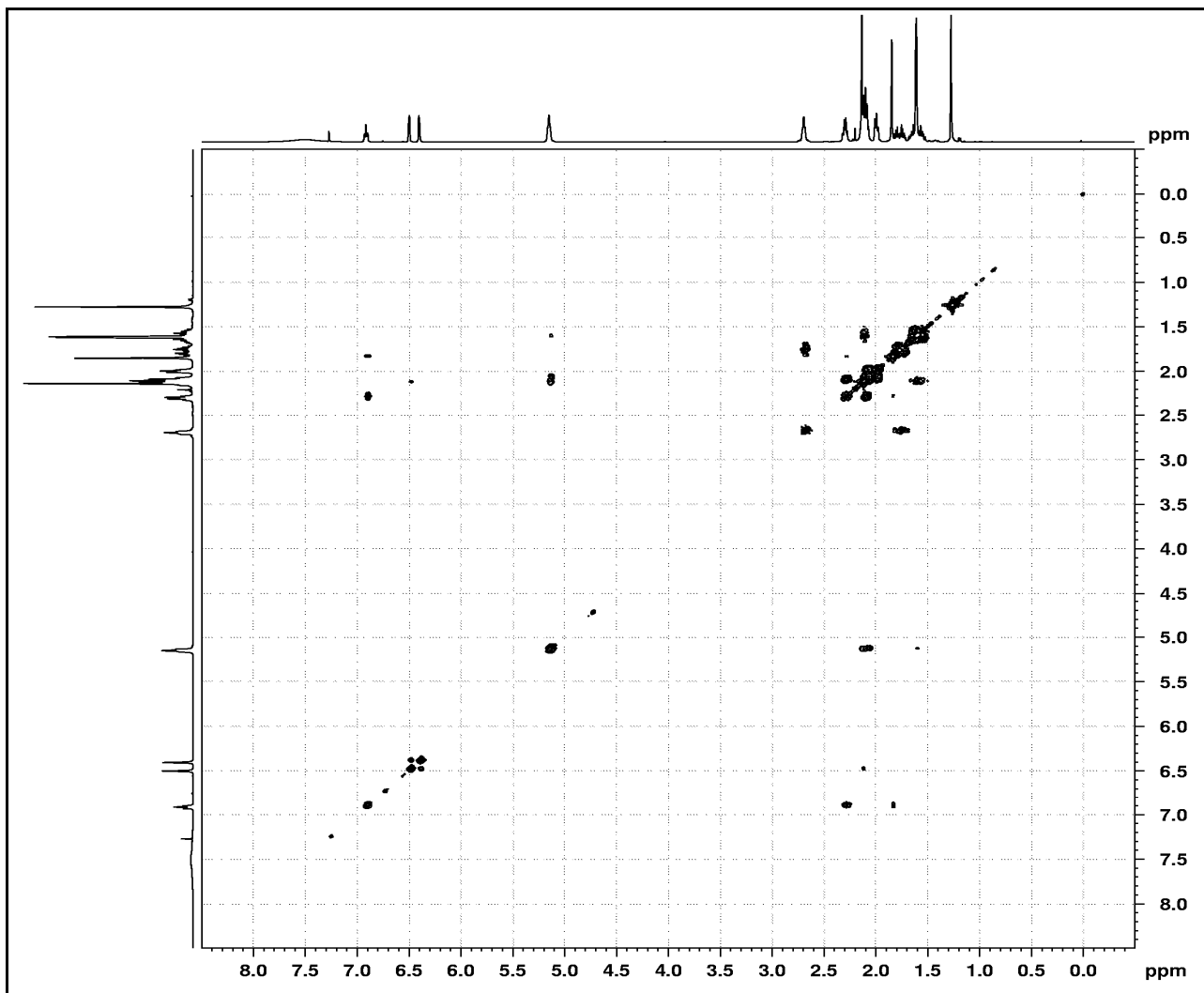


Figura 34. Espectro COSY do composto CP2.

Foi estabelecida a fórmula molecular  $C_{27}H_{38}O_4$  para o composto **CP2**, conforme dados de HR-ESI-MS, operando no modo positivo. A molécula protonada  $[M+H]^+$  apresentou  $m/z$  427,2958 (erro de 25 ppm) e 449,2786  $[M+Na]^+$  (erro de 26 ppm) (Figura 35, p. 98 e Figura 36, p. 98).

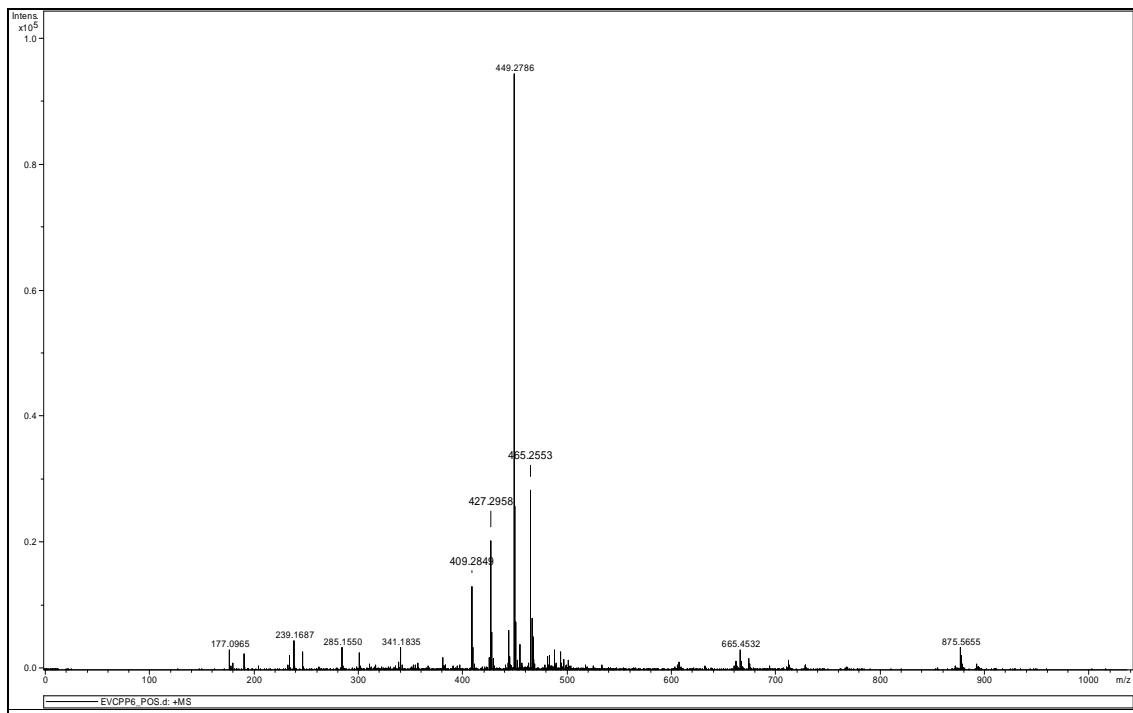


Figura 35. Espectro de massas do composto CP2 em alta resolução ESI-MS (erro de 25 ppm) em modo positivo  $[M+H]^+$ .

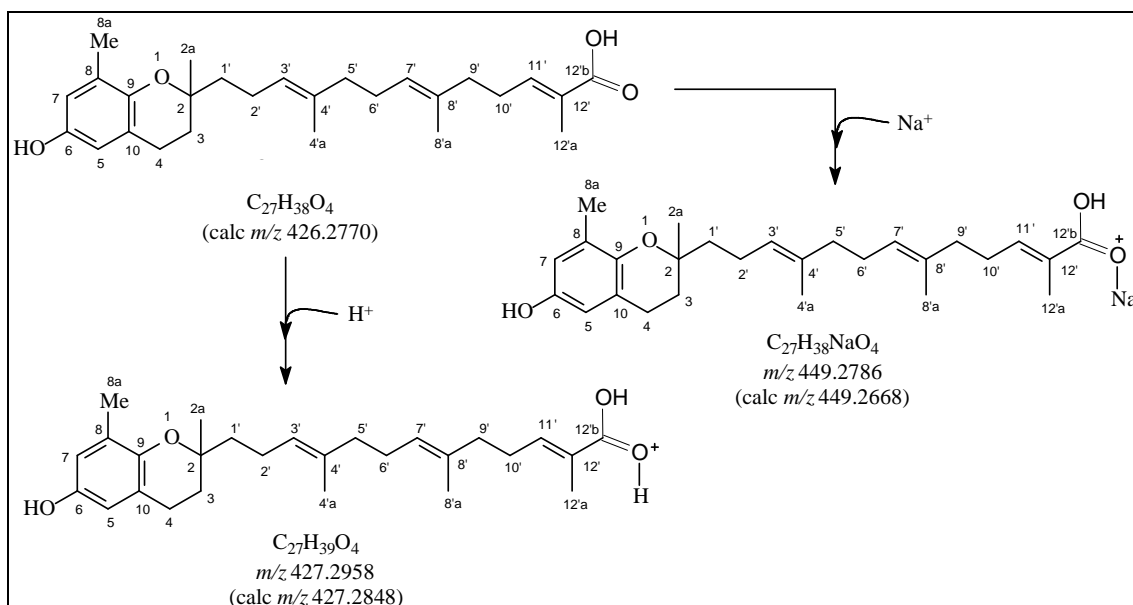


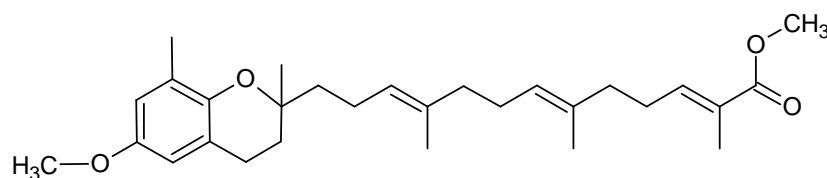
Figura 36. Hipótese de ionização de CP2.

O ácido Z- $\delta$ -tocotrienolico foi previamente isolado dos frutos de *Clusia grandiflora* (Delle Monache *et al.*, 1984). Em outro estudo, esse composto foi obtido de *Garcinia kola* e seu potencial antioxidante foi avaliado, sendo que o estado oxidativo da cadeia lateral não influenciou nessa propriedade (Terashima *et al.*, 2002). Significa dizer que mesmo na presença de diversos substituintes no carbono C<sub>13'</sub> (Figura 29, p. 90), a capacidade antioxidante se manteve inalterada.

O ácido Z- $\delta$ -tocotrienolico (**CP2**), contendo um ácido carboxílico em sua estrutura, demonstrou Cl<sub>50</sub> = 77,30  $\mu$ g/mL em amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Monzote *et al.* (2011) sugerem que, em termos de mecanismo de ação, compostos contendo grupos cromanol, dentre eles os tocotrienóis, inibem o complexo mitocondrial III, tornando inviáveis amastigotas de *Leishmania* sp.

### 5.3.2. Derivado 2a

O derivado **2a**, ácido 2,6,10-tridecatrienóico, 13-(3,4-dihidro-6-metóxi-2,8-dimetil-2*H*-1-benzopirano-2-il)-2,6,10-trimetil-metil éster, foi obtido a partir da metilação do composto **CP2**, utilizando-se diazometano. O produto da reação foi confirmado com a análise de espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Foi estabelecida a fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_4$  para o derivado **2a**.

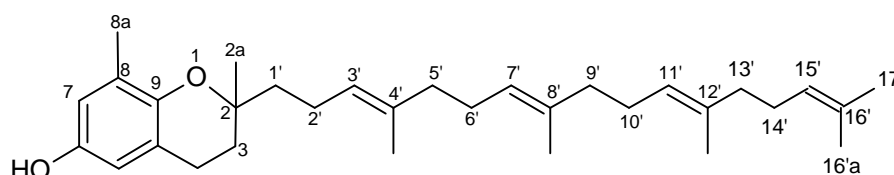


**Figura 37. Composto 2a, derivado semi-sintético do composto CP2.**

A obtenção do derivado **2a** (Figura 37, p. 100) diminuiu o potencial da atividade em *Leishmania*, enquanto a presença do grupo carboxílico (**CP2**) se mostrou favorável à atividade (Tabela 6, p. 61).

