

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

GREISIELE LORENA PESSINI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTUDO QUÍMICO BIOGUIADO DE
ESPÉCIES DE *ASPIDOSPERMA***

Maceió
2015

GREISIELE LORENA PESSINI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ESTUDO QUÍMICO BIOGUIADO DE
ESPÉCIES DE *ASPIDOSPERMA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Maceió
2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

P475a Pessini, Greisiele Lorena.
Atividade antimicrobiana e estudo químico bioguiado de espécies de
Aspidosperma / Greisiele Lorena Pessini. – 2015.
[251]f. : il. tabs., grafs.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Coorientador: Celso Vataru Nakamura.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 208-233.
Anexos: f. [234]-[251].

1. *Aspidosperma macrocarpon*. 2. *Aspidosperma tomentosum*.
3. *Aspidosperma pyrifolium*. 4. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDU: 543.645:615.28



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

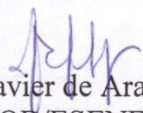


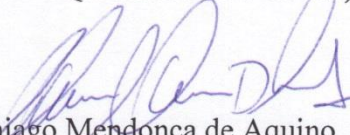
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

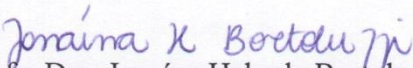
FOLHA DE APROVAÇÃO

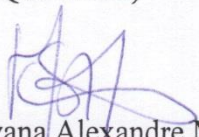
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Greisiele Lorena Pessini**, intitulada: “**Atividade antimicrobiana e estudo químico bioguiado de espécies de Aspidosperma**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 25 de setembro de 2015, às 09h, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

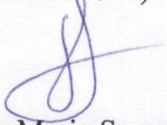
COMISSÃO JULGADORA

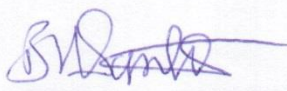

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
(Orientador - PPGQB/ESENFAR-UFAL)


Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino
(PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Janaína Heberle Bortoluzzi
(PPGQB/IQB/UFAL)


Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira
(ICBS/UFAL)


Profa. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva
(UFRPE)


Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
(UFPB)

Este trabalho é dedicado com amor aos meus pais Luiz e Josefa e ao meu esposo Willian pela paciência, companheirismo, carinho e estímulo constante.

AGRADECIMENTOS

“Em meio à tribulação, invoquei o Senhor, e o Senhor me ouviu e me deu folga. O Senhor está comigo entre os que me ajudam;... Render-te-ei graças porque me acudiste e foste a minha salvação.” Salmo 118.5, 7, 21.

Ao Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior pela orientação, confiança, pelas cobranças, incentivo, por todo auxílio prestado e compreensão durante todo este tempo, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela co-orientação, confiança, por ter permitido fazer parte da sua equipe mais uma vez, pelos ensinamentos, amizade, por sua grandiosa contribuição, não tenho palavras para agradecer tantos anos de apoio, muito obrigada.

A profa. Dr^a. Tânia Ueda-Nakamura pela parceria nos experimentos antivirais, por ter aberto as portas do seu laboratório, por toda ajuda em todos os momentos que solicitei, pela amizade e por todo o cuidado que tens em cada detalhe do trabalho que realiza.

Ao prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana por ter aberto as portas do seu laboratório no início do meu doutoramento, e pela dica que alimentei durante todo o processo “... com *Aspidosperma* o estudo deve ser bioguiado...”

Ao prof. Dr. João Palazzo de Mello por mais uma vez me estender à mão, por ter aberto as portas do seu laboratório nos momentos que precisei, pela confiança, pelas dicas durante a execução dos experimentos e preocupação comigo.

Ao prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira meus sinceros agradecimentos por aceitar supervisionar os estudos fitoquímicos com dicas e ensinamentos que foram imprescindíveis para o direcionamento dos estudos.

A minha família, meus pais Luiz e Josefa, meu irmão Alan, e meu esposo Willian, pelo amor incondicional, apoio constante e por me ajudarem a seguir em frente, agradeço a Deus por tê-los na minha vida, obrigada Senhor porque permitiu que eles continuassem comigo.

A Josélia que cuidou da minha casa durante todo o tempo que estive ausente, assim como dos meus amores Bud (*in memoriam*) Mel e Bob – três cockers.

As novas amigas, presente de Deus, Amanda, Débora, Francielle e Elizandra pelos ensinamentos, paciência, pela ajuda durante e após os experimentos, na leitura dos meus textos, pelo apoio nos momentos difíceis, agradeço por terem tornado esta fase da minha vida muito mais fácil, e por continuarem a fazer parte dela, mesmo distante.

Aos amigos que acompanharam tudo de longe, que sempre torceram a favor, que oraram, compartilharam e compartilham vários momentos da minha vida, Sirlene, Jose, Fabíola, Éverson, Liliana e Tânia, muito obrigada.

Aos amigos e colegas do laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da Universidade Estadual de Maringá - PR, Débora, Fran Garcia, Amanda Louzano, Elizandra, Nilma, Gean, Juliana Cogo, Vanessa, Hélio, Alex, Vânia, Solange, Jean, Nathiele, Fabianne, Danielle, Priscila, Karen, Jéssica, Érica, Renata, Carol, Larissa, Talitha, Eliana, Lígia, Ângelo, Mychelle, Samara, para descrever como cada um foi importante na minha vida pessoal e profissional, eu usaria mais páginas do que há nesta tese, sou imensamente grata a Deus por ter colocado cada um de vocês na minha vida, o aprendizado foi enorme, as alegrias e as lembranças serão eternas.

Aos colegas e amigos do laboratório Palafito, da Universidade Estadual de Maringá - PR: Letícia, Maísa, Vanessa, Fernanda, André, Bruna, Raquel, Admir, Leila, Adrielli pelos momentos de descontração, as ajudas oportunas e pelo companheirismo que deram suporte para a realização dos experimentos de fitoquímica.

A Malinda pelos ensinamentos de inglês, pela amizade e sabedoria transmitida com tanto carinho.

A Fernanda Leve pela parceria nos experimentos relacionados aos ensaios antitumorais com os alcaloides.

Aos técnicos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá - PR, Fábio pela disponibilização de nitrogênio líquido, Edson pela ajuda sempre que necessário e a Kátia pelo auxílio na utilização dos microscópios eletrônicos.

À Ivania e Ulisses pela amizade e valiosa ajuda na obtenção dos espectros de RMN.

À Gabriela parceira durante as disciplinas do doutorado, tornando esta fase mais fácil e divertida.

Ao Pedro e Aldy pela ajuda oportuna e a Erlan pelo companheirismo nos momentos de descontração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

“Não que por nós mesmos, sejamos capazes de pensar alguma coisa, como se partisse de nós; mas a suficiência vem de Deus.” 2 Coríntios 3.5

RESUMO

As espécies do gênero *Aspidosperma* pertencentes à família Apocynaceae são restritas às Américas. Estudos etnofarmacológicos revelaram a utilização destas espécies como agente potencial contra a malária e tripanosomatídeos, como antimicrobianos, anti-inflamatórios e antitumorais. A pesquisa em busca de novas entidades químicas com ação antimicrobiana apresenta significativa importância devido à versatilidade dos micro-organismos em adquirir resistência ao arsenal terapêutico, e devido à prevalência de doenças consideradas negligenciadas, como as leishmanioses. Estas são endêmicas nos países em desenvolvimento e possuem poucas opções terapêuticas, sendo estas tóxicas e de eficácia limitada. O objetivo do estudo consistiu em avaliar os extratos brutos e frações de diferentes partes das espécies de *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium*, quanto à ação antimicrobiana e realizar o estudo químico bioguiado da espécie mais ativa sobre os micro-organismos testados e menos tóxica para células de mamíferos. Sobre a atividade antibacteriana a fração alcaloídica da casca de *A. pyriformium* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) moderada de 125 e 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, respectivamente. A fração acetato de etila do caule de *A. macrocarpon* apresentou CIM fraca de 250 µg/mL sobre *Candida parapsilosis*. A atividade do extrato da casca do caule de *A. macrocarpon* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* apresentou concentração inibitória (CI₅₀) de 151,5 µg/mL e índice de seletividade (IS) de 6,52 sobre células LLCMK₂, sendo a espécie mais promissora para a realização do estudo químico bioguiado. As frações de clorofórmio e acetato de etila obtidas da casca do caule de *A. macrocarpon* demonstraram CI₅₀ de 29,00 ± 1,65 e 29,50 ± 0,95 µg/mL respectivamente, sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. O estudo bioguiado do fracionamento da fração clorofórmio conduziu à obtenção da subfração com monoacilgliceróis (MAG) como a mais ativa sobre as formas evolutivas de *L. amazonensis*, com CI₅₀ 2,31 ± 0,08 e 2,29 ± 0,14 µg/mL sobre promastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente e IS sobre macrófagos J774-A1 de 42, para ambas as formas evolutivas. Estudos relacionados ao mecanismo de ação da fração MAG avaliados por microscopia óptica, eletrônica de varredura (MEV), e transmissão (MET) evidenciaram alterações como inchaço mitocondrial, membranas concêntricas dentro da mitocôndria, presença de perfurações na superfície celular do parasito e vacúolos autofágicos. Estes dados quando analisados em conjunto com resultados da citometria de fluxo indicaram a autofagia e necrose como provável mecanismo de morte celular. Após o fracionamento da fração acetato de etila foi identificada a quercetina como substância ativa sobre as formas evolutivas de *L. amazonensis*, com CI₅₀ de 61,93 ± 1,36 e 63,86 ± 3,25 µM/mL sobre promastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente. A quercetina foi avaliada em combinação com anfotericina B (Q+A) e miltefosina (Q+M), o efeito combinatório de ambas foi considerado sinérgico sobre as formas evolutivas de *L. amazonensis*. As combinações Q+A e Q+M demonstraram ação antagônica sobre macrófagos e eritrócitos humanos. A avaliação da combinação por MEV e MET associada aos dados da literatura indicaram provável morte celular por apoptose de ambas as combinações. Estes achados nos ensaios *in vitro* são relevantes como primeiro passo na busca por novas terapias para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras chaves: *Aspidosperma macrocarpon*, *Aspidosperma tomentosum*, *Aspidosperma pyriformium*, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Aspidosperma species belonging to the Apocynaceae family are restricted to the Americas. Ethnopharmacological studies have shown the use of these species as a potential agent against malaria and trypanosomatids, also used as antibiotics, anti-inflammatory and antitumor. The search for new chemical entities with antimicrobial activity has significant importance due to the versatility of microorganisms to acquire resistance to the therapeutic arsenal, and due to the prevalence of neglected diseases, such as leishmaniasis. These are endemic in developing countries have few therapeutic options, which are toxic and have limited effectiveness. The aim of this study was to evaluate the crude extracts and fractions from different parts of the species *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* and *A. pyriformium*, as the antimicrobial action and realize bioguided chemical study of the species with high activity against the microorganisms tested, and less toxic to mammalian cells. About antibacterial activity alkaloidal fraction from *A. pyriformium* stem presented moderate minimal inhibitory concentration (MIC): 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$ for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, respectively. The ethyl acetate fraction of *A. macrocarpon* stem had a weak MIC of 250 $\mu\text{g/mL}$ on *Candida parapsilosis*. The activity of the extract of the stem bark of *A. macrocarpon* against *Leishmania amazonensis* promastigotes showed inhibitory concentration (IC_{50}) of 151.5 $\mu\text{g/mL}$ and selectivity index (SI) of 6.52 on LLCMK₂ cells, this species were considered the most promising for the bioguided chemical study. The chloroform and ethyl acetate fractions of the *A. macrocarpon* stem bark showed IC_{50} 29.00 ± 1.65 and 29.50 ± 0.95 $\mu\text{g/mL}$, respectively on promastigotes forms of *L. amazonensis*. The bioguided study with chloroform fraction led to subfraction of monoacylglycerols, which were the most active on *L. amazonensis*, with IC_{50} 2.31 ± 0.08 and 2.29 ± 0.14 $\mu\text{g/mL}$ on promastigotes and intracellular amastigotes, respectively. SI showed that this fraction were 42 fold more toxic to *L. amazonensis* than to macrophages. Studies related to the mechanism of action of monoacylglycerols evaluated by optical microscopy, scanning electron (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) showed abnormalities such as mitochondrial swelling, concentric membranes inside the mitochondria, presence of perforations on the cell surface of the parasite and autophagic vacuoles. These data together with results of flow cytometry showed necrosis and autophagy as a possible mechanism of cell death. Quercetin was identified as the active substance of the ethyl acetate fraction against evolutionary forms of *L. amazonensis*. This substance had, IC_{50} of 61.93 ± 1.36 and 63.86 ± 3.25 $\mu\text{M/mL}$ on promastigotes and intracellular amastigotes, respectively. Quercetin was evaluated in combination with amphotericin B (Q + A) and miltefosine (Q + M), the combinatorial effect of both was considered synergistic against all forms of *L. amazonensis*. The combinations Q+A and Q+M showed antagonistic action on macrophages and human erythrocytes. Evaluation of the combination using SEM and TEM associated with literature data indicate apoptotic cell death after treatment with both combinations. These findings are relevant as a first step in the search for new therapies for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Key words: *Aspidosperma macrocarpon*, *Aspidosperma tomentosum*, *Aspidosperma pyriformium*, antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1 - Procedimento de obtenção dos extratos brutos da casca do caule, do caule, folhas e dos galhos e caule da espécie vegetal <i>A. macrocarpon</i> e partição do extrato bruto etanólico do caule (AM4) desta espécie	68
Fluxograma 2 - Fracionamento do extrato bruto etanólico do caule (AM4) de <i>A. macrocarpon</i> para obtenção da fração alcaloídica.....	69
Fluxograma 3 - Procedimento de obtenção dos extratos brutos da casca do caule, do caule, das cascas da raiz e da raiz da espécie vegetal <i>A. tomentosum</i>	71
Fluxograma 4 - Procedimento de obtenção dos extratos brutos da casca do caule, do caule, das cascas da raiz, da raiz, dos frutos e das flores da espécie vegetal <i>A. pyrifolium</i>	72
Fluxograma 5 - Procedimento de fracionamento da casca do caule (AP3) e do caule (AP4) da espécie vegetal <i>A. pyrifolium</i> , e procedimento para obtenção da fração alcaloídica do caule de <i>A. pyrifolium</i>	73
Fluxograma 6 - Fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção à pressão negativa do extrato etanólico da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	76
Fluxograma 7 - Fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção tipo “Flash” da fração clorofórmio (F.CHCl ₃) e frações reunidas da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	79
Fluxograma 8 - Fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção tipo “Flash” da fração acetato de etila (F.A) e frações reunidas após avaliação dos perfis das cromatografias em camada delgada (CCD)	81
Figura 1 - Partes aéreas da <i>A. macrocarpon</i> Mart.....	32
Figura 2 - Partes aéreas da <i>A. tomentosum</i> Mart.....	37
Figura 3 - Partes aéreas da <i>A. pyrifolium</i> Mart	40
Figura 4 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp	50
Figura 5 - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp. promastigota.....	51
Figura 6 - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp. amastigota	52
Figura 7 - Coluna cromatográfica de sílica gel sob pressão negativa do extrato bruto etanólico da casca do caule da <i>A. macrocarpon</i> para obtenção das frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanólica.....	75
Figura 8 - Esquema para determinação da concentração inibitória mínima em microplaca de cultura de células de 96 poços	87