### 5.3.3. Composto CP3

O fracionamento do grupo G-19 em CLAE (Figura 28, p. 90) permitiu a obtenção do composto nomeado **CP3**, que após análises espectrométricas foi identificado como  $\delta$ -tocotrienol (Figura 38, p. 101).



**Figura 38. Estrutura do  $\delta$ -tocotrienol (CP3).**

O composto **CP3**, de nomenclatura sistemática 2H-1-Benzopiran-6-ol,3,4-dihidro-2,8-dimetil-2-(4,8,12,16-tetrametil-3,7,11,15-heptadeca-tetraen-1-il), foi registrado em patente como produto de síntese (Yamamoto *et al.*, 1984), sem relatos de obtenção natural.

A fórmula molecular de **CP3**,  $C_{32}H_{48}O_2$ , foi estabelecida a partir do espectro de massas. Foi obtido  $m/z$  465,2649, operando no modo positivo  $[M+H]^+$  (Figura 39, p. 102). A partir da interpretação da ionização da molécula (Figura 40, p. 102), o valor  $m/z$  177,0929, referente à presença do fragmento cromanol, foi possível sugerir tratar-se de mais uma substância do grupo dos  $\delta$ -tocotrienóis.

Nos testes de avaliação do potencial leishmanicida não foi observada atividade para o composto **CP3** abaixo de 100  $\mu\text{g/mL}$  em amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em relação à capacidade dessa substância em causar danos celulares a macrófagos murinos nos ensaios de citotoxicidade, notou-se que

não houve efeito tóxico para a célula na maior concentração testada, isto é, a 200 µg/mL.

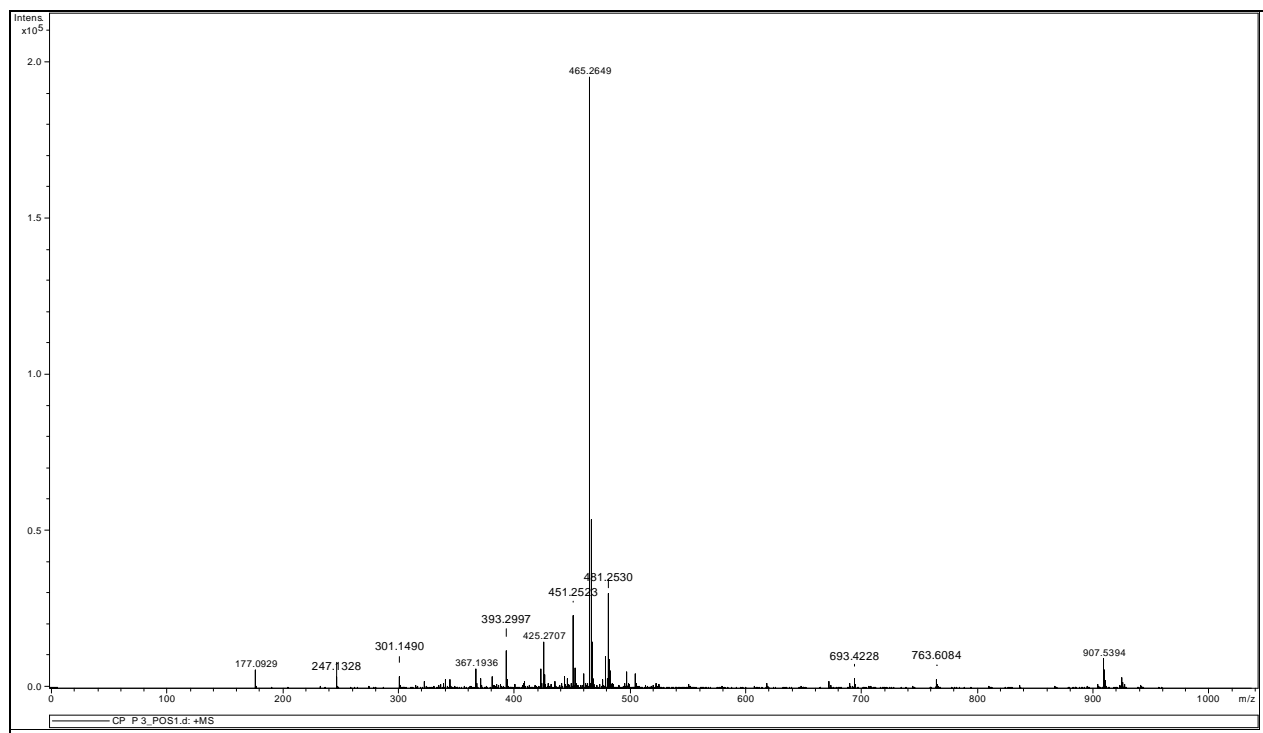


Figura 39. Espectro de massas do composto CP3 em alta resolução ESI-MS em modo positivo  $[M+H]^+$ .

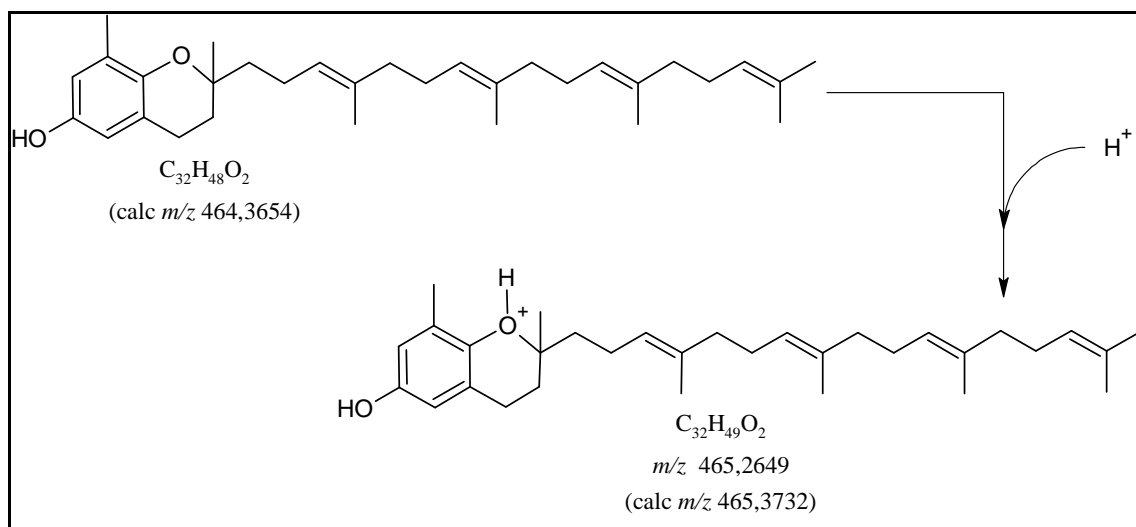
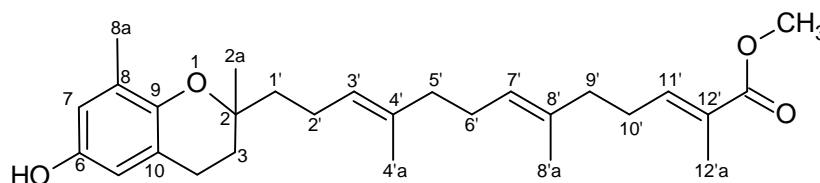


Figura 40. Proposta de mecanismo de ionização do composto CP3 em espectrometria de massas.

### 5.3.4. Composto CP4

O fracionamento do grupo G-19 em CLAE (Figura 28, p. 90) permitiu o isolamento do composto nomeado **CP4**, que após análises espectrométricas foi identificado como sendo o  $\delta$ -tocotrienol-metil-éster (Figura 41, p. 103).



**Figura 41. Estrutura do  $\delta$ -tocotrienol-metil-éster (CP4).**

A fórmula molecular de **CP4** é  $C_{28}H_{40}O_4$ , de nomenclatura sistemática  $\delta$ -tocotrienol-metil-éster ou ácido 2,6,10-tridecatrienóico,13-(3,4-dihidro-6-metóxi-2,8-dimetil-2H-1-benzopiran-2-il)-2,6,10-trimetil-, metil éster. A presença desse composto em fonte natural ainda não havia sido relatada. A literatura descreve a molécula como produto obtido de síntese (Delle Monache *et al.*, 1984, Terashima *et al.*, 2002).

A análise por espectrometria de massas em modo positivo  $[M+H]^+$  obteve razão  $m/z$  441,2631 para a molécula protonada (Figura 42 e Figura 43, p.104), possibilitando propor a fórmula molecular  $C_{28}H_{40}O_4$ .

A semelhança observada do espectro de massas do composto **CP4** com os espectros dos compostos anteriores permitiu demonstrar a estrutura de um tocotrienol com um éter metílico em  $C_{13}$ .



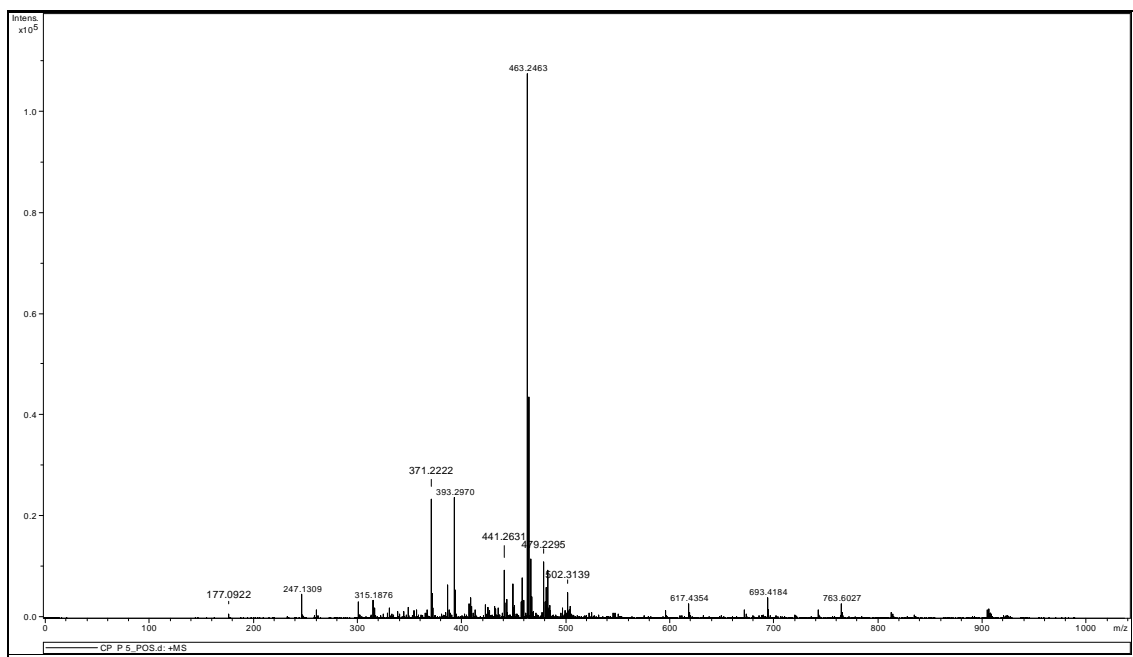


Figura 42. Espectro de massas do composto CP4 em alta resolução ESI-MS em modo positivo  $[M+H]^+$ .

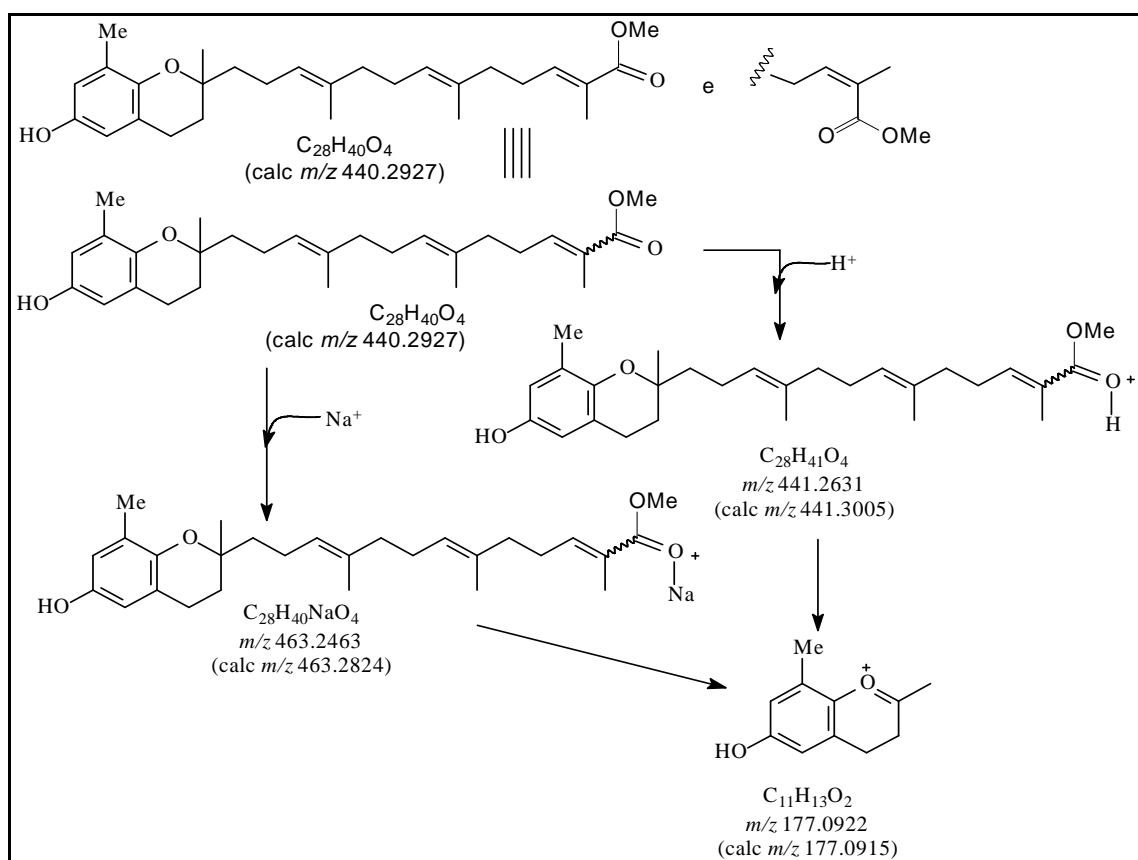
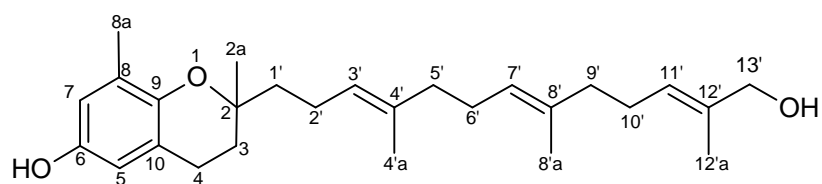


Figura 43. Proposta de mecanismo de ionização do composto CP4 em espectrometria de massas.

Avaliando o efeito citotóxico de **CP4** em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/C (Tabela 6, p. 61), foi observado que este composto apresentou concentração responsável por cinquenta por cento da citotoxicidade igual a 78,04 µg/mL. Na verificação da atividade leishmanicida, abaixo de 100 µg/mL não houve inibição significativa do parasito.

### 5.3.5. Composto CP5

O fracionamento do grupo G-19 em CLAE permitiu o isolamento do composto nomeado **CP5**, que após análises espectrométricas foi identificado como álcool  $\delta$ -tocotrienólico (Figura 44, p. 106).



**Figura 44. Estrutura do álcool  $\delta$ -tocotrienólico (CP5).**

A fórmula molecular de **CP5** é  $C_{27}H_{40}O_3$ , de nomenclatura sistemática *2H*-1-benzopirano-6-ol, 3,4-dihidro-2-[(3*E*,7*E*,11*E*)-13-hidróxi-4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrien-1-il]-2,8-dimetil. Este composto ainda não havia sido descrito nessa espécie.

O espectro de RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ) (Figura 45, p. 107) apresentou 27 linhas espectrais. Foram observadas 6 linhas relativas a carbonos aromáticos ( $\delta$  147,80; 145,97; 127,35; 121,23; 115,69 e 112,63) e 3 linhas de carbonos heterocíclicos pertencentes ao anel benzopirano ( $\delta$  75,34; 31,44 e 22,50). Foram observados ainda sinais correspondentes ao grupo farnesilo ( $\delta$  144,89; 134,98; 133,71; 127,03; 125,23; 124,51; 39,62; 38,05; 27,55; 26,51; 22,19; 16,05; 15,97 e 12,08). Com o suporte dos dados de  $^{13}C$  DEPT 135° (Figura 46, p. 108), foram observados 5 carbonos metílicos ( $CH_3$ ), 9 metilênicos ( $CH_2$ ), 5 metínicos ( $CH$ ) e 8 não-hidrogenados ( $C$ ) (Tabela 13, p. 108). O deslocamento químico do grupo metílico em  $C_{12'a}$ , que mostrou efeito  $\gamma$

protetor do carbono metilênico em C<sub>10'</sub>, permitiu definir a estereoquímica da carboxila em C<sub>13'</sub>.

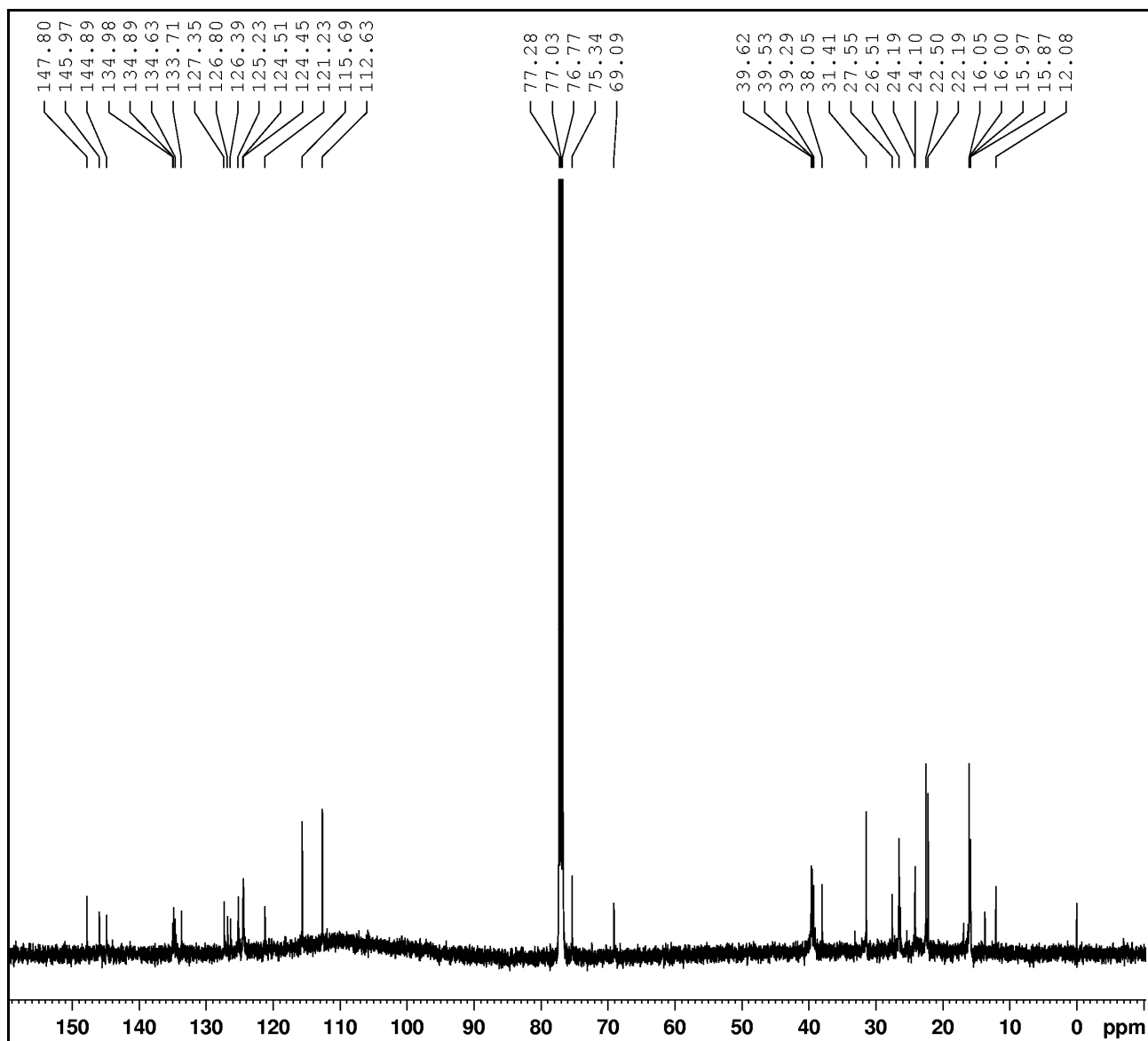


Figura 45. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto CP5 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

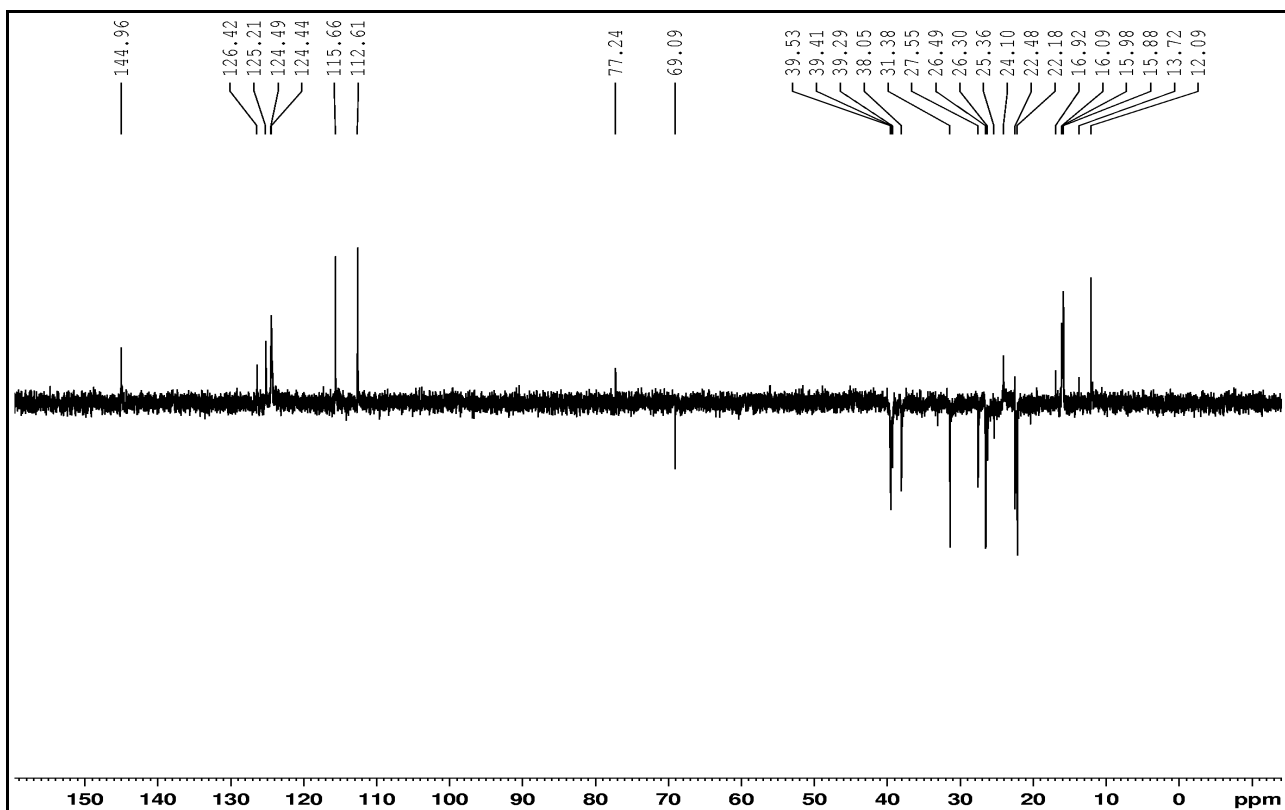


Figura 46. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT  $135^\circ$  do composto CP5 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  para CP5.