Figura 9 - Esquema da reação de conversão do MTT em cristais de formazan	95
Figura 10 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 24 poços utilizadas no experimento para avaliação do efeito antileishmania sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	100
Figura 11 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 24 poços utilizadas no experimento para avaliação do efeito antileishmania sobre amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	101
Figura 12 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 96 poços utilizadas no experimento para avaliação da citotoxicidade sobre macrófagos J774-A1	102
Figura 13 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 96 poços utilizadas no experimento para avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos	103
Figura 14 - Cromatografias em camada delgada (CCD) do extrato bruto etanólico e das frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e butanol obtidos da casca do caule da <i>A. macrocarpon</i>	119
Figura 15 - Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) da subfração F.CHCl ₃ -153-172 isolada da fração F.CHCl ₃ da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	122
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹ H da fração F.153-172 (300 MHz, Clorofórmio- <i>d</i>) (A) espectro total, (B) expansões e (C) copsanona.	125
Figura 17 - Expansões do espectro de RMN de ¹ H da fração F.153-172 (300 MHz, Clorofórmio- <i>d</i>) e estrutura química da copsanona.	126
Figura 18 - Expansões do espectro de RMN de ¹ H da fração F.153-172 (300 MHz, Clorofórmio- <i>d</i>) e estrutura química da copsanona.	127
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹³ C da fração F.153-172 (75 MHz, Clorofórmio- <i>d</i>), (A) espectro total (B) expansões, (C) quercetina.	130
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹³ C (A) e DEPT 135 e 90 (B) da fração F.153-172 (75 MHz, Clorofórmio- <i>d</i>), (C) quercetina.	131
Figura 21 - Espectro na região do infravermelho da fração F.203-222.	135

Figura 22 - Espectro de RMN de ¹ H da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> /Metanol- <i>d</i> ₄) (A) espectro total, (B) expansões e (C) estrutura do 2,3-dihidroxi-propil alcanoato.	138
Figura 23 - Expansões do espectro de RMN de ¹ H da fração F.203-222 (A) (500 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> /Metanol- <i>d</i> ₄) e estrutura do 2,3-dihidroxi-propil alcanoato (B). .	139
Figura 24 - Espectro total de RMN de ¹³ C (A), expansões (B) e DEPT 135 (C) da fração F.203-222 (125 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> /Metanol- <i>d</i> ₄) correlacionado com a 2,3-dihidroxi-propil alcanoato (D).....	142
Figura 25 - Mapa de contornos COSY para a fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> /Metanol- <i>d</i> ₄).	144
Figura 26 - Mapa de contornos HSQC da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> /Metanol- <i>d</i> ₄).	145
Figura 27 - Mapa de contornos HMBC da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> /Metanol- <i>d</i> ₄).	146
Figura 28 - Estrutura química geral do éster de glicerol do tipo 1-monoacilglicerol (2,3-dihidroxi-propil alcanoato), demonstrada anteriormente.	146
Figura 29 - Avaliação da atividade antiproliferativa da fração MAG sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por um período de 24, 48, 72 e 96 h de tratamento.....	148
Figura 30 - Avaliação do índice de sobrevivência das formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos murinos, após tratamento com diferentes concentrações da fração MAG.	149
Figura 31 - Microscopia óptica de amastigotas intracelular de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais murinos, tratados ou não com a fração MAG isolada da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	150
Figura 32 - Número de flagelos em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com a fração MAG.....	152
Figura 33 - Microscopia óptica de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , tratados ou não com a fração MAG isoladas da casca do caule da <i>A. macrocarpon</i>	154
Figura 34 - Micrografias de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> observadas em microscópio eletrônico de varredura, após tratamento com a fração MAG isolada da fração clorofórmio da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	156

Figura 35 - Micrografias de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> visualizadas por microscópio eletrônico de transmissão, após tratamento com a fração MAG isolada da fração clorofórmio da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	158
Figura 36 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com a fração MAG.....	160
Figura 37 - Avaliação da integridade de membrana celular em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com a fração MAG.	162
Figura 38 - Avaliação da exposição da fosfatidilserina em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com a fração MAG.	164
Figura 39 - Avaliação do volume celular em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com a fração MAG.	167
Figura 40 - Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações F.A-19, F.A-20, F.A-21 e F.A-22 isoladas da fração F.A da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	175
Figura 41 - Espectro na região do infravermelho da fração F.A-21-22	176
Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H da fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4) (A) espectro total, (B) expansões e (C) quercetina.....	178
Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração F.A-21-22 (125 MHz, Metanol- d_4), (A) espectro total (B) expansões, (C) quercetina.	180
Figura 44 - Espectro de RMN de DEPT 135 da fração F.A-21-22 (125 MHz, Metanol- d_4), espectro total (A), expansões (B), quercetina (C).....	181
Figura 45 - Mapa de contornos COSY expandido* para a fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4).....	183
Figura 46 - Mapa de contornos HMBC expandido* da fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4).....	183
Figura 47 - Mapa de contornos HSQC da fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4) (A) mapa total (B) expansão (C) quercetina.....	184
Figura 48 - Isobogramas demonstrativos dos efeitos combinatórios entre a quercetina e anfotericina B (Q+A), e a quercetina e miltefosina (Q+M).	189
Figura 49 - Micrografias de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após tratamento com quercetina, anfotericina B e combinações de Q+A.....	194
Figura 50 - Micrografias de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após tratamento com quercetina, miltefosina e combinações de Q+M.....	195

- Figura 51** - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* obtidas por microscopia eletrônica de transmissão após tratamento com quercetina (Q), anfotericina B (A) e combinações de Q+A. 198
- Figura 52** - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* obtidas por microscopia eletrônica de transmissão após tratamento com quercetina (Q), miltefosina (M) e combinações de Q+M..... 199

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Classificação das espécies do gênero *Aspidosperma*. 30
- Tabela 2** - Sistemas de eluentes para a coluna de fracionamento a pressão reduzida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* 75
- Tabela 3** - Condição de eluição da coluna cromatográfica tipo “Flash” da F.CHCl₃ obtida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* 77
- Tabela 4** - Sistema de eluição da coluna cromatográfica tipo “Flash” da F.A obtida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* 82
- Tabela 5** - Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL) de *A. tomentosum* e da *A. pyriformium* sobre bactérias Gram positiva e Gram negativa 112
- Tabela 6** - Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL) das frações de *A. macrocarpon* e da *A. pyriformium* em espécies de *Candidas* 112
- Tabela 7** - Avaliação da atividade antiproliferativa sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* dos extratos brutos e frações de *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium* 116
- Tabela 8** - Prospecção fitoquímica do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* e suas frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) 121
- Tabela 9** - Dados de RMN de ¹H (300 MHz, Metanol-*d*₄) para a fração F.153-172, comparados com valores descritos na literatura para copsanona, demonstrada abaixo. 124
- Tabela 10** - Dados de RMN de ¹³C e DEPT 135 e 90 da fração F.153-172 (75 MHz, clorofórmio-*d*), comparados com valores de deslocamentos químicos descritos na literatura para copsanona, demonstrada abaixo..... 129
- Tabela 11** - Atividade antiproliferativa do extrato bruto, frações e substância isolada sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, ação citotóxica sobre macrófagos J774-A1 e IS..... 133
- Tabela 12** - Dados de RMN de ¹H da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio-*d*/Metanol-*d*₄), comparados com valores de deslocamento químico descritos na literatura para a estrutura 2,3-dihidroxipropil alcenoato (1-monoacilglicerol), demonstrada abaixo (com exceção da substância 4). 137

Tabela 13 - Dados de RMN de ¹³ C e DEPT 135 da fração F.203-222 (125 MHz, Clorofórmio- <i>d</i> /Metanol- <i>d</i> ₄), comparados com valores de deslocamentos químicos descritos na literatura para a estrutura 2,3-dihidroxiopropil alcanato (1-monoacilglicerol), demonstrada abaixo (com exceção da substância 4).	141
Tabela 14 - Atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos da fração F.CHCl ₃ , fração MAG isoladas da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i> , resultados expressos em porcentagem de hemólise (%).	151
Tabela 15 - Avaliação do ciclo celular de promastigotas (5,0×10 ⁶ células/mL) de <i>L. amazonensis</i> tratados com 50, 100 e 200 µg/mL da fração MAG, por 24 horas.	165
Tabela 16 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄) para a fração F.A-21-22, comparados com valores descritos na literatura para quercetina, demonstrada abaixo.	177
Tabela 17 - Dados de RMN de ¹³ C e DEPT 135 da fração F.A-21-22 (125 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄), comparados com valores de deslocamentos químicos descritos na literatura para quercetina, demonstrada abaixo.	179
Tabela 18 - Atividade antiproliferativa sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> , efeito citotóxico sobre macrófagos J774-A1 e índice de seletividade (IS) da Quercetina, Anfotericina B e Miltefosina.	186
Tabela 19 - Atividade da combinação Q+A e Q+M sobre promastigotas, amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> , macrófagos J774-A1 e eritrócitos humanos.	188
Tabela 20 - Concentrações de quercetina, anfotericina B e miltefosina isoladas e combinadas (Q+A e Q+M) utilizadas no ensaio de citotoxicidade sobre macrófagos J774-A1.	191
Tabela 21 - Concentrações de quercetina, anfotericina B e miltefosina isoladas e combinadas (Q+A e Q+M) utilizadas no ensaio antiproliferativo de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> para análise em microscopia eletrônica de varredura e transmissão.	193

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Ágar Müller-Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar Sabouraud-Dextrose
ATCC	Coleção Americana de tipos de Cultura (do inglês: American Type Culture Collection)
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatografia em Coluna
CC ₅₀	Concentração Citotóxica capaz de reduzir 50% da densidade óptica
CCCP	Cianeto de carbonil 3-clorofenil-hidrazona
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CE ₅₀	Concentração Efetiva de 50%
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectromêtro de Massas
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular
CI ₉₀	Concentração Inibitória de 90% do crescimento celular
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMH	Caldo Mueller-Hinton
COMCAP	Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear de hidrogênio (¹ H x ¹ H) (do inglês: <i>Correlated Spectroscopy</i>)
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
Clorofórmio- <i>d</i>	Clorofórmio deuterado
CLSI	Clinical and laboratory Standards Institute
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DL ₅₀	Dose Letal de 50%
EB	Extrato Bruto

EB-cc-AM	Extrato Bruto da casca do caule de <i>Aspidosperma macrocarpon</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
eV	elétrons volts
FDA	Food and Drug Administration
FSC- H	Detector de dispersão para tamanho (do inglês: <i>Forward Scatter – Height</i>).
FITC	Fluorocromo de Isoticianato de fluoresceína
h	horas
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxiethyl)-piperazina- <i>N'</i> -2-etanosulfônico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (do inglês: <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>).
HSQC	Correlação Heteronuclear Quântica Simples (do inglês: <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>).
Hz	Hertz
IP	Iodeto de propídio
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
IS	Índice de Seletividade
Is	Índice de sobrevivência
Iv	Índice de variação
IV	Infravermelho
K	kinetoplast – tradução cinetoplasto
LLCKM ₂	Célula Epitelial de Rim de <i>Macaca mulata</i>
M	Molar
MAG	1-monoacilgliceróis
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
Metanol- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	miligrama
MHz	Megahertz
mL	mililitros
mM	milimolar
MOPS	Tampão ácido-3-[<i>N</i> -morfolino] propanosulfônico
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<i>n</i>	número de amostras

nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A	Puro para Análise
PBS	Tampão Fosfato Salina
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
p/v	Peso/volume
Q+A	Quercetina Combinada com Anfotericina B em diferentes concentrações
Q+M	Quercetina Combinada com Miltefosina em diferentes concentrações
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
R _f	Fator de Retenção
Rh 123	Rodamina 123
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro Fetal Bovino
spp	espécies
SSC	Side Scatter – detecção da dispersão lateral do laser
TTC	2,3,5 – Triphenyl-Tetrazolium-Chloride
TMS	Tetrametilsilano
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFC	Unidade Formadora de Colônia
v/v	Volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS E NOMENCLATURAS

BaSO ₄	Sulfato de bário
°C	graus Celsius
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CHCl ₃	Clorofórmio
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CO ₂	Dióxido de Carbono
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
<i>ddd</i>	duplo duplo duplete
<i>dt</i>	duplo tripleto
FeCl ₃	Cloreto férrico
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
<i>J</i>	Constante de acoplamento, em hertz (Hz)
KOH	Hidróxido de Potássio
λ	Comprimento de onda
<i>m</i>	multiplete
MeOH	Metanol
μ L	microlitros
μ M	micromolar
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido ou superóxido
rac	racêmica – relacionado à mistura racêmica
<i>sl</i>	singleto largo
δ	Deslocamento químico, em ppm
<i>t</i>	tripleto
<i>td</i>	triplo duplete
$\nu_{\text{máx}}$	Frequência de absorção máxima
$\Delta\Psi$ m	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo Geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	REVISÃO DE LITERATURA	29
3.1	Gênero <i>Aspidosperma</i> (Apocynaceae)	29
3.1.1	<i>Aspidosperma macrocarpon</i> Mart.	31
3.1.2	<i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	36
3.1.3	<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.	39
3.2	Atividades Biológicas, Estudos Químicos e o Gênero <i>Aspidosperma</i>	42
3.3	Leishmanioses	47
3.3.1	Ciclo biológico e Formas Evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	48
3.3.2	Manifestações Clínicas e Diagnósticos	54
3.3.3	Terapia Medicamentosa das Leishmanioses e Uso de Substâncias Combinadas ...	56
3.3.4	Morte Celular	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1	ESTUDO QUÍMICO	63
4.1.1	Coleta e Processamento do Material Vegetal	63
4.1.2	Técnicas Cromatográficas	63
4.1.2.1	Cromatografia em Coluna (CC) de Adsorção à Pressão Negativa	64
4.1.2.2	Cromatografia em Coluna (CC) de Adsorção - “Flash”	64
4.1.2.3	Cromatografia em Camada Delgada - CCD	64
4.1.2.4	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa – CCDP	65
4.1.3	Métodos Espectroscópicos	65
4.1.4	Extração e Fracionamento da Espécie <i>A. macrocarpon</i>	66
4.1.5	Extração da Espécie <i>A. tomentosum</i>	70
4.1.6	Extração e Fracionamento da Espécie <i>A. pyrifolium</i>	70
4.1.7	Fracionamento do Extrato Etanólico da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	74
4.1.7.1	Fracionamento da Fração Clorofórmio (F.CHCl ₃) obtida do Extrato Bruto Etanólico da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i> em Coluna Cromatográfica de Adsorção tipo “Flash”	77

4.1.7.2	Isolamento por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) da F.CHCl ₃ – 153-172 obtida do Fracionamento da F.CHCl ₃	80
4.1.7.3	Fracionamento da Fração Acetato de Etila (F.A) obtida do Extrato Bruto Etanólico da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i> em Coluna Cromatográfica de Adsorção tipo “Flash”	80
4.1.8	Prospecção Fitoquímica do Extrato Bruto e Frações da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	82
4.2	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	83
4.2.1	Avaliação do Potencial Antibacteriano e Antifúngico do Extrato Bruto e Frações obtidos de <i>A. macrocarpon</i>, <i>A. tomentosum</i> e <i>A. pyrifolium</i>	84
4.2.1.1	Micro-organismos Utilizados e Condições de Crescimento	84
4.2.1.2	Padronização da Suspensão Bacteriana e Fúngica	84
4.2.1.3	Preparo dos Fármacos Controle	85
4.2.1.4	Método de diluição em caldo (microdiluição) para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de bactérias e leveduras	86
4.2.2	Avaliação da Atividade Antileishmania <i>in vitro</i> dos Extratos Brutos, Frações e Substâncias da <i>A. macrocarpon</i>, e dos Extratos Brutos da <i>A. tomentosum</i> e <i>A. pyrifolium</i> sobre <i>L. amazonensis</i>	88
4.2.2.1	Preparo das Soluções Estoque	89
4.2.2.2	Cultivo do Parasito	90
4.2.2.2.1	Cultivo de Formas Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	90
4.2.2.2.2	Diferenciação de Formas Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em Amastigotas Axênica	90
4.2.2.3	Obtenção de Macrófagos Peritoneais e Cultura de Macrófagos J774-A1	91
4.2.2.4	Cultura de Células LLCMK ₂	91
4.2.2.5	Atividade Antiproliferativa dos Extratos Brutos, Frações e Substância da <i>A. macrocarpon</i> , e dos Extratos Brutos da <i>A. tomentosum</i> e <i>A. pyrifolium</i> em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	92
4.2.2.6	Atividade Antiproliferativa em Formas Amastigotas Axênica de <i>L. amazonensis</i> do Extrato Bruto, Frações e Substâncias Isoladas da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	92
4.2.2.7	Atividade Antiproliferativa sobre Formas Amastigotas Intracelulares de <i>L. amazonensis</i> da fração isolada da casca do caule de <i>A. macrocarpon</i>	93
4.2.2.8	Avaliação da Citotoxicidade sobre Macrófagos J774-A1	94

4.2.2.9	Avaliação da Citotoxicidade sobre Células LLCMK ₂	95
4.2.2.10	Avaliação da Citotoxicidade sobre Eritrócitos Humanos.....	96
4.2.2.11	Avaliação Flagelar das Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	97
4.2.2.12	Avaliação da Atividade Antileishmania <i>in vitro</i> da Quercetina Isolada e em Combinação com Anfotericina B (Q+A) e Miltefosina (Q+M).....	97
4.2.2.13	Avaliação das Alterações Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura das Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	104
4.2.2.14	Avaliação das Alterações Ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão das Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	105
4.2.2.15	Citometria de Fluxo	106
4.2.2.15.1	Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	107
4.2.2.15.2	Avaliação da Integridade da Membrana Celular em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	107
4.2.2.15.3	Avaliação da Exposição da Fosfatidilserina em Formas Promastigotas de <i>L.</i> <i>amazonensis</i>	108
4.2.2.15.4	Avaliação do Volume Celular em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	109
4.2.2.15.5	Avaliação do Ciclo Celular em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	109
4.2.2.16	Análises Estatísticas.....	110
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
5.1	Avaliação do Potencial Antibacteriano e Antifúngico do Extrato Bruto e Frações obtidas de <i>A. macrocarpon</i>, <i>A. tomentosum</i> e <i>A. pyriformium</i>	111
5.2	Avaliação da Atividade Antileishmania <i>in vitro</i> dos Extratos Brutos de <i>A.</i> <i>macrocarpon</i>, <i>A. tomentosum</i> e <i>A. pyriformium</i> Contra Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>, Efeito Citotóxico sobre Células LLCKM₂ e Índice de Seletividade.....	115
5.3	Estudo Químico do Extrato Etanólico e Frações da Casca do Caule de <i>A.</i> <i>macrocarpon</i>	118
5.3.1	Prospecção Fitoquímica do Extrato Bruto e Frações da Casca do Caule de <i>A.</i> <i>macrocarpon</i>	120
5.3.2	Fração Clorofórmica da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	122
5.3.3	Isolamento da F.153-172 obtida da Fração Clorofórmica da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	122

5.3.3.1	Caracterização Química da Amostra F.153-172 Isolada da Fração Clorofórmio da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	123
5.4	Avaliação da Atividade sobre Formas Promastigotas e Amastigotas Axênica de <i>L. amazonensis</i>, Efeito Citotóxico em Macrófagos J774-A1 e Índice de Seletividade do Extrato Bruto, Frações e Substâncias Isoladas da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>.	132
5.5	Caracterização Química da Fração F.203-222 Isolada da fração Clorofórmica (CHCl₃) da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	135
5.6	Avaliação da Atividade Antiproliferativa em Formas Promastigotas e Amastigotas Intracelulares de <i>L. amazonensis</i>, Efeito Citotóxico em Macrófagos J774-A1 e Índice de Seletividade da Fração MAG	147
5.6.1	Avaliação da Citotoxicidade sobre Eritrócitos Humanos	151
5.6.2	Avaliação Flagelar das Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	152
5.6.3	Avaliação das Alterações Morfológicas e Ultraestruturais das Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> por Microscopia Eletrônica	155
5.6.4	Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	159
5.6.5	Avaliação da Integridade da Membrana Celular em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	161
5.6.6	Avaliação da Exposição da Fosfatidilserina em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	163
5.6.7	Avaliação do Ciclo Celular em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	165
5.6.8	Avaliação do Volume Celular em Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	166
5.6.9	Discussão dos Resultados Relacionados à Atividade Antileishmania da Fração MAG e o seu Provável Mecanismo de Ação.....	168
5.7	Caracterização Química da Amostra F.A.21-22 Isolada da Fração Acetato de Etila (F.A) da Casca do Caule de <i>A. macrocarpon</i>	175
5.8	Avaliação do Efeito Antileishmania <i>in vitro</i> da Quercetina em Combinação com Anfotericina (Q+A) e Miltefosina (Q+M)	185
5.8.1	Atividade Antiproliferativa Frente às Formas Promastigotas e Amastigotas Intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e Efeito Citotóxico da Quercetina, Anfotericina B e Miltefosina isoladamente	186

5.8.2	Atividade Antiproliferativa Frente a Formas Promastigotas e Amastigotas Intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e Efeito Citotóxico da Combinação de Quercetina com Anfotericina B e Miltefosina	187
5.8.3	Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão da Atividade da Quercetina, Anfotericina B e Miltefosina Isoladas e em Combinação Sobre Formas Promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	192
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	206
	REFERÊNCIAS	208
	ANEXOS	

1 - INTRODUÇÃO

A pesquisa científica sobre medicamentos e plantas medicinais, ao longo da história passou por transformações, em função da aquisição do conhecimento perpetuado através da literatura e do “*know-how*”, obtido nas bancadas dos laboratórios de pesquisa ou por meio da etnofarmacologia. Em especial neste início de século, com o desenvolvimento tecnológico atuando como ferramenta em vários processos, revolucionou inúmeras áreas da ciência, em particular na descoberta de novos fármacos.

O grande desafio da pesquisa para obtenção de novas entidades químicas com potencial a se tornarem fármacos, vivência um paradoxo, caracterizado por grandes avanços tecnológicos e diminuição no número de inovações. Além da existência de doenças seculares, em especial as ocasionadas por micro-organismos, que ainda são um grande problema de saúde pública.

Silva (2013) aponta para a lacuna entre os custos elevados das pesquisas, e a baixa quantidade de fármacos inseridos no mercado nos últimos anos, principalmente em relação à inovação radical.

Estas afirmações supracitadas são impulsionadas por dados descritos na literatura atual, que mostram o insucesso das indústrias farmacêuticas para lançar um medicamento no mercado. Estima-se que somente 20% das pesquisas e desenvolvimentos de novas entidades químicas tornam-se um fármaco (LEITÃO; MONTANARI e MONTANARI, 2011). O aumento significativo no investimento de pesquisa e desenvolvimento, por parte das indústrias farmacêuticas para aprovação de novos medicamentos nos últimos 10 anos, não foi condizente com o número de novos produtos aprovados (KAITIN, 2010).

Estes relatos tornam-se alarmantes, diante das incidências que, para aproximadamente 2 mil doenças agudas e crônicas registradas, apenas 30 – 40% destas são curáveis. Algumas doenças não têm tratamentos e outras podem ser tratadas apenas sintomaticamente (WAGNER, 2009).

Em todo o mundo, cerca de 50 a 75% das mortes em hospitais foram relatadas devido a doenças infecciosas (CHITEMERERE; MUKANGANYAMA, 2014). A resistência antimicrobiana ameaça à prevenção e o tratamento eficaz de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitos, vírus e fungos que têm sido por décadas tratáveis, contudo podem voltar a matar (OMS, 2015a).

A pesquisa em busca de novas entidades químicas com ação antimicrobiana apresenta significativa importância devido à versatilidade dos micro-organismos em adquirir resistência ao arsenal terapêutico, e devido à prevalência de doenças consideradas negligenciadas, como as leishmanioses. Estas são endêmicas nos países em desenvolvimento e possuem poucas opções terapêuticas, sendo estas tóxicas e de eficácia limitada.

As leishmanioses afetam mundialmente 12 milhões de pessoas em 98 países (RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014). Estima-se que 1,3 milhões de novos casos de leishmanioses e cerca de 30 mil mortes ocorram anualmente no mundo (OMS, 2015b).

De acordo com dados da literatura, ainda hoje um quarto de toda medicina moderna deriva direta ou indiretamente das plantas, em especial no caso de doenças infecciosas (75%) e na terapia contra o câncer (60%). Avalia-se que 80% da população que reside em países em desenvolvimento, ainda dependem exclusivamente da medicina tradicional para os cuidados básicos com a saúde (GEORGIEV, 2014).

O reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura, dada a variedade e complexidade das micromoléculas presentes nos metabólitos secundários das plantas (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI e BARREIRO, 2006).

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo em relação às espécies endêmicas, cerca de 20%, destes aproximadamente 55 mil são espécies de plantas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Sendo, pouco mais de 10 mil plantas usadas como medicinais (KINGHORN et al., 2011).

As plantas são fontes potenciais de novos fármacos, podem agir de maneira sinérgica (extratos ou frações) ou de forma mais eficaz e menos tóxica ao apresentarem atividade como substância isolada. Sejam como fitofármacos ou fitocomplexo, com um grupo majoritário de metabólitos primários ou secundários ativos, as mais variadas formas de utilizações das espécies de plantas medicinais são exploradas até hoje.

Segundo Barreiro e Bolzani (2009), no Brasil a descoberta de protótipos de fármacos e/ou fitofármacos, ligados a pesquisa básica multidisciplinar impulsiona o desenvolvimento tecnológico nacional, considerando os inúmeros biomas brasileiros com uma diversidade imensa e pouco explorada como fonte de substâncias ativas.

Vários relatos científicos exemplificam como a aplicação de novas ferramentas, com base no avanço tecnológico, revitalizaram os estudos com plantas na busca por novas entidades químicas bioativas. E impulsionou novos estudos com substâncias já consagradas na literatura. Recentemente instrumentos modernos hifenados, como a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com a medição de massa de alta resolução, têm sido utilizados com a

finalidade de realizar o “*fingerprint*” de extratos vegetais de diferentes espécies de plantas e evidenciar diferenças no perfil metabólico das amostras (PANUSA et al., 2015).

Este instrumento foi apenas um exemplo de métodos analíticos modernos, que em conjunto com as inovações na área da biologia molecular, nanotecnologia, metabolômica, triagem automatizada em alta escala (*High-Throughput Screening*) e diversos outros recursos têm contribuído de maneira expressiva com a pesquisa científica (ABDELNUR, 2011; FERREIRA; OLIVA e ANDRICOPULO, 2011; SILVA, 2013; ANNANG et al., 2015).