C		CH		CH <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub>	
2	75,34	5	112,63	3	31,44	2a	25,19
6	147,80	7	115,69	4	22,50	8a	16,05
8	127,35	3'	124,51	1'	39,62	4'a	15,97
9	145,97	7'	125,23	2'	22,19	8'a	16,00
10	121,23	5	112,63	5'	39,53	12'a	12,08
4'	134,98			6'	26,51		
8'	133,71			9'	38,05		
12'	126,80			10'	27,55		
				12'b	69,09		
8 C		5 CH		9 CH <sub>2</sub>		5 CH <sub>3</sub>	

A análise do espectro  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  - HSQC (Figura 47, p 109) permitiu associar cada hidrogênio ao seu respectivo carbono, enquanto o espectro de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  - HMBC (Figura 48, p. 110) mostrou as correlações entre hidrogênios e carbonos a 2 e 3 ligações.

O espectro COSY de **CP5** (Figura 49, p. 111) possibilitou a identificação dos acoplamentos entre hidrogênios.

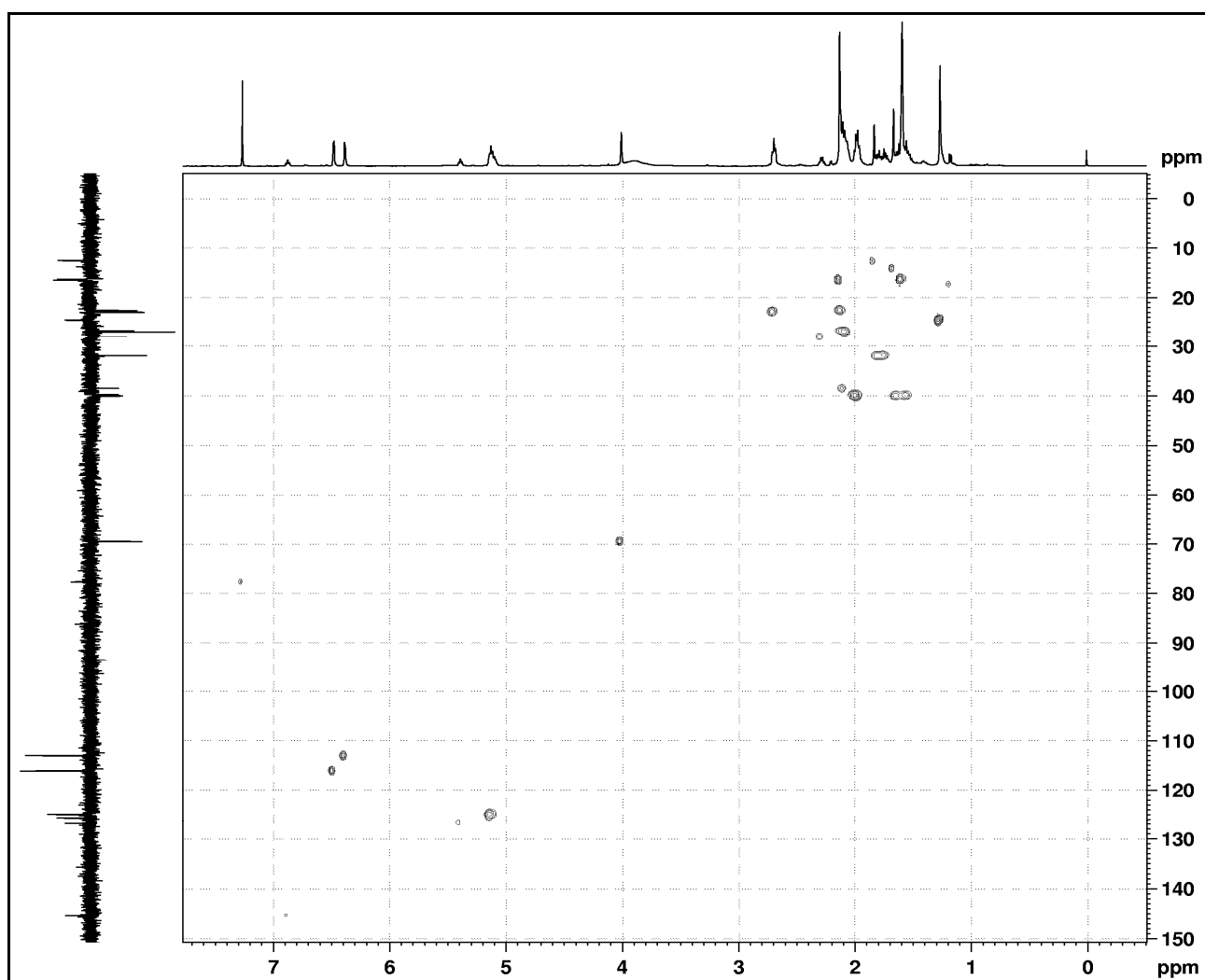


Figura 47. Espectro HSQC do composto CP5.

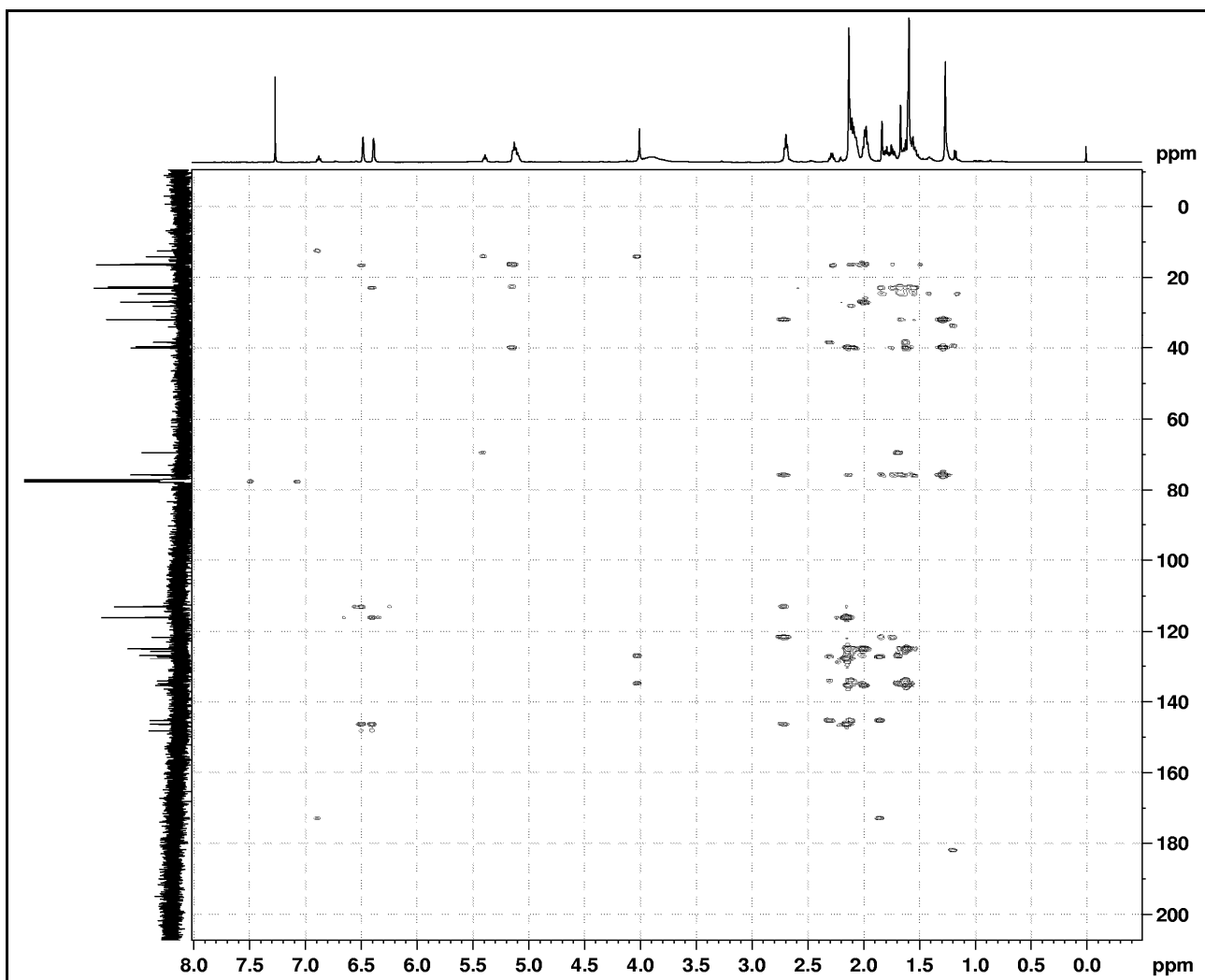


Figura 48. Espectro HMBC do composto CP5.

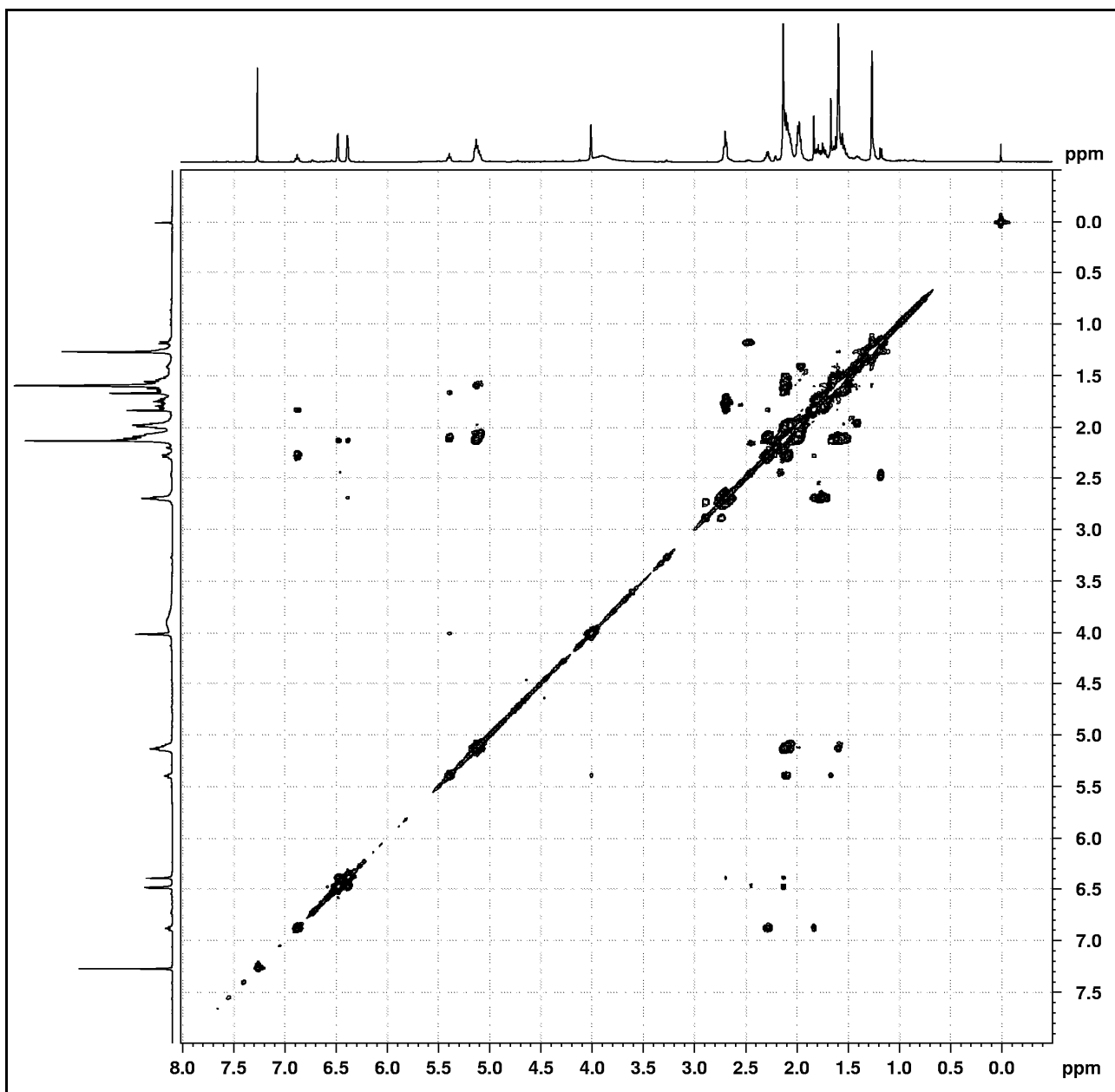


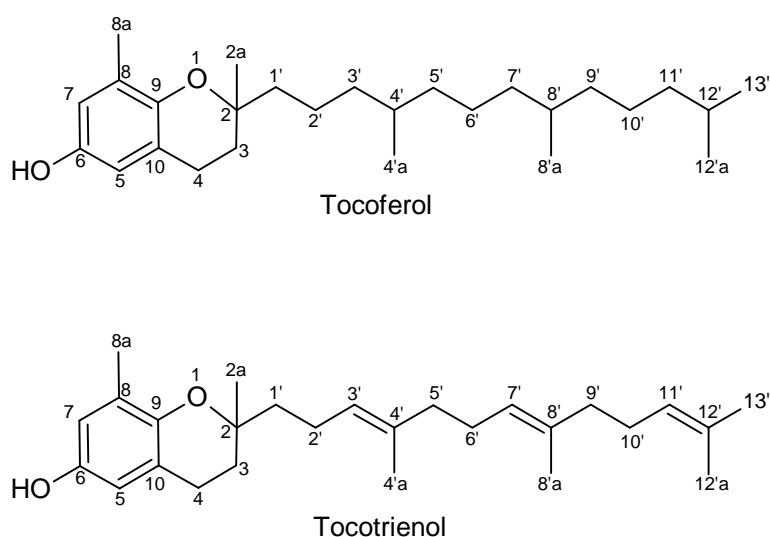
Figura 49. Espectro COSY do composto CP5.



Investigando a atividade de **CP5**, notou-se que não houve capacidade do composto em inibir satisfatoriamente a infecção de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos. Nos ensaios de citotoxicidade, não foram observados danos celulares nas concentrações testadas de 5 a 200 µg/mL.

### 5.3.6. Tocotrienóis

Em relação à biossíntese de tocotrienóis, existem oito substâncias produzidas na natureza que são incluídas no grupo das vitaminas E. São quatro tipos de tocoferol e quatro tipos de tocotrienol (Figura 50, p. 112), cada um classificado como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , dependendo do número e posição de metilas substituintes no anel aromático. É possível observar que esses compostos possuem uma unidade cromanol, composta por dois anéis, ligada a uma cadeia saturada de dezesseis carbonos (Therriault *et al.*, 1999).



**Figura 50. Estrutura geral de tocoferóis e tocotrienóis.**

Os tocotrienóis diferem pela presença de três dupla-ligações na cadeia lateral de hidrocarbonetos, compreendendo uma unidade farnesil, ou seja, a

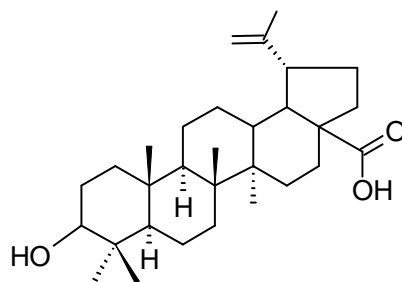
condensação de três isoprenos. Estes compostos são todos anfipáticos, em que a cadeia reduz a polaridade da estrutura, enquanto a unidade cromanol confere maior caráter polar (Sen *et al.*, 2006).

Para avaliação do potencial leishmanicida, foram testados quatro tocotrienóis isolados, com resultados de  $CI_{50} = 77,3 \mu\text{g/mL}$  para o ácido Z- $\delta$ -tocotrienolóico (**CP2**), enquanto os compostos **CP3**, **CP4** e **CP5**, juntamente com o composto **2a**, derivado do ácido Z- $\delta$ -tocotrienolóico, não apresentaram ação leishmanicida abaixo de  $100 \mu\text{g/mL}$ . Apenas o composto **CP4** causou menor viabilidade em células de mamíferos, com  $CC_{50} = 78,04 \mu\text{g/mL}$ . Os outros tocotrienóis não reduziram a viabilidade celular abaixo de  $200 \mu\text{g/mL}$ . Ou seja, o efeito citotóxico dos tocotrienóis não foi observado, exceto o composto **CP4**, sugerindo que o grupo metil-éster da molécula pode estar relacionado a danos na célula de mamífero avaliada.

O grupo químico dos tocotrienóis ainda não havia tido seu potencial de atividade relatado para *Leishmania*. A busca por publicações sobre tocotrienóis e protozoários na literatura também não obteve nenhum resultado, tornando interessante o fato da atividade antiprotozoária dessas substâncias não ter sido analisada ou publicada até esse trabalho.

#### 5.4. COMPOSTO CP6

O grupo G-18 foi recristalizado com  $\text{CHCl}_3$  para obtenção de um material insolúvel branco cristalino. A partir dos dados de RMN  $^1\text{H}$ , esse precipitado foi identificado como ácido betulínico, cuja fórmula molecular é  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$ , (Figura 51, p. 114), ou ácido lup-20(29)-en-28-óico,  $3\beta$ -hidróxi, de acordo com comparações dos deslocamentos químicos disponíveis na literatura (Bruckner *et al.* 1948, Pacharoen *et al.*, 1994) e os dados experimentais.



**Figura 51. Estrutura química do ácido betulínico, isolado a partir do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis*.**

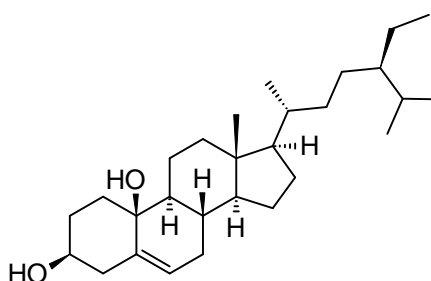
Nos testes biológicos, foi observado que o ácido betulínico não apresentou atividade em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os resultados de citotoxicidade não mostraram efeito do composto sobre a viabilidade celular de macrófagos.

Dominguez-Carmona *et al.* (2010) avaliaram o ácido betulínico e quatro derivados semi-sintéticos em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. O composto original apresentou valor de  $\text{CI}_{50} > 200 \mu\text{M}$ . Porém, a esterificação do ácido carboxílico, com oxidação da carboxila a cetona ou éster, conferiu maior atividade leishmanicida, com  $\text{CI}_{50}$  variando entre 44,9 e 69,9  $\mu\text{M}$ .

Em outro trabalho, a obtenção de uma série de produtos semi-sintéticos a partir do ácido betulínico permitiu encontrar um composto com  $CI_{50} = 8,9 \mu\text{M}$  em formas amastigotas de *L. donovani* (Alakurtti *et al.*, 2010). Um dos modos de ação de derivados da betulina em *L. donovani* envolve a inibição de topoisomerase IB, que pertence a uma família de enzimas que atuam no DNA em processos vitais para a célula (Chowdhury *et al.*, 2011).

### 5.5. COMPOSTO CP7

A partir do grupo G-18 foi também isolado um material cristalino. Foram obtidos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e os deslocamentos químicos foram comparados com valores apresentados na literatura. Assim, foi identificado estigmast-5-en-3 $\beta$ -ol (**CP7**), conhecido como  $\beta$ -sitosterol (Jares *et al.*, 1990), com fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_2$  (Figura 52, p. 116).



**Figura 52. Estrutura química do  $\beta$ -sitosterol, isolado a partir do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis*.**

A avaliação desse composto em promastigotas de *L. tarentolae* não observou atividade abaixo de 40  $\mu\text{M}$  (Graziose *et al.*, 2012). Em formas promastigotas de *L. chagasi*, o  $\beta$ -sitosterol apresentou  $\text{CI}_{50} = 103,2 \mu\text{g/mL}$  (Albernaz *et al.*, 2011).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitiram primeiramente conhecer a atividade de cinco extratos de plantas do bioma Cerrado em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e analisar a citotoxicidade de cada um em fibroblastos da linhagem NIH-3T3. A atividade do extrato bruto, a citotoxicidade moderada, as informações em bases de dados científicas aliadas aos relatos do uso etnofarmacológico de espécies do gênero para leishmaniose cutânea determinaram a seleção do extrato acetato de etila da casca do caule de *Clusia pernambucensis*.

Foi isolada e amplamente caracterizada a clusioxantona (**CP1**), não relatada previamente, juntamente com uma série de quatro tocotrienóis, ácido Z- $\delta$ -tocotrienólico (**CP2**),  $\delta$ -tocotrienol (**CP3**),  $\delta$ -tocotrienol-metil-éster (**CP4**) e álcool  $\delta$ -tocotrienólico (**CP5**), ainda não descritos nessa espécie, além de dois compostos ubiqüitários em plantas (**CP6** e **CP7**). Os compostos **CP3** e **CP4** foram isolados pela primeira vez de fonte natural.

A avaliação dos compostos em amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* permitiu caracterizar a ação da clusioxantona (**CP1**), que poderá servir de subsídio para a proposição de derivados, a fim de explorar o potencial de desenvolvimento do composto natural. Além de apresentar a atividade de moléculas isoladas de *Clusia pernambucensis*, ainda foi possível avançar o estudo, com a semi-síntese do composto **1a**, cuja estrutura não havia sido descrita anteriormente, a partir de **CP1**. Foram observados o potencial de atividade leishmanicida e a toxicidade *in vitro* de **1a** em relação à xantona original.

A obtenção do derivado **2a** a partir do composto **CP2** não resultou em incremento da atividade leishmanicida. A ausência de efeitos citotóxicos nas concentrações avaliadas também não foi alterada pela adição de duas metilas na molécula.

As substâncias purificadas tiveram seu perfil de toxicidade investigado em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/C. Os tocotrienóis **CP2**, **CP3** e **CP5** não apresentaram citotoxicidade. Essa é uma informação importante na perspectiva de caracterizar esses compostos como agentes ativos em outros modelos biológicos.

## 7. PERSPECTIVAS

- Continuar o estudo da espécie *Clusia pernambucensis*
- Obter outros derivados da clusioxantona a fim de aumentar a atividade leishmanicida
- Avaliar a toxicidade dos compostos isolados e semi-sintéticos em outras linhagens de células de mamíferos
- Avaliar a atividade de clusioxantona e seus derivados em modelo experimental de leishmaniose cutânea com uso tópico

Tendo em vista a estratégia de continuar buscando compostos ativos a partir do potencial químico vegetal do bioma Cerrado, a espécie *Clusia pernambucensis* será estudada mais detalhadamente. Trata-se de uma planta típica do Cerrado e com dados químicos escassos, por isso é possível contribuir significativamente para melhor compreensão de suas possibilidades biotecnológicas.

Paralelamente, a obtenção de derivados semi-sintéticos e análogos da clusioxantona permitirá realizar análises de relação estrutura-atividade. Essas informações são importantes para definir, de maneira mais concreta, o direcionamento desse composto nas fases de desenvolvimento de fármacos.

Outro parâmetro a ser considerado é a citotoxicidade dos compostos testados em várias linhagens de células de mamíferos, visando ter um panorama mais completo dos efeitos nocivos, com determinação da seletividade em relação ao parasito.

Nosso grupo de pesquisa vislumbra o desenvolvimento de uma



formulação tópica em um modelo experimental de leishmaniose cutânea. Nessa perspectiva, a incorporação da clusiaxantona em uma matriz poderá ser testada, evitando os efeitos tóxicos sistêmicos observados frequentemente em medicamentos de escolha disponíveis atualmente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR MG, PEREIRA AMM, FERNANDES AP, FERREIRA LAM. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010; 54: 4699-4704.