Dentro do contexto, do desenvolvimento tecnológico associado à pesquisa com espécies vegetais, vem ocorrendo nos últimos anos por parte do governo brasileiro, um incremento de novas resoluções e leis, que visam estabelecer diretrizes para fortalecer o setor de plantas medicinais. Em função das novas políticas públicas o setor tem se revigorado e encontrado bases para o seu desenvolvimento, como a implantação da Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos – CEME, juntamente com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que estabeleceram diretrizes para o desenvolvimento de ações, voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 2006a, 2006b; 2006c e 2012).

Assim, diante do exposto as possibilidades voltam-se mais uma vez ao vasto potencial das plantas medicinais como fonte de princípios ativos.

As espécies do gênero *Aspidosperma* pertencem à família Apocynaceae são restritas às Américas, sendo encontradas entre o México e a Argentina. Além da madeira de boa qualidade fornecida pelas árvores das espécies de *Aspidosperma*, as cascas destas são utilizadas em forma de infusões pela medicina popular da Amazônia (PEREIRA et al., 2007; BARBOSA et al., 2010).

Entre as ações relatadas para a utilização das espécies de *Aspidosperma*, atenção especial é dada para o seu uso popular contra protozoários. Considerando que as *Aspidosperma* são nativas no Brasil, onde há alta prevalência das leishmanioses, doenças negligenciadas ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Acometem em particular populações pobres, causando altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento atual é falho e o interesse da indústria farmacêutica em suprir a esta lacuna é subestimado.

Com base nas explanações apresentadas, a justificativa para este estudo se apoia na importância das espécies *Aspidosperma tomentosum* Mart., *A. pyrifolium* Mart. e *A. macrocarpon* Mart. como plantas nativas no Brasil utilizadas pela medicina popular, que carecem de dados científicos comprobatórios sobre a eficácia e segurança do seu uso, em

particular sobre a atividade antibacteriana, antifúngica e antileishmania. Assim como, a busca por novos princípios ativos de plantas, que possam ser utilizados como fármacos ou protótipos para síntese ou semissíntese de substâncias análogas, mais potentes e seletivas. Caracterizando como primeiro passo os estudos biológicos *in vitro* e químico bioguiado destas espécies.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica, antibacteriana e antileishmania dos extratos hidroalcoólicos e frações obtidas das espécies vegetais *A. macrocarpon* Mart., *A. tomentosum* Mart. e *A. pyriformium* Mart. e realizar o estudo químico bioguiado para a atividade antimicrobiana da espécie de *Aspidosperma*, cujo extrato for o mais ativo e o menos tóxico.

2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar a atividade contra bactérias GRAM positivas, GRAM negativas, e contra espécies de *Candidas* dos extratos brutos e frações das espécies *A. macrocarpon* Mart., *A. tomentosum* Mart. e *A. pyriformium* Mart.
- Pesquisar a atividade antiproliferativa dos extratos e frações das espécies de *A. macrocarpon* Mart., *A. tomentosum* Mart. e *A. pyriformium* Mart. sobre as formas evolutivas promastigotas de *L. amazonensis*.
- Isolar e identificar as substâncias químicas obtidas da espécie de *Aspidosperma*, cujo extrato ou fração apresentar melhor resultado contra formas evolutivas de *L. amazonensis*.
- Investigar a atividade antiproliferativa das frações, substância isolada e combinada com a anfotericina B e com a miltefosina sobre formas promastigotas, amastigotas intracelulares e/ou amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.
- Verificar a citotoxicidade *in vitro* do extrato, frações, substâncias isoladas e de diferentes concentrações das combinações da substância isolada com anfotericina B e miltefosina.
- Avaliar alterações morfológicas e ultraestruturais sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* das substâncias ou frações mais ativas isoladas das espécies de *Aspidosperma*.
- Pesquisar alterações celulares sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* das substâncias ou frações mais ativas isoladas das espécies de *Aspidosperma*.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae)

O gênero *Aspidosperma* pertence à família Apocynaceae, por ser constantemente estudado há diferentes classificações taxonômicas que incluem ou excluem espécies dentro deste gênero. Segundo Woodson (1951) são 52 espécies dividida em 9 séries pertencentes ao gênero *Aspidosperma*. Bolzani et al. (1987) após novos estudos, reclassificou a taxonomia do gênero para 48 espécies dividida em 7 séries.

As espécies do gênero *Aspidosperma* apresentam como marcadores quimiotaxonômicos alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos tidos como um grupo de moléculas com grande potencial medicamentoso (MITAINE et al., 1996; PEREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009c). Outras substâncias presentes nestas espécies, normalmente são menos exploradas do ponto de vista químico, mas podem ser responsáveis por atividades biológicas.

No Brasil, foram catalogadas aproximadamente 50 espécies de *Aspidosperma*, que estão distribuídas de norte a sul do país nos diferentes ecossistemas. A palavra *Aspidosperma*, é referente à semente destas espécies que se apresentam em formato de escudo (LORENZI, 2002; AMORIM, SAMPAIO e ARAÚJO, 2005; OLIVEIRA et al., 2009c). Por exemplo, na caatinga do Seridó no Rio Grande do Norte, Brasil, a *A. pyriformium* é a espécie vegetal de maior dominância entre a vegetação arbustiva e arbórea, quando comparada a outras espécies locais. Sendo esta comum em muitas áreas da caatinga (AMORIM, SAMPAIO e ARAÚJO, 2005). Além, do cerrado brasileiro onde também são encontradas *Aspidosperma*, a região da Amazônia concentra o maior número de espécies da família Apocynaceae identificada no Brasil (PEREIRA et al., 2007; GUIMARÃES; BRAZ-FILHO e VIEIRA, 2012).

As espécies de *Aspidosperma* têm predominância entre os trópicos e subtrópicos, são incomuns nas regiões temperadas (ROBERT et al., 1983; STRUWE; ALBERT e BREMER, 1994). Além de serem exploradas por causa da madeira de boa qualidade e do látex (NUNES, 1980; PEREIRA et al., 2006b; PEREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009c).

Pereira et al. (2007) reuniram a classificação realizada por Woodson (1951), Robert et al. (1983) e Bolzani et al. (1987) ordenando as espécies nas respectivas séries (Tabela 1). Estas séries dividem as espécies de forma taxonômica, tendo em vista que, a distribuição dos diferentes tipos estruturais de alcaloides indólicos, não ocorre de maneira homogênea entre as espécies de cada série (PEREIRA et al., 2007).

Tabela 1 - Classificação das espécies do gênero *Aspidosperma*.

Série	Espécies
Rígida	<i>A. rigidum</i> Rusby, <i>A. laxiflorum</i> Kuhlm
Nítida	<i>A. Auriculatum</i> Mgf., <i>A. carapanauba</i> M. Pichon, <i>A. compactinervium</i> Kuhlmann, <i>A. discolor</i> A. DC., <i>A. eburneum</i> F. Allem, <i>A. excelsum</i> Benth, <i>A. marcgravianum</i> Woodson, <i>A. nitidum</i> Benth ex Müll.-Arg., <i>A. oblongum</i> A. DC., <i>A. spegazzinii</i> Molf. Ex Meyer
Quebranchines	<i>A. chakensis</i> Spegazzini, <i>A. quebracho-blanco</i> Schlecht
Polyneura	<i>A. cuspa</i> Blake, <i>A. cilindrocarpon</i> Müell.-Arg., <i>A. disperrum</i> , <i>A. peroba</i> , <i>A. polyneuron</i> Müll.-Arg., <i>A. sessiliflorum</i>
Pyricolla	<i>A. australe</i> Müll.-Arg., <i>A. campus-belus</i> A. P. Duarte; <i>A. gomesianum</i> A. DC., <i>A. multiflorum</i> A. DC., <i>A. nigricans</i> Handro, <i>A. olivaceum</i> Müll.-Arg., <i>A. parvifolium</i> , <i>A. populifolium</i> A. DC., <i>A. pyricollum</i> Muell.-Arg., <i>A. pyriforme</i> Mart., <i>A. quirandy</i> , <i>A. refractum</i> Mart., <i>A. rhombeosignatum</i> , <i>A. subincanum</i> Mart.; <i>A. tomentosum</i> Mart., <i>A. ulei</i> Mgf., <i>A. vargasii</i>
Nobile	<i>A. album</i> (Vahl) R. Bent., <i>A. desmanthum</i> Benth ex. Müll.-Arg., <i>A. exalatum</i> Monachino, <i>A. fendleri</i> , <i>A. limae</i> Woodson, <i>A. megalocarpon</i> Müll.-Arg., <i>A. melanocalyx</i> Müll.-Arg., <i>A. neblinae</i> Monachino, <i>A. obscurinervium</i> Azembuja; <i>A. sandwithianum</i> , <i>A. spruceanum</i> Benth
Macrocarpa	<i>A. duckei</i> Hub., <i>A. macrocarpon</i> Mart., <i>A. verbascifolium</i> Müll.-Arg.
Tomentosa	<i>A. formosanum</i> , <i>A. daysycarpum</i> A. DC.
-	<i>A. ramiflorum</i> Muell. Arg., <i>A. gilbertii</i> A. P. Duarte, <i>A. longepetiolatum</i> Kuhlman.

Fonte: a autora, 2015, adaptado de PEREIRA et al., 2007.

Várias espécies do gênero *Aspidosperma* são utilizadas na medicina popular como potencial agente contra a malária, leishmaniose, hanseníase, antibacteriano, antifúngico, processo inflamatórios (útero e ovário), reumatismo, febre, dor, contra o câncer, problemas estomacais, diabetes, colesterol, hipertensão e disfunção erétil (LINO; GARROTE, 2005; CAMPOS et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009c; BARBOSA et al., 2010; SILVA et al., 2010).

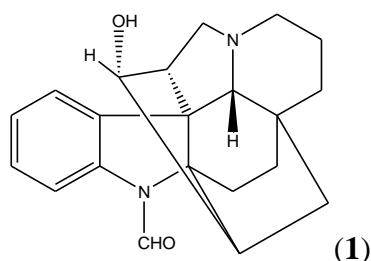
Para a realização deste trabalho foram selecionadas as espécies *A. macrocarpon* Mart., *A. tomentosum* Mart., e *A. pyriforme* Mart., que são espécies arbóreas, cuja casca do caule é comumente utilizadas pela população no preparo de decoctos para o tratamento de infecções. Conhecidas popularmente como peroba na maioria das regiões brasileiras e carapanaúba na região amazônica (HENRIQUE; NUNOMORA e POHLIT, 2010).

3.1.1 - *Aspidosperma macrocarpon* Mart.

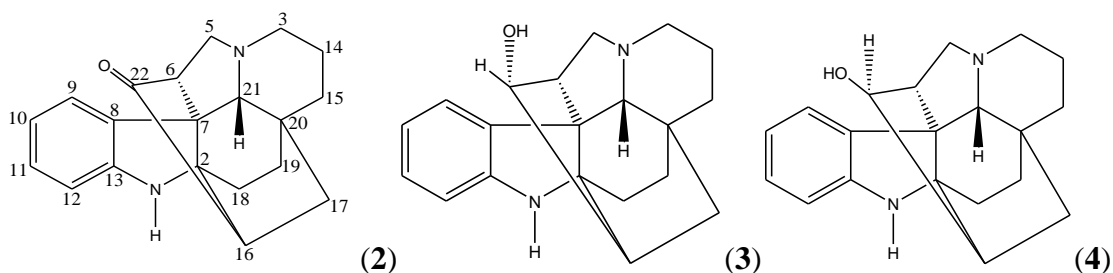
A espécie *A. macrocarpon* Mart. (Figura 1) conhecida como guatambu, guatambu-do-cerrado, pau-pereira, muirajuçara e peroba-cetim atinge de 8 a 18 metros de altura e possui troncos com 25 a 35 cm de diâmetro. Sua madeira é própria para a construção civil e marcenaria, prefere terrenos secos em áreas de cerrado, sua ocorrência se estende da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás (LORENZI, 2002). A espécie *A. macrocarpon* Mart. faz parte da série macrocarpa, junto com outras duas espécies a *A. duckei* Hub. e *A. verbascifolium* Müll.-Arg. (PEREIRA et al., 2007).

De acordo com Lorenzi (2002) estas espécies são sinonímias botânicas da *A. macrocarpon*. Em um estudo do gênero constatou-se que os principais alcaloides encontrados na *A. duckei*, também estão presentes na *A. macrocarpon*. Embora, sejam encontradas em diferentes regiões climáticas apresentam semelhanças filogenéticas (FERREIRA-FILHO et al., 1966). Outras sinonímias científicas são: *A. macrocarpum* Mart., *A. platyphyllum* Müll. Arg., *A. verbacifolium* Müll. Arg. e *A. gardneri* Mull. Arg.

Existem poucos relatos na literatura sobre *A. verbascifolium*, o alcaloide isolado desta espécie foi o 3(S)-4(S)-N-formilcopsanol (**1**) (BOLZANI et al., 1987; PEREIRA et al., 2007).



Os alcaloides indólicos copsanona (**2**), copsanol (**3**), 18-epicosanol (**4**), 10-lactamaepicosanol (**5**) foram isolados das espécies *A. duckei* e *A. macrocarpon* (FERREIRA FILHO et al., 1966; PEREIRA et al., 2007).