AISSA I, SGHAIR R, BOUAZIZ M, LAOUINI D, SAYADI S, GARGOURI Y. Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmania activities. **Lip Health Dis.** 2012; 11: 13.

ALAKURTTI S, HEISKA T, KIRIAZIS A, SACERDOTI-SIERRA N, JAFFE CL, YLI-KAUHALUOMA J. Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives. **Bioorg Med Chem.** 2010; 18: 1573–1582.

ALBERNAZ LC, DEVILLE A, DUBOST L, DE PAULA JE, BODO B, GRELLIER P, ESPINDOLA LS, MAMBU L. Spiranthenones A and B, tetraprenylated phloroglucinol derivatives from the leaves of *Spiranthera odoratissima*. **Planta Med.** 2011; 78: 1-6.

ALVAR J, CROFT S, OLLIARO P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Adv Parasitol.** 2006; 61: 223–74.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol.** 2010; 35: 699–705.

ANTINORI S, SCHIFANELLA L, COBERLINO M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2012; 31: 109–118.

AUDISIO D, MESSAOUDI S, COJEAN S, PEYRAT J-F, BRION J-D, BORIES C, HUTEAU F, LOISEAU PM, ALAMI M. Synthesis and antikinetoplastid activities of 3-substituted quinolinones derivatives. **Eur J Med Chem.** 2012; 52: 44-50.

AZEBAZE AGB, OUAHOUBO BMW, VARDAMIDES JC, VALENTIN A, KUETE V, ACEBEY L, BENG VP, NKENGFAK AE, MEYER M. Antimicrobial and antileishmanial xanthenes from the stem bark of *Allanblackia gabonensis*. **Chem Nat Compd.** 2008; 44: 582-587.

BAGGETT S, MAZZOLA EP, KENNELLY EJ. The benzophenones isolation, structural elucidation and biological activities. **S Nat Prod Chem.** 2005; 32: 721-771.

BENIDDIR MA, GRELLIER P, RASOANAIVO P, LOISEAU PM, BORIES C, DUMONTET V, GUÉRITTE F, LITAUDON M. Diarylheptanoid glucosides from *Pyrostria major* and their antiprotozoal activities. **Eur J Org Chem.** 2012; 5: 1039-1046.

BERMAN J, BRYCESON AD, CROFT S, ENGEL J, GUTTERIDGE W, KARBWANG J, SINDERMANN H, SOTO J, SUNDAR S, URBINA JA. Miltefosine: issues to be addressed in the future. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2006; 100: S41-S44.

BHAUMIK SK, PAUL J, NASKAR K, KARMAKAR S, DE T. Asiaticoside induces tumour-necrosis-factor- $\alpha$ -mediated nitric oxide production to cure experimental visceral leishmaniasis caused by antimony-susceptible and -resistant *Leishmania donovani* strains. **J Antimicrob Chemother.** 2012; 67: 910-920.

BORBOREMA SET, SHWENDENER RA, OSSO-JUNIOR JA, ANDRADE-JUNIOR HF, NASCIMENTO N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania (Leishmania) major* infected macrophages. **Int J Antimicrob Agents.** 2011; 38: 341-347.

BORIES C, COJEAN S, HUTEAU F, LOISEAU PM. Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani* **Biomed Pharmacother.** 2008; 62: 164-167.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos> Acesso em 10/07/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006, 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – 2 ed Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007, 180 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/> Acesso em 2010.

BRENDLE JJ, OUTLAW A, KUMAR A, BOYKIN DW, PATRICK DA, TIDWELL RR, WERBOVETZ KA. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002; 46: 797-807.

BRENZAN MA, SANTOS AO, NAKAMURA CV, FILHO BPD, UEDA-NAKAMURA T, YOUNG MCM, CÔRREA AG, JÚNIOR JA, MORGADO-DÍAZ JA, CORTEZ DAG. Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. **Phytomedicine.** 2012; 19: 223-230.

BRUCKNER V, KOVACS J, KOCZKA I. Occurrence of betulinic acid in the bark of the plane tree. **J. Chem. Soc.** 1948; 1: 948-951.

CABALLERO AB, MARÍN C, RAMÍREZ-MACÍAS I, RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ A, QUIRÓS M, SALAS JM, SÁNCHEZ-MORENO M. Structural consequences of the introduction of 2,2'-bipyrimidine as auxiliary ligand in triazolopyrimidine-based transition metal complexes. *in vitro* antiparasitic activity. **Polyhedron.**

2012; 33: 137-144.

CALDERON, LA; SILVA-JARDIM I; ZULIANI JP, SILVA AA, CIANCAGLINI P, SILVA LHP, STÁBELI RG. Amazonian biodiversity: A view of drug development for leishmaniasis and malaria. **J Braz Chem Soc.** 2009; 20: 1011-1023.

CAMINOS AP, PANOZZO-ZENERE EA, WILKINSON SR, TEKWANI BL, LABADIE GR. Synthesis and antikinoplastid activity of a series of N,N-substituted diamines. **Bioorg Med Chem Lett.** 2012; 22: 1712-1715.

CARVALHO GML, ANDRADE FILHO JD, FALCÃO AL, LIMA ACVMR, GONTIJO CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Dis.** 2008; 8: 407-414.

CHATURVEDULA VS, SCHILLING JK, KINGSTON DG. New cytotoxic coumarins and prenylated benzophenone derivatives from the bark of *Ochrocarpos punctatus* from the Madagascar rainforest. **J Nat Prod.** 2002; 65: 965-972.

CHAWLA B, JHINGRAN A, PANIGRAHI A, STUART KD, MADHUBALA R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin – susceptible –resistant *Leishmania donovani*. **PLoS ONE.** 2011; 6: e26660.

CHEDIER LM, DE PAIVA SR, DA COSTA JLM, FIGUEIREDO MR, KAPLAN MAC. Comparative methodology for isolation of flavonoid glycosides from *Clusia criuva* Cambess. **J H Res Chrom.** 1999; 22: 527-530.

CHEIKH-ALI Z, OKPEKON T, ROBLLOT F, BORIES C, CARDAO M, JULLIAN J-C, POUPON E, CHAMPY P. Labdane diterpenoids from *Aframomum sceptrum*: NMR study and antiparasitic activities. **Phytochemistry Lett.** 2011; 4: 240-244.

CHOWDHURY S, MUKHERJEE T, SENGUPTA S, CHOWDHURY SR, MUKHOPADHYAY S, MAJUMDER HK. Novel betulin derivatives as antileishmanial agents with mode of action targeting type IB DNA topoisomerase. **Mol Pharmacol.** 2011; 80: 694-703.

COMPAGNONE RS, SUAREZ AC, LEITÃO SG, DELLE MONACHE F. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris*. **Braz J Pharmacogn.** 2008; 18: 6-10.

COTA BB, DE OLIVEIRA DM, DE SIQUEIRA EP, SOUZA-FAGUNDES EM, PIMENTA AMC, SANTOS DM, RABELLO A, ZANI CL. New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. **Fitoterapia.** 2011; 82: 969-975.

CROFT SL, OLLIARO P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect.** 2011; 17: 1478-1483.

CUNHA ADC, CHIERRITO TPC, MACHADO GMDC, LEON LLP, SILVA CCD, TANAKA JC, SOUZA LMD, GONÇALVES RAC, OLIVEIRA AJBD. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine.** 2012; 19: 413-417.

DAVID CV, CRAFT N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther.** 2009; 22: 491–502.

DAVID JP, MEIRA M, DAVID JM, GUEDES MLS. Triterpenes and alkylferulates from *Maprounea*. **Química Nova.** 2004; 27: 62–65.

DE PAULA JE, COSTA KP. Densidade da madeira de 932 espécies nativas do Brasil. Ed Cinco Continentes, Porto alegre, 248 p., 2011.

DECUYPERE S, VANAERSCHOT M, BRUNKER K, IMAMURA H, MÜLLER S, KHANAL B, RIJAL S, DUJARDIN J, COOMBS GH. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012; 6: e1514.

DELLE MONACHE FD, MARTA M, MAC-QUHAE MM, NICOLETTI M. Two new tocotrienoloic acids from *Clusia grandiflora* Splith Gazz. **Chim Italiana.** 1984; 114: 135-137.

DEN BOER M, ARGAW D, JANNIN J, ALVAR J. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin Microbiol Infect.** 2011; 17: 1471-1477.

DÍAZ-CARBALLO D, MALAK S, BARDENHEUER W, FREISTUEHLER M, REUSCH HP. Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. **J Cel Mol Med.** 2008; 12: 2598-2608.

DÍAZ-CARBALLO D, UEBERLA K, KLEFF V, ERGUN S, MALAK S, FREISTUEHLER M, SOMOGYI S, KÜCHERER C, BARDENHEUER W, STRUMBERG D. Antiretroviral activity of two polyisoprenylated acylphloroglucinols, 7-epi-nemorosone and plukenetione A, isolated from Caribbean propolis. **Int J Clin Pharm Ther.** 2010; 48: 670-677.

DOMÍNGUEZ-CARMONA DB, ESCALANTA-EROSA F, GARCÍA-SOSA K, RUIZ-PINELL G, GUTIERREZ-YAPU D, CHAN-BACAB MJ, GIMENEZ-TURBA A, PEÑA-RODRÍGUEZ LM. Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. **Phytomedicine,** 2010; 17: 379-382.

DOS SANTOS AO, BRITTA EA, BIANCO EM, UEDA-NAKAMURA T, DIAS FILHO BP, PEREIRA RC, NAKAMURA CV. 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Mar Drugs.** 2011; 9: 2369-2383.

DOS SANTOS, MS, OLIVEIRA MLV, BERNARDINO AMR, DE LÉO RM, AMARAL VF, DE CARVALHO FT, LEON LL, CANTO-CAVALHEIRO MM. Synthesis and antileishmanial evaluation of 1-aryl-4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-1H-pyrazole derivatives. **Bioorg Med Chem Lett.** 2011; 21: 7451-7454.

Drugs for Neglected Diseases (DNDi). <http://www.dndi.org/pt/centro-de-documentacao/dndi-na-imprensa/215-10072009-um-seculo-a-espera-de-cura.html> Acesso em 20/05/2012.

DUA VK, VERMA G, DASH AP. In vitro antiprotozoal activity of some

xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*. **Phytother Res.** 2009; 23: 126-128.

DUJARDIN J, GONZÁLEZ-PACANOWSKA D, CROFT SL, OLESEN OF, SPÄTH GF. Collaborative actions in anti-trypanosomatid chemotherapy with partners from disease endemic areas. **Trends Parasitol.** 2010; 26: 395-403.

DÜRÜST Y, KARAKU H, KAISER M, TASDEMIR D. Synthesis and anti-protozoal activity of novel dihydropyrrolo[3,4-d][1,2,3] triazoles. **Eur J Med Chem.** 2012; 48: 296-304.

DUTTA S, ONGARORA BG, LI H, DA VICENTE MGH, KOLLI BK, CHANG KP. Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. **PLoS ONE.** 2011; 6: e20786.

EJARA ED, LYNEN L, BOELAERT M, GRIENSVEN JV. Challenges in HIV and visceral *Leishmania* co-infection: future research directions. **Trop Med Int Health.** 2010; 15: 1266-1267.

EL-SEEDI HR, EL-BARBARY MA, EL-GHORAB DMH, BOHLIN L, BORG-KARLSON A, GORANSSON U, VERPOORTE R. Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthenes. **Curr Med Chem.** 2010; 17: 854-901.

EL-SEEDI HR, EL-GHORAB DMH, EL-BARBARY MA, ZAYED MF, GORANSSON U, BOHLIN L, LARSON S, VERPOORTE R. Naturally occurring xanthenes; Latest investigations: Isolation, structure elucidation, and chemosystematic significance **Curr Med Chem.** 2009; 16: 2581-2626.

ERFE MCB, DAVID CV, HUANG C, LU V, MARETTI-MIRA AC, HASKELL J, BRUHN KW, YEAMAN MR, CRAFT N. Efficacy of synthetic peptides RP-1 and AA-RP-1 against *Leishmania* species *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2012; 56: 658-665.