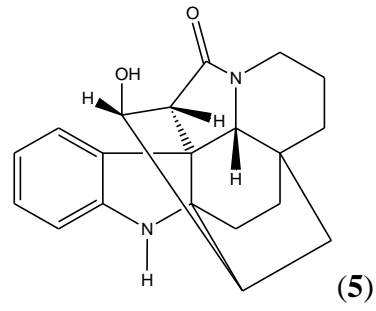
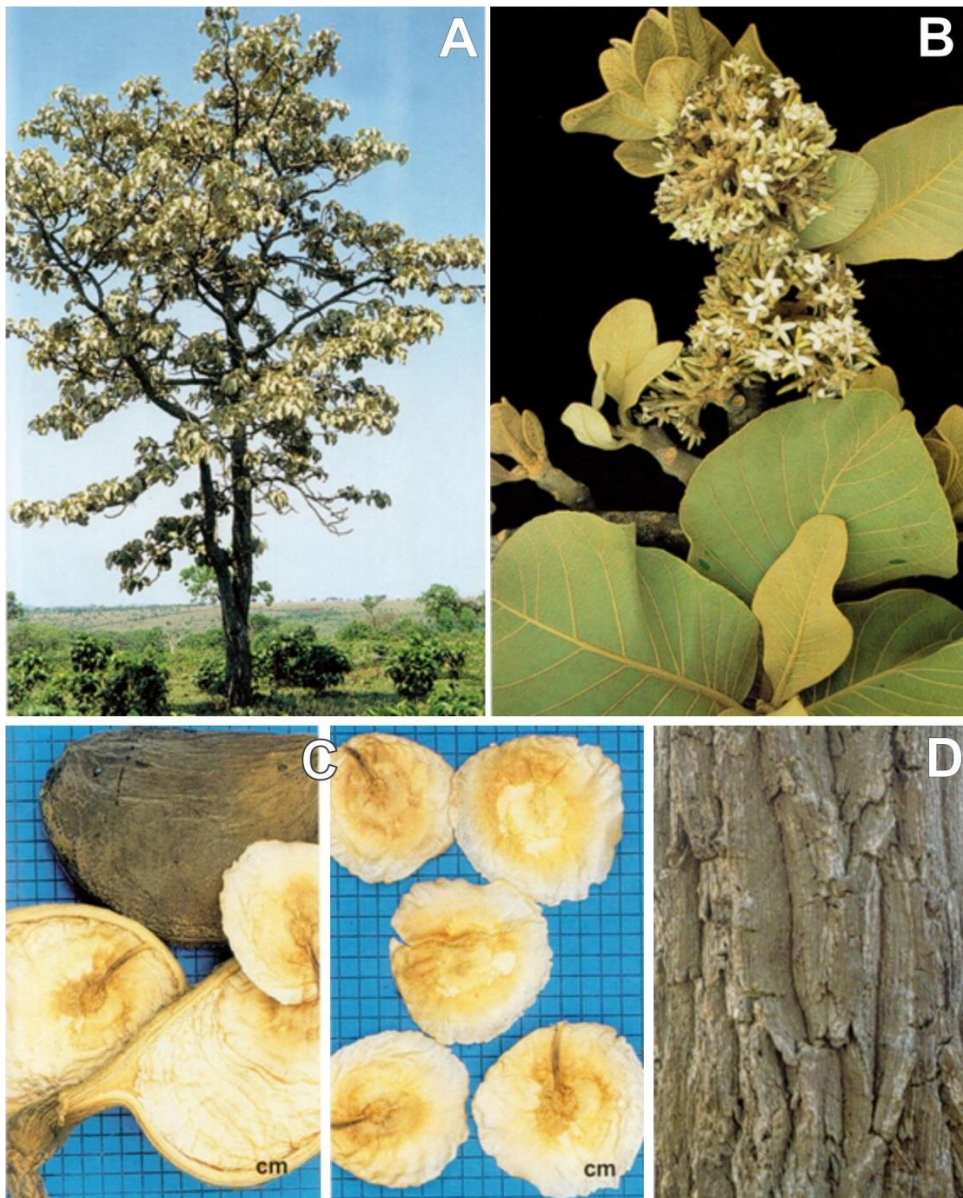
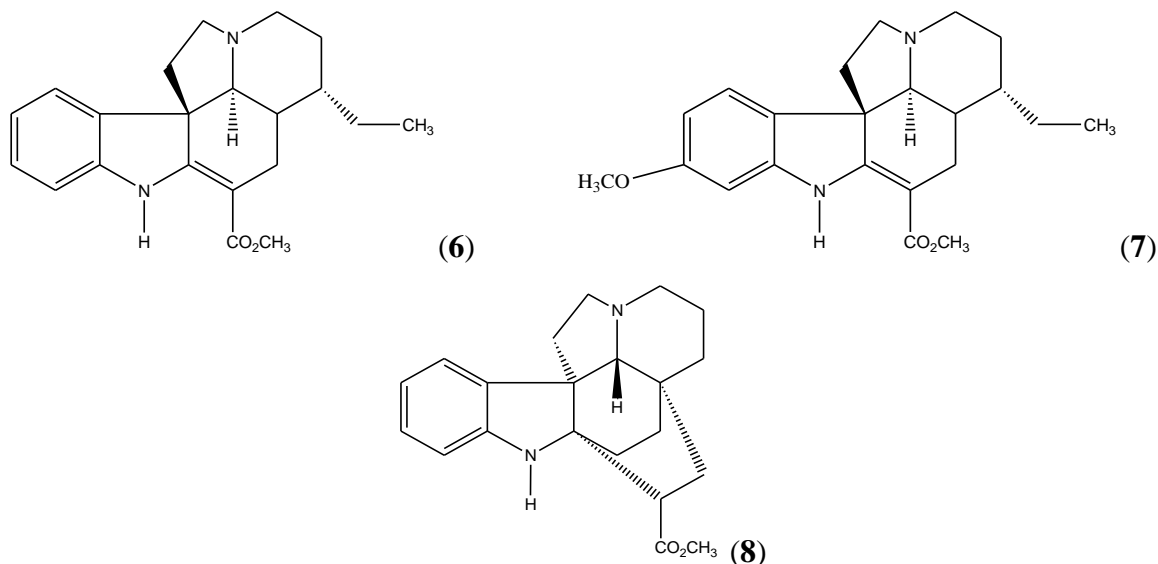


Figura 1 - Partes aéreas da *A. macrocarpon* Mart.



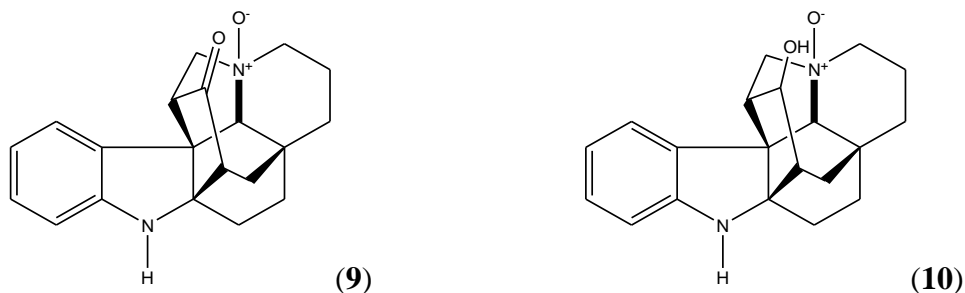
Legenda: (A) árvore de *A. macrocarpon* Mart. (B) folhas e flores, (C) sementes, (D) casca do caule. **Fonte:** Lorenzi (2002).

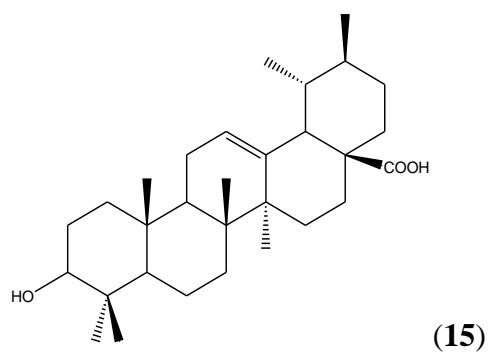
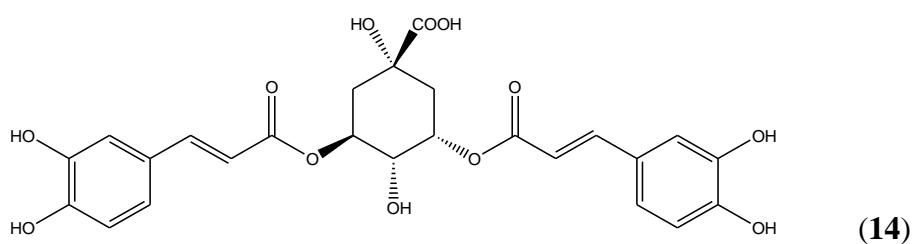
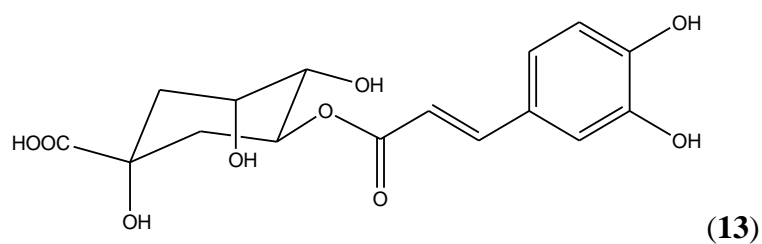
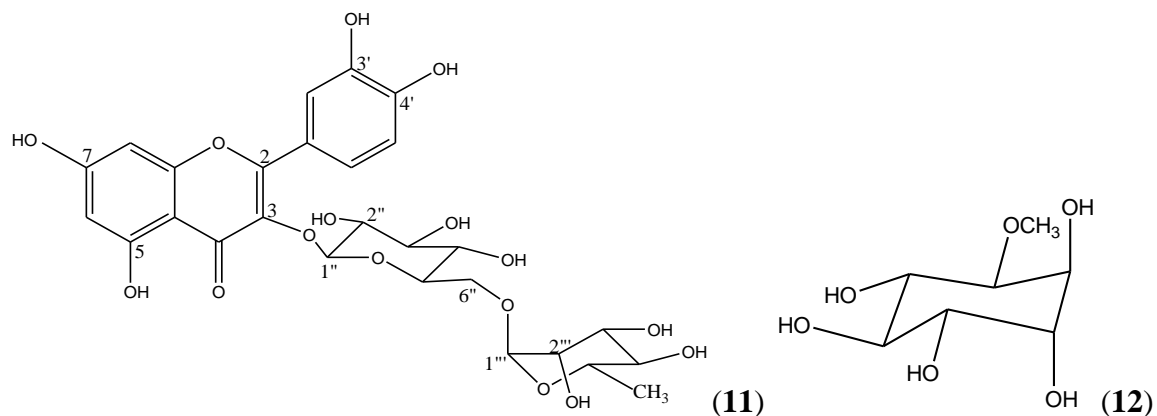
Mitaine et al. (1996) isolaram das sementes de *A. macrocarpon* os alcaloides (-)-vincadiformina (**6**), ervinceína (**7**), além da copsanona (**2**), copsanol (**3**), 18-epicosanol (**4**) e copsinina (**8**) da casca do caule de *A. macrocarpon*.



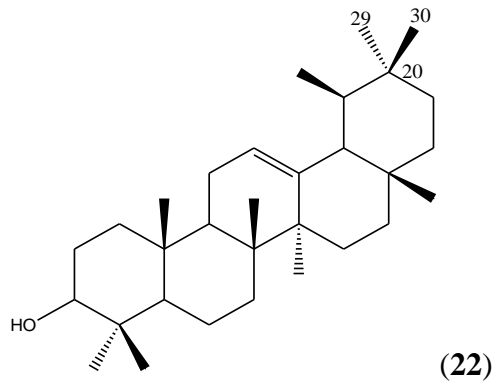
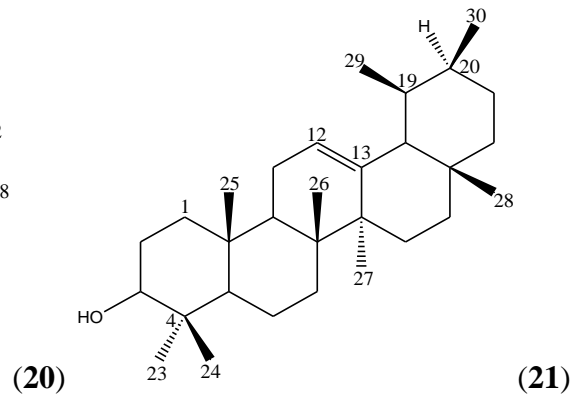
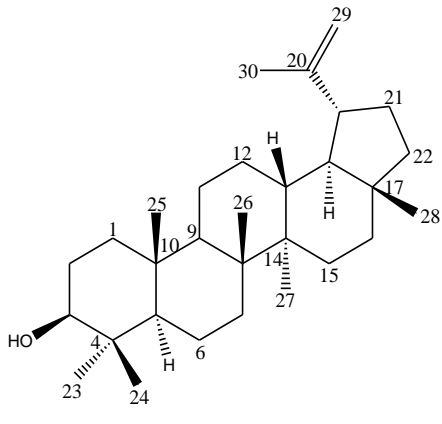
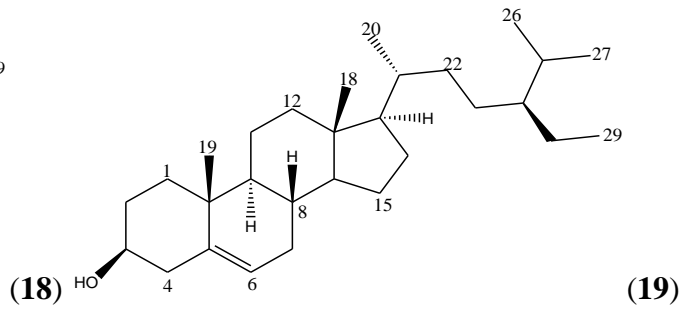
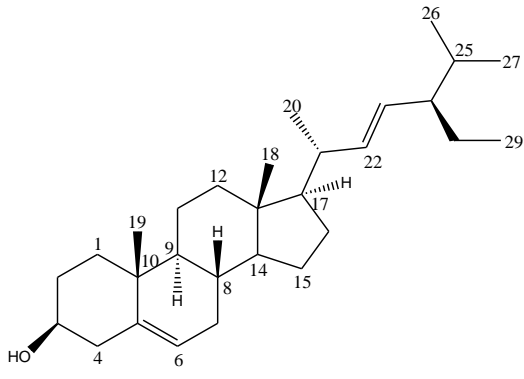
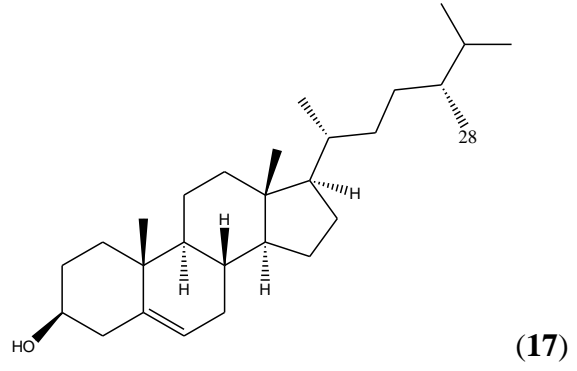
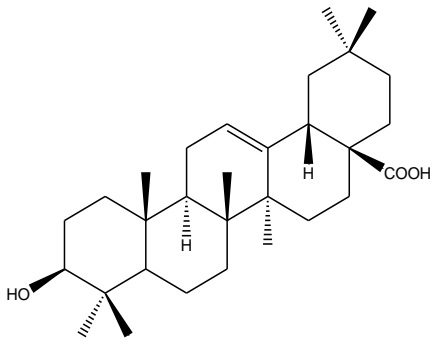
Recentemente, Bannwart (2012) isolou das folhas de *A. macrocarpon* cinco alcaloides indólicos, sendo alguns já descritos na literatura para a espécie como, a copsanona (**2**), copsanol (**3**) e a copsinina (**8**). Além do copsanol-*N*-óxido (**9**) e a copsanona-*N*-óxido (**10**), descrito na espécie pela primeira vez na literatura. A predominância dos alcaloides indólicos na *A. macrocarpon* são do tipo copsano (PEREIRA et al., 2007).