FERREIRA C, SOARES DC, BARRETO-JUNIOR CB, NASCIMENTO MT, FREIRE-DE-LIMA L, DELORENZI JC, LIMA MEF, ATELLA GC, FOLLY E, CARVALHO TMU, SARAIVA EM, PINTO-DA-SILVA LH. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry.** 2011; 72: 2155-2164.

FRANÇA-COSTA J, WANDERLEY JLM, DEOLINDO P, ZARATTINI JB, COSTA J, SOONG L, BARCINSKI MA, BARRAL A, BORGES VM. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS ONE.** 2012; 7: e36595.

GANGWAR S, BAIG MS, SHAH P, BISWAS S, BATRA S, SIDDIQI MI, GOYAL N. Identification of novel inhibitors of dipeptidylcarboxypeptidase of *Leishmania donovani* via ligand-based virtual screening and biological evaluation. **Chem Biol Drug Des.** 2012; 79: 149-156.

GARNIER T, MÄNTYLÄ A, JÄRVINEN T, LAWRENCE J, BROWN M, CROFT S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. **J Antimicrob Chem.** 2007; 60: 802-810.

GLOBAL FORUM FOR HEALTH RESEARCH 2004, Genebra **The 10/90 Report on Health Research, 2003–2004**, 2004.

GODINHO JLP, SIMAS-RODRIGUES RS, URMENYI TP, SOUZA W, RODRIGUES JCF. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **Int J Antimicrob Ag.** 2012; 39: 326-331.

GOLENSER J, DOMB A. New formulations and derivatives of Amphotericin B for treatment of leishmaniasis. **Mini-Rev Med Chem.** 2006; 6: 153-162.

GRAZIOSE R, ROJAS-SILVA P, RATHINASABAPATHY T, DEKOCK C, GRACE MH, POULEV A, ANN-LILA M, SMITH P, RASKIN I. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. **J Ethnopharmacol.** 2012; 142: 456-461.

GRECCO SDS, REIMÃO JQ, TEMPONE AG, SARTORELLI P, CUNHA RLOR, ROMOFF P, FERREIRA MJP, FÁVERO OA, LAGO JHG. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC (Asteraceae). **Exp Parasitol.** 2012; 130: 141-145.

HAREL D, KHALID SA, KAISER M, BRUN R, WÜNSCH B, SCHMIDT TJ. Encecalol angelate, an unstable chromene from *Ageratum conyzoides* L.: total synthesis and investigation of its antiprotozoal activity. **J Ethnopharmacol.** 2011; 137: 620-625.

HOOKER JD, NGUYEN VH, TAYLOR VM, CEDEÑO DL, LASH TD, JONES MA, ROBLEDO SM, VÉLEZ ID. New application for expanded porphyrins: Sapphyrin and heterosapphyrins as inhibitors of *Leishmania* parasites. **Photochem Photobiol.** 2012; 88: 194-200.

HOTEZ PJ, MOLYNEUX DH, FENWICK A, KUMARESAN J, SACHS ES, SACHS JD, SAVIOLI L. Control of neglected tropical diseases **New Eng J Med.** 2007; 357: 1018-1027.

HUERTA-REYES M, BASUALDO MD, LOZADA L, JIMENEZ-ESTRADA M, SOLER C, REYES-CHILPA R. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. **Biol Pharm Bull.** 2004; 27: 916-920.

IBRAHIM HMS, AL-SALABI MI, SABBAGH NE, QUASHIE NB, ALKHALDI AAM, ESCALE R, SMITH TK, VIAL HJ, DE KONING HP. Symmetrical choline-derived dications display strong anti-kinetoplastid activity. **J Antimicrob Chemother.** 2011; 66: 111-125.

IOSET JR, BRUN R, WENZLER T, KAISER M, YARDLEY V. Drug Screening for Kinetoplastid Diseases. **DNDi and Pan-Asian Screening Network.** 2009; 74p. Disponível em: [www.dndi.org](http://www.dndi.org). Acesso em 20/12/2010.

JARES EA, TETTAMANZI MC, POMILIO AB. Sitosterol 3-O- $\beta$ -d-

glucuronopyranoside from *Senecio bonariensis*. **Phytochemistry**. 1990; 29: 340-341.

KATO L, DE OLIVEIRA CMA, FARIA EO, RIBEIRO LC, CARVALHO BG, SA SILVA CC, SCHUQUEL ITA, SANTIN SMO, NAKAMURA CV, BRITTA EA, MIRANDA N, IGLESIAS AH, DELPRETE PG. Antiprotozoal alkaloids from *Psychotria prunifolia* (kunth) steyerem. **J Braz Chem Soc**. 2012; 23: 355-360.

KELLY JX, IGNATUSHCHENKO MV, BOUWER HG, PEYTON DH, HINRICHS DJ, WINTER RW, RISCOE M. Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency. **Mol Biochem Parasitol**. 2003; 126: 43-49.

KIRMIZIBEKMEZ H, ATAY I, KAISER M, BRUN R, CARTAGENA MM, CARBALLEIRA NM, YESILADA E, TASDEMIR D. Antiprotozoal activity of *Melampyrum arvense* and its metabolites. **Phytother Res**. 2011; 25: 142-146.

KLINK CA, MACHADO RBA. Conservação do Cerrado Brasileiro. **Megadiversidade**. 2005; 1: 147-155.

KOŁODZIEJ H, KIDERLEN AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitized RAW 2647 cells. **Phytochemistry**. 2005; 66: 2056–2071.

LACROIX D, PRADO S, KAMOGA D, KASENENE J, BODO B. Structure and in vitro antiparasitic activity of constituents of *Citropsis articulata* root bark. **J Nat Prod**. 2011; 74: 2286-2289.

LOISEAU PM, GUPTA S, VERMA A, SRIVASTAVA S, PURI SK, SLIMAN F, NORMAND-BAYLE M, DESMAELE D. *In vitro* activities of new 2-substituted quinolines against *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2011; 55: 1777-1780.

LOPES MS, DE SOUZA PIETRA RCC, BORGATI TF, ROMEIRO CFD, JÚNIOR PAS, ROMANHA AJ, ALVES RJ, SOUZA-FAGUNDES EM, FERNANDES APSM, DE OLIVEIRA RB. Synthesis and evaluation of the anti parasitic activity of aromatic nitro compounds. **Eur J Med Chem**. 2011; 46: 5443-5447.

LUCAS T, WAISMAN A, RANJAN R, ROES J, KRIEG T. Differential roles of macrophages in diverse phages of skin repair. **J Immunol**. 2010; 184: 3964–3977.

LUQUE-ORTEGA JR, RIVAS L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**. 2007; 51: 1327-1332.

MAAROUF M, DE KY, BROWN S, PETIT PX, ROBERT-GERO M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. **Exp Cell Res**. 1997; 232: 339–348.

MACHADO PR, AMPUERO J, GUIMARA LH, VILLASBOAS L, ROCHA AT, SCHRIEFER A, SOUSA RS, TALHARI A, PENNA G, CARVALHO EM.



Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**. 2010; 4: e912.

MARINHO AMR, MARINHO PSB, RODRIGUES FILHO E, FERREIRA ICP. Polyketides isolated from *Penicillium herquei*. **Eclat Quim**. 2011; 36: 38-45.

MARIZ, G. XXIII Congresso Nacional de Botânica. **Anais Soc Bot Brasil**. 1973; 23: 101.

MÉDECINS SANS FRONTIÈRES. Access to essential medicines campaign fatal imbalance: the crisis in research and development for drugs for neglected diseases. Médecins Sans Frontières, Geneva, 2001.

MONZOTE L, STAMBERG W, PATEL A, ROSENAU T, MAES L, COS P, GILLE L. Synthetic chromanol derivatives and their interaction with complex III in mitochondria from bovine, yeast and *Leishmania*. **Chem Res Toxicol**. 2011; 24: 1678-1685.

MONZOTE L, STAMBERG W, PATEL A, ROSENAU T, MAES L, COS P, GILLE L. Synthetic chromanol derivatives and their interaction with complex III in mitochondria from bovine, yeast, and *Leishmania*. **Chem Res Toxicol**. 2011; 24: 1678-1685.

MORAIS TR, ROMOFF P, FÁVERO OA, REIMÃO JQ, LOURENÇO WC, TEMPONE AG, HRISTOV AD, DI SANTI SM, LAGO JHG, SARTORELLI P, FERREIRA MJP. Anti-malarial, anti-trypanosomal, and anti-leishmanial activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell) Cuatrec (Asteraceae). **Parasitol Res**. 2012; 110: 95-101.

MORENO D, PLANO D, BAQUEDANO Y, JIMÉNEZ-RUIZ A, ANTONIO PALOP J, SANMARTÍN C. Antileishmanial activity of imidothiocarbamates and imidoselenocarbamates. **Parasitol Res**. 2011; 108: 233-239.

MOURA ACG, PERAZZO FF, MAISTRO EL. The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term *in vivo* assays. **Gen Mol Res**. 2008; 7: 1360-1368.

NATERA S, MACHUCA C, PADRÓN-NIEVES M, ROMERO A, DÍAZ E, PONTE-SUCRE. A *Leishmania* spp: proficiency of drug-resistant parasites. **Int J Antimicrob Agents**. 2007; 29: 637–642.

NETO RLM, SOUSA LMA, DIAS CS, FILHO JMB, OLIVEIRA MR, FIGUEIREDO RCBQ. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Exp Parasitol**. 2011; 127: 215-221.

NEVES DB, CALDAS ED, SAMPAIO RNR. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis – Relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. **Trop Med Int Health**. 2009; 14: 1515-1522.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod.** 2007; 70: 461-477.

NIETO L, MASCARAQUE A, MILLER F, GLACIAL F, RÍOS MARTÍNEZ C, KAISER M, BRUN R, DARDONVILLE C. Synthesis and antiprotozoal activity of n -alkoxy analogues of the trypanocidal lead compound 4,4'-bis(imidazolinylamino)diphenylamine with improved human blood-brain barrier permeability. **J Med Chem.** 2011; 54: 485-494.

NOËL F, PIMENTA PHC, DOS SANTOS AR, TOMAZ ECL, QUINTAS LEM, KAISER CR, SILVA CLM, FÉRÉZOU J-P.  $\Delta$  2,3 -Ivermectin ethyl secoester, a conjugated ivermectin derivative with leishmanicidal activity but without inhibitory effect on mammalian P-type ATPases. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 2011; 383: 101-107.

NWAKA S, HUDSON A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Rev Drug Discov.** 2006; 5: 941-955.

ODONNE G, BERGER F, STIEN D, GRENAND P, BOURDY G. Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): A KAP survey and analysis of the evolution of phytotherapy knowledge amongst Wayãpi indians. **J Ethnopharmacol.** 2011; 137: 1228-1239.

ODONNE G, BOURDY G, CASTILLO D, ESTEVEZ Y, LANCHA-TANGO A, ALBAN-CASTILLO J, DEHARO E, ROJAS R, STIEN D, SAUVAIN M. Ta'ta', Huayani: Perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru Part II. **J Ethnopharmacol.** 2009; 126: 149-158.

ODONNE G, HERBETTE G, EPARVIER V, BOURDY G, ROJAS R, SAUVAIN M, STIEN D. Antileishmanial sesquiterpene lactones from *Pseudelephantopus spicatus*, a traditional remedy from the Chayahuita Amerindians (Peru) Part III. **J Ethnopharmacol.** 2011; 137: 875-879.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 2010.

PANCHAROEN O, TUNTIWACHWUTTIKUL P, TAYLOR WC, PICKER K. Triterpenoid glycosides from *Schefflera lucantha*. **Phytochemistry.** 1994; 35: 987-992.

PEDROSO RB, TONIN LTD, UEDA-NAKAMURA T, DIAS FILHO BP, SARRAGIOTTO MH, NAKAMURA CV. Beta-carboline-3-carboxamide derivatives as promising antileishmanial agents. **Ann Trop Med Parasitol.** 2011; 105: 549-557.