Além, dos alcaloides também foram isolados, o flavonoide rutina (quercetina-3-rutinosídeo) (**11**) e o *L*-2-*O*-metil-*chiro*-inositol (**12**), dois ácidos clorogênicos denominados de ácido 5-*O*-cafeoilquinico (**13**) e o ácido 3,5-*O*-dicafeoilquinico (**14**). E o triterpenoide ácido ursólico (**15**) (BANNWART et al., 2013a; BANNWART et al., 2013b).





Aquino (2012) também isolou das folhas de *A. macrocarpon* o ácido úrsólico (15), este estava em mistura com o ácido oleanólico (16). Do caule de *A. macrocarpon*, Aquino (2012) isolou uma mistura de três esteroides identificada como campesterol (17), estigmasterol (18), e sistosterol (19). Também foram identificados os triterpenos lupeol (20), α -amirina (21) e β -amirina (22).



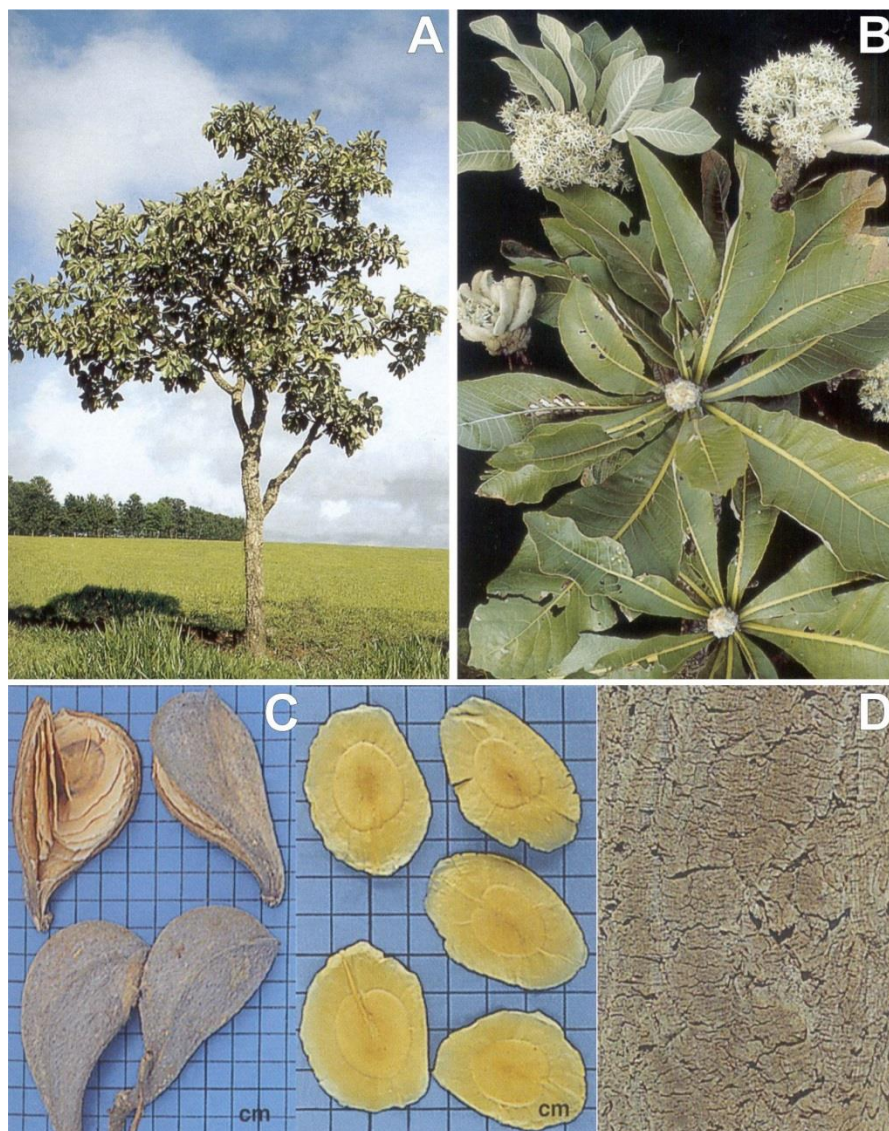
Dados da literatura descreveram sobre a atividade biológica desta espécie, como o estudo realizado por Mesquita et al. (2005) sobre a atividade do extrato hexano das folhas de *A. macrocarpon* contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Posteriormente, Mesquita et al. (2007) avaliaram o extrato etanólico das cascas da raiz de *A. macrocarpon* contra o *Plasmodium falciparum*, e a toxicidade destes sobre células mamárias, indicando um índice de seletividade potencialmente seguro para terapia. Recentemente, De Paula, Dolabela e Oliveira (2014) relataram a partir de uma revisão de literatura, o uso de espécies de *Aspidosperma*, como a *A. macrocarpon*, com potencial atividade antimalária.

Estudos diversificados foram descritos na literatura para a espécie *A. macrocarpon*, como atividade inseticida do extrato hexânico da raiz, sobre o caruncho do feijão (*Zabrotes subfasciatus*) (SILVA et al., 2009), e a ação anti-hipertensiva em ratos com o extrato etanólico das folhas de *A. macrocarpon* (OLIVEIRA et al., 2012), além da, atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico das folhas, frações e do alcaloide copsanona sobre linhagens de células tumorais (BANNWART et al., 2013b), a avaliação da atividade antioxidante e análise das principais características do extrato seco atomizado da casca do caule de *A. macrocarpon*, em comparação ao extrato seco desta (AZEVEDO, 2013), e estudos relacionados com a fenologia e metabolismo nutricional da *A. macrocarpon* (CASTRO et al., 2013).

3.1.2 *Aspidosperma tomentosum* Mart.

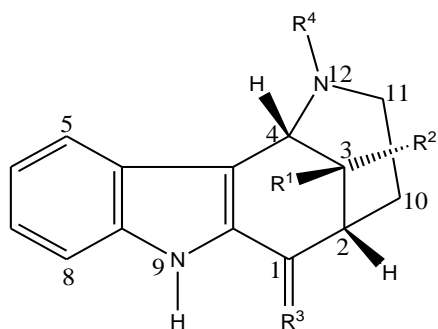
A espécie *A. tomentosum* Mart., (Figura 2) denominada pela medicina popular de peroba-do-campo, pereiro-do-campo, peroba-do-cerrado, pau-pereiro-do-campo, taroba é uma planta que atinge entre 5 e 8 metros de altura, com ramos grossos e tronco tortuoso, apresenta casca grossa e cortiça. Ela é encontrada no cerrado brasileiro (Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, parte de Minas Gerais, oeste da Bahia e sul do Piauí), e também no Paraguai e na Bolívia. As sinônimas botânicas desta espécie são: *A. velutinum* Fisch. Ex Müll. Arg., *A. tomentosum* var. *velutinum* Müll., *A. tomentosum* var. *angustifolium* Müll. Arg. (LORENZI, 2002).

Figura 2 - Partes aéreas da *A. tomentosum* Mart.



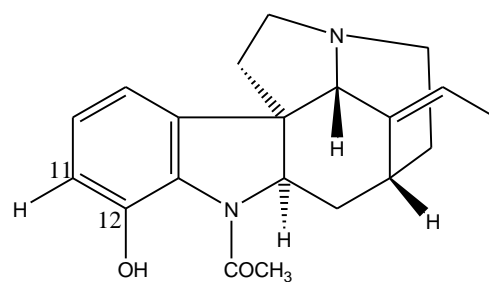
Legenda: (A) árvore de *A. tomentosum* Mart. (B) folhas e flores, (C) sementes, (D) casca do caule. **Fonte:** Lorenzi (2002).

A partir dos estudos químicos realizados com *A. tomentosum* foram isolados os alcaloides indólicos uleína (23), 3-epi-uleína (24) e *N*-acetil-12-hidroxiaspidospermatidina (limatinina) (25) (ARNDT et al., 1967; BOLZANI et al., 1987; PEREIRA et al., 2007). Outro estudo relatou a presença da uleína (23) no caule, folhas, e sementes da *A. tomentosum*. Além dos alcaloides quebrachamina (26), aspidospermidina (27), razinilama (28), 1-acetil-aspidospermidina (29), 1-acetil-17-metoxi-aspidospermidina (30) (AQUINO, 2006).

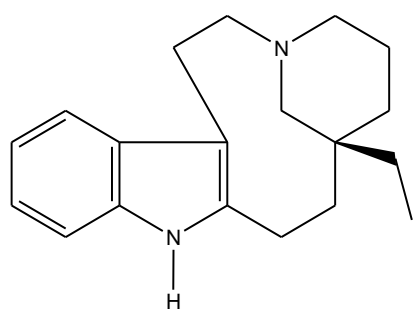


(23) $R^1 = C_2H_5$; $R^2 = H$; $R^3 = CH_2$; $R^4 = CH_3$

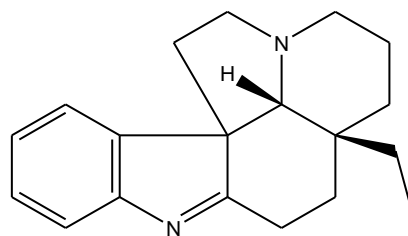
(24) $R^1 = H$; $R^2 = C_2H_5$; $R^3 = CH_2$; $R^4 = CH_3$



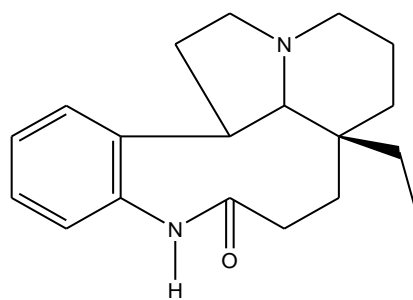
(25)



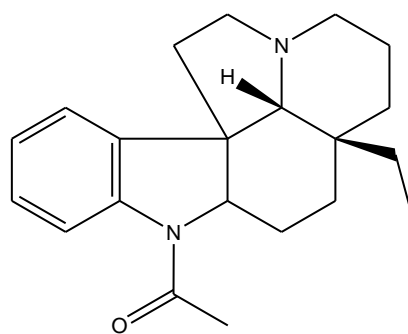
(26)



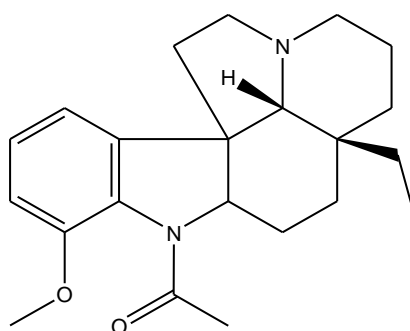
(27)



(28)



(29)



(30)

Em relação às atividades biológicas reportadas para os extratos e frações de *A. tomentosum*, verificou-se a ação tripanocida da uleína (23) sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (OLIVEIRA et al., 2001). Os extratos brutos do caule, sementes, folhas e frutos de *A.*

tomentosum também foram avaliados sobre linhagens de *P. falciparum* com resultados promissores para todos os extratos testados (DOLABELA et al., 2012; DE PAULA; DOLABELA e OLIVEIRA, 2014). Enquanto, a atividade antiviral do extrato dos frutos sobre o vírus do herpes simples (HSV-1) foi inativa (BRANDÃO et al., 2011).

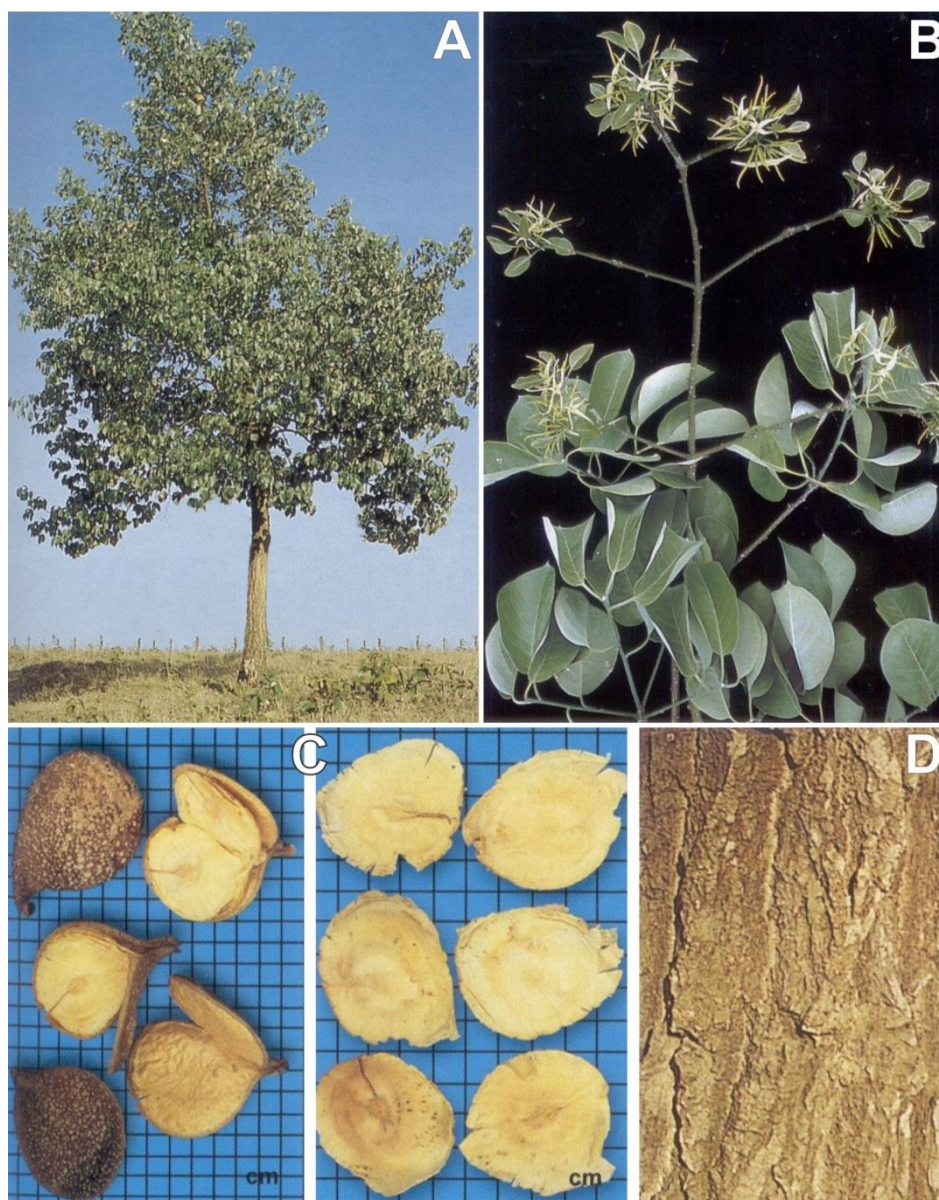
Outro estudo avaliou a atividade antiproliferativa do extrato bruto e frações das partes aéreas de *A. tomentosum* sobre linhagens de células tumorais, e o melhor resultado foi obtido com a fração terpênica, em linhagens de células de câncer de mama e pulmão (KOHN et al., 2006). O uso na medicina tradicional desta espécie, também foi reportado como anti-hiperlipêmica e anorexígena (SILVA et al., 2010), além da ação antinociceptiva e anti-inflamatória descrita para a casca do caule de *A. tomentosum* (AQUINO et al., 2013).

3.1.3 *Aspidosperma pyrifolium* Mart

A espécie *A. pyrifolium* Mart. (Figura 3) chamada pelos nativos de pereiro, pau-pereiro, pereiro-de-saia e pereiro-vermelho, pereiro-branco e pereiro-preto, dependendo da região de ocorrência. Ela é uma planta com altura variável, pode apresentar-se como arbusto em regiões da caatinga mais seca, ou atingir até 8 metros de altura. Normalmente encontrada na região da caatinga, nos estados do nordeste brasileiro até o norte de Minas Gerais e no Pantanal matogrossense. Apresenta como sinônimas científicas: *A. refractum* Mart., *A. bicolor* Mart., *A. molle* Mart., *A. martii* Manso ex Mart., *A. guaraniticum* Malme, *A. pyrifolium* var. *molee* (Mart.) Müll. Arg. (LORENZI, 2002).

De acordo com a compilação dos dados referentes à *A. pyrifolium* realizados por Pereira et al. (2007), existe uma grande variedade de tipos de alcaloides indólicos como, o β -anilinoacrilato de metila, aspidospermidina, pirifolidina, aspidospermina, aspidoscarpina, aspidofractina e quebrachamina.

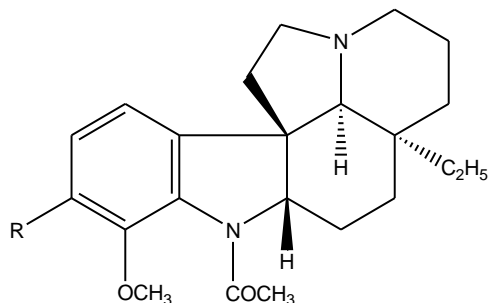
Figura 3 - Partes aéreas da *A. pyriformium* Mart.



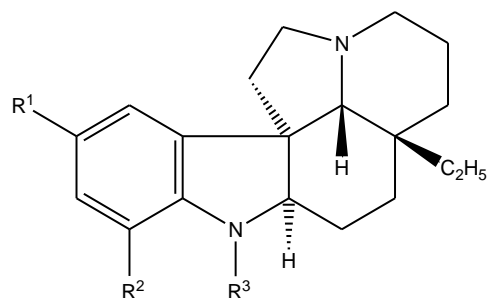
Legenda: (A) árvore de *A. pyriformium* Mart. (B) folhas e flores, (C) sementes, (D) casca do caule. **Fonte:** Lorenzi (2002).

Entre os alcaloides indólicos presentes na *A. pyriformium* tem-se a (-)-vincadiformina (6), também descrita para *A. macrocarpon*. E os alcaloides quebrachamina (26), e aspidoespermidina (27) descritos anteriormente para *A. tomentosum*. Vários outros alcaloides da *A. pyriformium* como: (+)-pirifolidina (31), (+)-aspidoespermina (32); (-)-aspidoespermina (33), desacetilaspidoespermina (34), (-)-Des-*N*-metoxiaspidoespermina (35), 10-metoxiaspidoespermidina (36), palosina (37), *O*-desmetilpalosina (38), *N*-formilaspidoespermidina (39), desmetoxivalesina (40), aspidoesfractina (41), (+)-pirifolina (42), 6-desmetoxipirifolina (43), refractidina (44), (-)-aspidoofilina (45), *N*-formilaspidoesfractinina (46), 15-desmetoxipirifolina (47), desidroxiplocidina (48), haplocina (49), acuamicina (50),

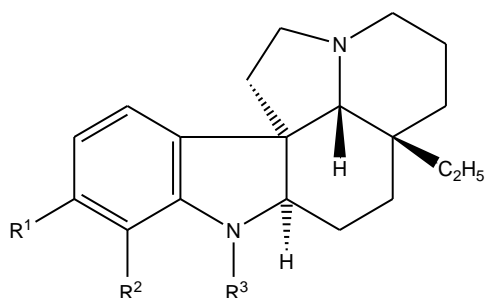
diidrocondilocarpina (tubotaiwina) (**51**) (CRAVEIRO; MATOS e SERUR, 1983; MITAINE et al., 1996; OLIVEIRA, 1999; ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2007; PEREIRA et al., 2007; GUIMARÃES; BRAZ-FILHO e VIEIRA, 2012).



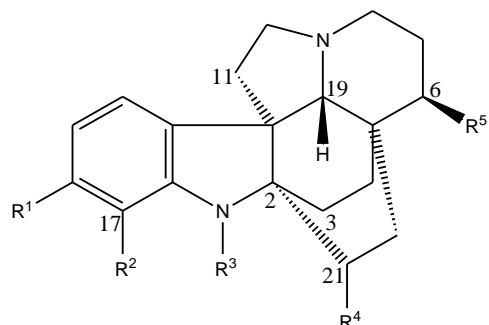
- (**31**) R=OCH₃
 (**32**) R=H



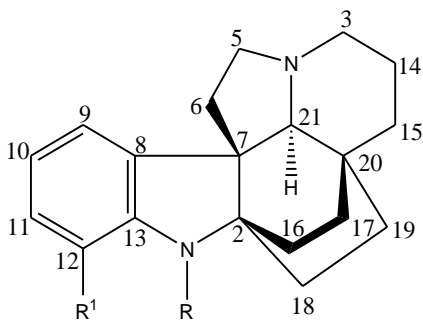
- (**33**) R¹=H; R²=OCH₃; R³=COCH₃
 (**34**) R¹=R³=H; R²=OCH₃
 (**35**) R¹=H; R²=H; R³=COCH₃
 (**36**) R¹=OCH₃; R²=R³=H
 (**37**) R¹=H; R²=OCH₃; R³=COC₂H₅
 (**38**) R¹=H; R²=OH; R³=COC₂H₅



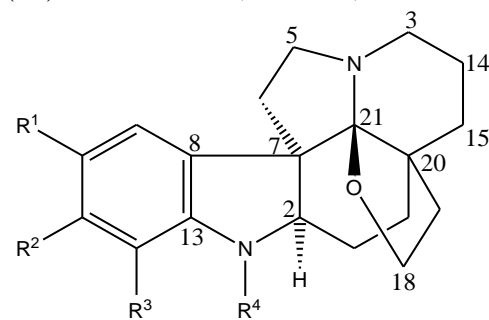
- (**39**) R¹=H; R²=OH; R³=CHO
 (**40**) R¹=R²=H; R³=CHO



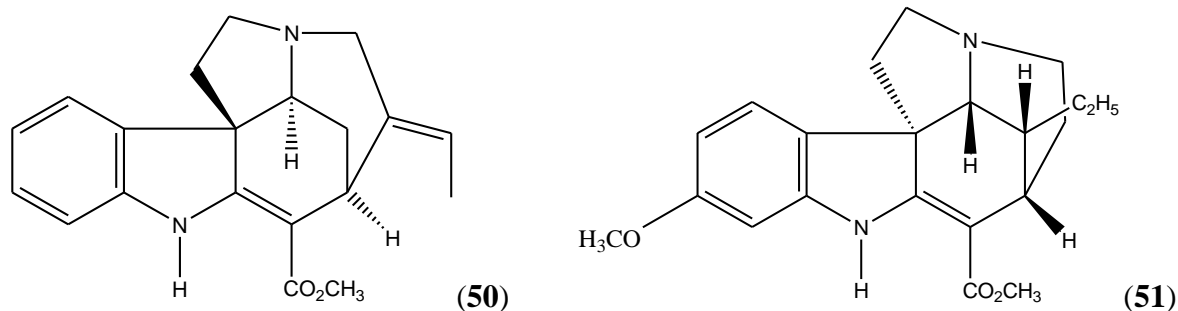
- (**41**) R¹=R²=R⁵=H; R³=CHO; R⁴=COCH₃
 (**42**) R¹=R⁴=H; R²=R⁵=OCH₃; R³=COCH₃
 (**43**) R¹=R⁴=R⁵=H; R²=OCH₃; R³=COCH₃
 (**44**) R¹=R⁴=R⁵=H; R²=OH; R³=COCH₃
 (**45**) R¹=R⁴=R⁵=H; R²=OH; R³=CO₂CH₃



- (**46**) R=CHO; R¹=H
 (**47**) R=COCH₃, R¹=OCH₃



- (**48**) R¹=R²=R³=H; R⁴=COCH₃
 (**49**) R¹=R²=H; R³=OH; R⁴=COC₂H₅



As características dos diferentes tipos ou classes de alcaloides indólicos de acordo com, o esqueleto estão diretamente relacionadas com a biogênese. Contudo, o sistema indólico comum a todos os alcaloides desta classe é derivado do aminoácido L-triptofano (SCHRIPSEMA; DAGNINO e GOSMANN, 2007).

Alguns estudos biológicos da *A. pyrifolium* estão relacionados à atividade inseticida do extrato da casca, dos frutos e da raiz desta espécie (TORRES; BARROS e OLIVEIRA, 2001; TRINDADE et al., 2008). Existem relatos sobre a toxicidade desta espécie, ocasionando teratogenicidade em herbívoros que se alimentam das suas folhas (RIET-CORREA; MEDEIROS e SCHILD, 2012). Embora, o decocto da casca do caule desta espécie seja usado na medicina popular, para o tratamento de inflamação do trato urinário (AGRA; FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007).

Sobre a atividade da *A. pyrifolium* contra bactérias, o extrato bruto da casca foi inativo contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Echerichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (OLIVEIRA et al., 2009a). Assim como, o extrato bruto do caule e da casca do caule de *A. pyrifolium* foram inativos sobre o protozoário *P. falciparum* (BOURDY et al., 2004; PEREIRA et al., 2007; DE PAULA; DOLABELA e OLIVEIRA, 2014). Porém, os alcaloides aspidoespermina (**31**, **32**) e o *N*-formilaspidospermidina (**39**) presentes na *A. pyrifolium* foram ativos sobre o *P. falciparum* (MITAINE-OFFER et al., 2002).

3.2 - Atividades Biológicas, Estudos Químicos e o Gênero *Aspidosperma*

Com base em informações etnofarmacológicas, alguns estudos sobre a ação biológica das espécies de *Aspidosperma* foram relatados. Como por exemplo, a ação antibacteriana dos extratos de *A. ramiflorum* que demonstraram uma atividade boa sobre *B. subtilis* e *S. aureus* e dos extratos de *A. pyricolum* e *A. olivaceum* que apresentaram ação moderada sobre *B. subtilis* (OLIVEIRA et al., 2009a). Em outro trabalho, Tanaka et al. (2006) haviam observado que a ação antibacteriana de *A. ramiflorum* mostrou-se maior para as frações alcalóidicas, sendo

identificados posteriormente os alcaloides bisindólicos ramiflorina A e B, como ativos para bactérias Gram-positivas. Estes alcaloides também se mostram ativos contra *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (FERREIRA et al., 2004; TANAKA et al., 2007; CUNHA et al., 2012). A ramiflorina A apresentou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (SOUZA et al., 2006).