PEIXOTO JA, SILVA MLAE, CROTTI AEM, VENEZIANI RCS, GIMENEZ VMM, JANUÁRIO AH, GROppo M, MAGALHAES LG, DOS SANTOS FF, ALBUQUERQUE S, DA SILVA FILHO AA, CUNHA WR. Antileishmanial activity of the hydroalcoholic extract of *miconia langsdorffii*, isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. **Molecules.** 2011; 16: 1825-1833.

PERAZA-SÁNCHEZ SR, CEN-PACHECO F, NOH-CHIMAL A, MAY-PAT F, SIMÁ-POLANCO P, DUMONTEIL E, GARCÍA-MISS MR, MUT-MARTÍN M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula **Fitoterapia**. 2007; 78: 315-318.

PICCINELLI AL, CAMPONE L, DAL PIAZ F, CUESTA-RUBIO O, RASTRELLIA L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom**. 2009; 20: 1688–1698.

PIMENTEL-ELARDO SM, BUBACK V, GULDER TAM, BUGNI TS, REPPART J, BRINGMANN G, IRELAND CM, SCHIRMEISTER T, HENTSCHEL U. New tetromycin derivatives with anti-trypanosomal and protease inhibitory activities. **Mar Drugs**. 2011; 9: 1682-1697.

PINHEIRO AC, ROCHA MN, NOGUEIRA PM, NOGUEIRA TCM, JASMIM LF, DE SOUZA MVN, SOARES RP. Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-t-butyloxycarbonyl-protected diamines. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 2011; 71: 273-278.

PINK R, HUDSON A, MOURIÈS M-A, BENDIG M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Rev Drug Discov**. 2005; 4: 727-740.

PORTO ALM, MACHADO SMF, DE OLIVEIRA CMA, BITTRICH V, AMARAL MDE, MARSAIOLI AJ. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. **Phytochemistry**. 2000; 55: 755-768.

RAHMAN AA, SAMOYLENKO V, JAIN SK, TEKWANI BL, KHAN SI, JACOB MR, MIDIWO JO, HESTER JP, WALKER LA, MUHAMMAD I. Antiparasitic and antimicrobial isoflavanquinones from *Abrus schimperi*. **Nat Prod Comm**, 2011; 6: 1645-1650.

RAMESH V, ANSARI NA, JAIN RK, SALOTRA P. Oral miltefosine in the treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clin Exp Dermatol**. 2008; 33: 103–105.

REGALADO EL, TURK T, TASDEMIR D, GORJANC M, KAISER M, THOMAS OP, FERNÁNDEZ R, AMADE P. Cytotoxic and haemolytic steroidal glycosides from the Caribbean sponge *Pandaros acanthifolium*. **Steroids**. 2011; 76: 1389-1396.

REIMÃO JQ, COLOMBO FA, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, TEMPONE AG. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Exp Parasitol**. 2012; 130: 195-199.

REIMÃO JQ, TEMPONE AG. Investigation into in vitro anti-leishmanial combinations of calcium channel blockers and current anti-leishmanial drugs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2011; 06: 1032-1038.

REITHINGER R, DUJARDIN J, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**. 2007; 7: 581–596.

RENSLO AR, MCKERROW JH. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chem Biol.** 2006; 2: 701-710.

RODENKO B, AL-SALABI MI, TEKA IA, HO W, EL-SABBAGH N, ALI JAM, IBRAHIM HMS, WANNER MJ, KOOMEN G-J, DE KONING HP. Synthesis of marine-derived 3-alkylpyridinium alkaloids with potent antiprotozoal activity. **ACS Med Chem Lett.** 2011; 2: 901-906.

ROGGEN H, CHARNOCK C, BURMAN R, FELTH J, LARSSON R, BOHLIN L, GUNDERSEN L-L. Antimicrobial and antineoplastic activities of agelasine analogs modified in the purine 2-position. **Arch Pharm (Weinheim).** 2011; 344: 50-55.

ROMERO EL, MORILLA MJ. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opin Drug Del.** 2008; 5: 805-823.

ROMERO GAS, BOELAERT M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis.** 2010; 4: e584.

RUBIANO LC, MIRANDA MC, ARENAS SM, MONTERO LM, RODRIGUEZ-BARRAQUER I, GARCERANT D, PRAGER M, OSORIO L, ROJAS MX, PEREZ M, NICHOLLS RS, SARAIVIA NG. Noninferiority of miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. **J Infect Dis.** 2012; 205: 684-692.

RUIZ C, HADDAD M, ALBAN J, BOURDY G, REATEGUI R, CASTILLO D, SAUVAIN M, DEHARO E, ESTEVEZ Y, AREVALO J, ROJAS R. Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. **Phytochemistry Lett.** 2011; 4: 363-366.

SANTOS DO, COUTINHO CER, MADEIRA MF, BOTTINO CG, VIEIRA RT, NASCIMENTO SB, BERNARDINO A, BOURGUIGNON SC, CORTE-REAL S, PINHO RT, RODRIGUES CR, CASTRO HC. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitol Res.** 2008; 103: 1–10.

SANTOS SCO, LÓPEZ JA, MEIRA M, GUEDES MTB, DAVID JM, ZACHARIAS F, DAVID JP, LIMA FWM. *Haemonchus contortus* protease inhibition by n-alkylferulates from *Maprounea guianensis*. **Res Vet Sci.** 2012; 92: 492-493.

SCHMIDT TJ, KHALID SA, ROMANHA AJ, ALVES TMA, BIAVATTI MW, BRUN R, DA COSTA FB, CASTRO SL, FERREIRA VF, LACERDA MVG, LAGO JHG, LEON LL, LOPES NP, AMORIM RCN, NIEHUES M, OGUNGBE IV, POHLIT AM, SCOTTI MT, SETZER WN, SOEIRO MNC, STEINDEL M, TEMPONE AG. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases – Part I. **Curr Med Chem.** 2012; 19: 2128-2175.

SCHMIDT TJ, KHALID SA, ROMANHA AJ, ALVES TMA, BIAVATTI MW, BRUN R, DA COSTA FB, CASTRO SL, FERREIRA VF, LACERDA MVG, LAGO JHG, LEON LL, LOPES NP, AMORIM RCN, NIEHUES M, OGUNGBE IV, POHLIT AM, SCOTTI MT, SETZER WN, SOEIRO MNC, STEINDEL M, TEMPONE AG. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or

leads against protozoan neglected diseases – Part II. **Curr Med Chem.** 2012; 19: 2176-2228.

SEIFERT K, CROFT SL. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob Agents Chemother.** 2006; 50: 73–79.

SEN CK, KHANNA S, ROY S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences.** 2006; 78: 2088–2098.

SHARMA N, SHUKLA AK, DAS M, DUBEY VK. Evaluation of plumbagin and its derivative as potential modulators of redox thiol metabolism of *Leishmania* parasite. **Parasitol Res.** 2012; 110: 341-348.

SHARMA U, SINGH D, KUMAR P, DOBHALL MP, SINGH S. Antiparasitic activity of plumericin and isoplumericin isolated from *Plumeria bicolor* against *Leishmania donovani*. **Indian J Med Res.** 2011; 134: 709-716.

SHI X-L, GE J-F, LIU B-Q, KAISER M, WITTLIN S, BRUN R, IHARA M. Synthesis and *in vitro* antiprotozoal activities of 5-phenyliminobenzo[a]phenoxazine derivatives. **Bioorg Med Chem Lett.** 2011; 21: 5804-5807.

SIDANA J, SINGH S, ARORA SK, FOLEY WJ, SINGH IP. Formylated phloroglucinols from *Eucalyptus loxophleba* foliage. **Fitoterapia.** 2011; 82: 1118-1122.

SINGH N, KUMAR R, GUPTA S, DUBE A, LAKSHMI V. Antileishmanial activity *in vitro* and *in vivo* of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. **Parasitol Res.** 2008; 103: 351-354.

SINHA PK, JHA TK, THAKUR CP, NATH D, MUKHERJEE S, ADITYA AK, SUNDAR S. Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India. **J Trop Med.** 2011; 2011: 1-7.

SIQUEIRA-NETO JL, SONG O-R, OH H, SOHN J-H, YANG G, NAM J, JANG J, CECETTO J, LEE CB, MOON S, GENOVESIO A, CHATELAIN E, CHRISTOPHE T, FREITAS-JUNIOR LH. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **PLoS Neglect Trop Dis.** 2010; 4: e675.

STEC J, HUANG Q, PIERONI M, KAISER M, FOMOVSKA A, MUI E, WITOLA WH, BETTIS S, MCLEOD R, BRUN R, KOZIKOWSKI AP. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of N-benzoyl-2-hydroxybenzamides as agents active against *P. falciparum* (K1 strain), trypanosomes, and leishmania. **J Med Chem.** 2012; 55: 3088-3100.

SUNDAR S, CHAKRAVARTY J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis **Expert Opin Investig Drugs.** 2008; 17: 787-794.

SUNDAR S, JHA TK, THAKUR CP, SINHA PK, BHATTACHARVA SK. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med.** 2007; 356: 2571–2581.

TAHGHIGHI A, RAZMI S, MAHDAVI M, FOROUMADI P, ARDESTANI SK, EMAMI S, KOBARFARD F, DASTMALCHI S, SHAFIEE A, FOROUMADI A. Synthesis and anti-leishmanial activity of 5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-amines containing N-[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] moieties. **Eur J Med Chem.** 2012; 50: 124-128.

TAVARES J, OUAISSI A, SILVA AM, LIN PKT, ROY N, CORDEIRO-DA-SILVA A. Anti-leishmanial activity of the bisnaphthalimidopropyl derivatives. **Parasitol Int.** 2012; 61: 360-363.

TEIXEIRA JE, CRUZ FG. Polyisoprenylated benzophenone derivatives from *Clusia obdeltifolia*. **Tetrahedron Lett.** 2005; 46: 2813-2816.

TERASHIMA K, TAKAYA Y, NIWA M. Powerful antioxidative agents based on garcinoic acid from *Garcinia kola*. **Bioorg Med Chem.** 2002; 10: 1619-1625.

THERIAULT A, CHAO J, WANG Q, GAPOR A, ADELI K. Tocotrienol: A review of its therapeutic potential. **Clin Biochem.** 1999; 32: 309-319.

VAN DE VEN H, VERMEERSCH M, VANDENBROUCKE RE, MATHEEUSSEN A, APERS S, WEYENBERG W, DE SMEDT SC, COS P, MAES L, LUDWIG A. Intracellular drug delivery in *Leishmania*-infected macrophages: Evaluation of saponin-loaded PLGA nanoparticles. **J Drug Target.** 2012; 20: 142-154.

VANAERSCHOT M, DE DONCKER S, RIJAL S, MAES L, DUJARDIN J, DECUYPERE S. Antimonial resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased *in vivo* parasite burden. **PLoS ONE.** 2011; 6: e23120.

VENKATESH G, MAJID MIA, MANSOR SM, NAIR NK, CROFT SL, NAVARATNAM V. *In vitro* and *in vivo* evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of buparvaquone. **Drug Dev Ind Pharm.** 2010; 36: 735-743.

VERMA RK, PRAJAPATI VK, VERMA GK, CHAKRABORTY D, SUNDAR S, RAI M, DUBEY VK, SINGH MS. Molecular docking and *in vitro* antileishmanial evaluation of chromene-2-thione analogues. **ACS Med Chem Lett.** 2012; 3: 243-247.

VIEIRA NC, VACUS J, FOURNET A, BAUDOUIN R, BORIES C, SÉON-MÉNIEL B, FIGADÈRE B, LOISEAU PM. Antileishmanial activity of a formulation of 2-n-propylquinoline by oral route in mice model. **Parasite.** 2011; 18: 333-336.

XIAOHUA Z, PANDHARKAR T, WERBOVETZ K. Identification of new antileishmanial leads from hits obtained by high-throughput screening. **Antimicrob Agents Chemother.** 2012; 56: 1182-1189.

YAMAMOTO I, TETSUO T, KAZUE K, MASAO M. International Patent number A61K31/352; A61K31/355; A61P37/00; C07D311/72; (IPC1-7): A61K31/355. JP 592192801984, 1984.