Verpoorte, Ruigrok e Baerheim (1982) e Verpoorte et al. (1983) descreveram a atividade antimicrobiana de alcaloides isolados da casca do caule de *A. marcgravianum*, o tetrahydrosecamina e o di-hidrocorinateol que foram mais ativos contra *S. aureus* e *B. subtilis*. Posteriormente, os autores realizaram o estudo com os alcaloides isolados da casca da raiz de *A. excelsum*, que demonstraram atividade sobre *B. subtilis*, os mais ativos foram o tetrahydrosecamina, 11-metoxi-tubotaiwina, 16-dimetoxi-carbonil-tetrahydrosecamina e o didesmetoxi-carbonil-tetrahydrosecamina (VERPOORTE et al., 1983). Os extratos etanólicos da casca do caule de *A. pyricolum* e *A. olivaceum* também apresentaram atividade sobre *B. subtilis* (OLIVEIRA et al., 2009a). O extrato diclorometano metanol (1:1) do caule, galhos e folhas, e raiz de *A. pachypterum* demonstraram boa atividade sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida albicans* (SUFFREDINI, et al., 2002). O extrato etanólico do caule da espécie *A. polyneuron* apresentou atividade antifúngica contra o *Cladosporium herbarum* (FERREIRA et al., 2003). E o extrato bruto diclorometano da madeira de peroba-rosa (*Aspidosperma* sp.) foi ativo sobre a bactéria *Proteus mirabilis* (GRANATO et al., 2005).

Grande parte dos estudos biológicos, com extratos e alcaloides isolados das espécies de *Aspidosperma* está centrada na atividade antibacteriana, antifúngica e antiprotozoário. Em especial contra os protozoários *P. falciparum*, *Leishmania* spp e *Trypanosoma* spp.

Aquino (2012) reportou em dados compilados da literatura, que grande parte dos estudos biológicos com extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de *Aspidosperma*, volta-se para atividade antibacteriana (cerca de 50% dos dados levantados pelo autor). E os demais estudos, estão divididos em outras atividades biológicas, sendo majoritários os estudos com protozoários. Dentre as substâncias isoladas das espécies de *Aspidosperma* prevaleceram os alcaloides (AQUINO, 2012).

Weniger et al. (2001) verificaram que o extrato do caule de *A. megalocarpon* Mull. Arg. apresentou atividade sobre linhagens de *P. falciparum*. Outro estudo demonstrou a ação antiplasmodial dos alcaloides *N*-formilaspidospermidina e aspidospermina isolados de *A. megalocarpon* Mull. Arg. e *A. pyrifolium* Mart. (MITAINE-OFFER et al., 2002). Estudos com os extratos da casca do caule de *A. vargasii*, *A. desmathum* também demonstraram ação contra linhagens de *P. falciparum* (ANDRADE-NETO et al., 2007; MESQUITA et al., 2007).

Outras espécies de *Aspidosperma* relatadas na literatura, ativas contra malária são: *A. quebrancho-blanco* Zschlecht., *A. polyneuron* Muell., *A. album* (Vahl) Benoist, *A. discolor* DC., *A. excelsum* Benth., *A. nitidum* Benth. Entretanto, faltam estudos comprobatórios quanto à segurança do consumo destas plantas (BRANDÃO et al., 1992; BOURDY et al., 2004; BOTSARIS, 2007; COUTINHO et al., 2013).

Dolabela et al. (2012) a partir de informações do uso popular de espécies vegetais contra a malária avaliaram extratos de diferentes partes da planta *A. olivaceum*, *A. parvifolium* e *A. ramiflorum*, contra o *P. falciparum* e todos os extratos testados foram ativos.

Chierrito et al. (2014) relataram a atividade do extrato da casca do caule e das folhas de *A. olivaceum*, assim como das suas frações e substâncias isoladas contra o *P. falciparum*. Os alcaloides monoterpênicos indólicos ativos foram a aspidoscarpina, uleína, aparicina, desmetoxi-aspidospermina, aspidospermina, *N*-metil-tetrahydro-olivacina e a olivacina.

Outras três espécies de *Aspidosperma* foram estudadas recentemente para o tratamento da malária, os alcaloides isolados de diferentes partes da *A. ulei* foram ativos sobre o *P. falciparum*. Os alcaloides ativos foram o 3,4,5,6-tetrahydro- β -ioimbina, 20-*epi*-dasicarpidona e 20(*E*)-*nor*-subicanidina (TORRES et al., 2013).

Reina et al. (2011) avaliaram a atividade de alcaloides isolados das espécies *A. rigidum* e *A. schultesii* contra promastigotas de *L. infantum* e epimastigotas de *T. cruzi*. Os alcaloides ativos foram da espécie *A. rigidum*, a carboxina A sobre *L. infantum* e a carboxina B, ativa sobre *L. infantum* e *T. cruzi*.

Recentemente, mais de vinte alcaloides foram isolados de diferentes partes das espécies *A. desmanthum* e *A. spruceanum*, e foram testados contra *L. infantum* e *T. cruzi*. Sendo a aspidolimina, aspidoscarpina e tubotaiwina mais seletivas contra *L. infantum* (REINA et al., 2014).

Poucos estudos relatam a atividade das *Aspidosperma* contra vírus. Um dos poucos trabalhos, encontrados na literatura descreve que o extrato do caule e folhas de *A. cylindrocarpon* foi inativo. Assim como, o extrato do caule de *A. parvifolium* que foram inativos sobre o vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) e contra o vírus da encefalomioscardite (EMCV) (BRANDÃO et al., 2011)

Apesar da utilização pela medicina tradicional da maioria das espécies de *Aspidosperma* ser voltada ao tratamento de doenças infecciosas, há levantamentos etnofarmacológicos e estudos científicos que relatam o uso destas espécies sobre outras patologias.

Em relação às atividades farmacológicas dos alcaloides indólicos, isolados de espécies do gênero *Aspidosperma*, há poucos relatos de estudos para justificar o seu uso popular. O

trabalho realizado por Pereira et al. (2006a) resultou no isolamento de uma mistura de esteroides (sitosterol e estigmasterol), triterpenos pentacíclicos (α -amirina e lupeol), o *L*-2-*O*-metil-*chiro*-inositol e de um alcaloide carbonílico (ácido 3-harmanocarboxílico), do cerne de *A. nitidum* Benth ex Müll. Arg. Entretanto, a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória só foram demonstradas para o extrato etanólico. Estudos sobre, a ação das frações alcaloídicas de *A. ulei* em receptores α 2-pré-sinápticos, podem explicar o uso tradicional da espécie de *Aspidosperma* na disfunção erétil (CAMPOS et al., 2006; CAMPOS et al., 2007). Souza et al. (2008b) relatou a atividade hipolipêmica do extrato bruto metanólico de *A. subincanum*.

Recentemente, foi avaliado o potencial citotóxico e genotóxico do alcaloide aspidospermina isolado da *A. polyneuron*, sobre células de carcinoma de hepatócitos humano, com diminuição significativa da sobrevivência destas células. Este alcaloide também foi ativo contra promastigotas de *L. amazonensis* (COATTI et al., 2015).

Espécies de *Aspidosperma* são investigadas quimicamente e ênfase especial é dada aos alcaloides indólicos. Segundo a literatura, a busca por novas substâncias bioativas de espécies de *Aspidosperma* representa grande interesse científico, visto a diversidade estrutural dos alcaloides indólicos presentes em praticamente todas as espécies do gênero.

Os estudos fitoquímicos para o isolamento dos alcaloides de *Aspidosperma* são descritos na literatura há muitos anos. Arndt et al. (1967) isolaram alcaloides do caule de *A. rigidum* caracterizados como picralina, desacetilpicralina, reserpilina e (-)-carapanaubina, do caule da espécie *A. nitidum* isolaram o alcaloide 10-metoxidihidrocorinateol. E do fruto da *A. pyricolum* foi isolado o alcaloide (+)-stemmadenina, e do caule os alcaloides uleína, apaciricina e o dasicarpidona, da espécie *A. nigricans* foram obtidos os alcaloides (+)-uleína e dihidrouleína. Além, dos alcaloides da madeira de *A. marcgravianum* identificados como aricina, reserpilina, (-)-desmetoxiaspidospermina e o (+)-aspidoscarpina.

Ferreira et al. (2006) identificaram a presença dos alcaloides indólicos cilindrocarpidina e homocilindrocarpidina no extrato da raiz de *A. polyneuron*, e no extrato da folha foi identificado o éster dioctil do ácido adípico. Posteriormente, Santos et al. (2008) isolaram do extrato etanólico da raiz de *A. polyneuron* um novo alcaloide, o 2,7-dihidroxiuebrachamina.

Jácome et al. (2004) também reportaram a presença do alcaloide uleína na *A. parvifolium* conhecida como “pau pereira”. Assim, como identificaram a presença dos alcaloides epiuleína, aparicina e desmetiluleína, e a presença do triterpeno lupeol e do esteroide estigmasterol, estes dois últimos são substâncias comumente encontradas em espécies de *Aspidosperma*.

Kobayashi et al. (2002) isolaram alcaloides indólicos pentacíclicos das cascas de *A. subincanum* denominados de subincanadinas A, B e C. Santos et al. (2009) em uma análise fitoquímica da casca do caule de *A. subincanum* verificaram a presença de alcaloides indólicos, saponinas, terpenoides, esteroides e taninos, sendo a guatambuina e o ácido oleico os constituintes majoritários.

Entre outras espécies de *Aspidosperma* que apresentaram estudos fitoquímicos, podem ser citados os constituintes químicos da *A. illustre*, onde foram isolados dois alcaloides monoterpênicos indólicos, β -ioimbina e 1,2-dihidroaspidospermidina, além de moléculas de triterpenos (BARBOSA et al., 2010). Alcaloides indólicos tipo elipticina e *N*-metiltetra-hidroelipticina foram isolados de *A. vargasii* e a substância aspidocarpina de *A. desmanthum* (HENRIQUE; NUNOMORA e POHLIT, 2010).

Dois novos alcaloides indólicos com esqueleto plumerano foram obtidos dos extratos metanólicos da casca do caule e das sementes de *A. spruceanum*, o alcaloide spruceanuminas A e B (OLIVEIRA et al., 2009b). Da espécie *A. excelsum* foi isolado da casca da raiz um novo alcaloide quaternário denominado excelsinidina (LAYNE et al., 2007). E das cascas de *A. nitidum* foi identificado o alcaloide indólico contendo um sistema 1,2,9-triazabicyclo, denominado braznitidumina (PEREIRA et al., 2006b).

Outros estudos descritos na literatura reúnem compilação de dados em revisões, sobre os diferentes tipos de esqueletos de alcaloides indólicos presentes em diversas espécies de *Aspidosperma*. Como o realizado por Guimarães, Braz-Filho e Vieira (2012) que descreveram o esqueleto de 35 alcaloides indólicos do tipo plumerano, como inúmeros alcaloides da *A. cylindrocarpon* entre eles, a cilindrocarina, cilindrocarpidina, cilindrocarpinol e outros. Assim como, as revisões realizadas por Pereira et al. (2007) e por Oliveira et al. (2009c) sobre os alcaloides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma* referenciados anteriormente neste estudo. E recentemente, a revisão de literatura descrita por Aquino et al. (2015) a respeito dos alcaloides terpenos do gênero *Aspidosperma*, relatou sobre a origem biosintética destes na planta, a síntese total de vários alcaloides e a sua importância na síntese orgânica e química medicinal. Os autores exploraram também, dados relacionados à diversidade estrutural dos alcaloides das *Aspidosperma* e o potencial biológico que estes representam. Bem como, a descrição de rotas sintéticas de alcaloides e sua importância para obtenção de substâncias químicas, sem a exploração de recursos naturais.

Apesar da gama de trabalhos na literatura, sobre o isolamento químico de alcaloides indólicos das espécies de *Aspidosperma*, novas estruturas químicas de diferentes classes químicas de metabólitos primários e secundários estão sendo identificadas, comprovando a

diversidade química destas espécies. Longe de serem esgotados, os estudos sobre o isolamento químico e atividade biológica das espécies de *Aspidosperma* são continuamente reportados na literatura.

3.3 - Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas provocadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, e fazem parte das doenças tropicais negligenciadas podendo manifestar-se como leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, levando a morbidade e/ou a mortalidade (TIUMAN et al., 2011; ALVAR et al., 2012; CHOUHAN et al., 2014; OMS, 2014 e 2015b). Embora, a leishmaniose visceral seja letal se não tratada, a leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, e apresenta variações de manifestações clínicas, que podem variar de pequenos nódulos a destruição das mucosas. Mais de 700 mil novos casos ano são detectados no mundo para leishmaniose cutânea, sendo endêmica em mais de 70 países no mundo, e 75% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (TIUMAN et al., 2011; ALVAR et al., 2012; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; CHOUHAN et al., 2014; OMS, 2014 e 2015b).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2015b) atualmente, as leishmanioses são prevalentes nos continentes americanos, africano, asiático e europeu, sendo que 98 países em cinco continentes são considerados zonas endêmicas e destes, 76 são países em desenvolvimento.

No Brasil, as leishmanioses são prevalentes em todos os estados, sendo responsáveis por altas taxas de mortalidade (GENARO; REIS, 2005). A leishmaniose tegumentar americana (cutânea ou mucocutânea) é uma doença endêmica em vários estados do Brasil, sendo crescente o número de notificações, atingindo 490.606 casos confirmados de 1980 a 2001 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). Segundo, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2013) a cada ano, 28 mil pessoas são afetadas pela forma cutânea da leishmaniose. Por esse motivo, essa doença constitui um problema de saúde pública em diversos estados do Brasil, principalmente nas regiões norte e nordeste, onde se encontra o maior número de casos (73,6%) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001; NEGRÃO e FERREIRA, 2014; IPD-FARMA, 2015).

Apesar, dos números alarmantes de incidência da leishmaniose no mundo, incluindo o Brasil como país endêmico da doença, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) julga que estes dados são subestimados. Alvar et al. (2012) a partir da atualização da base de dados,

sobre leishmanioses no mundo, constatou que a credibilidade do levantamento de dados é dúbia, pois as incidências para doenças negligenciadas, como as leishmanioses tem distribuição focal em locais remotos, tornando difícil a extrapolação de dados oficiais.

3.3.1 – Ciclo biológico e Formas Evolutivas de *Leishmania* spp

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem ao reino Protozoa, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A espécie que será utilizada neste estudo é a *Leishmania amazonensis*, pertencente ao subgênero *Leishmania*, e está agrupada no complexo *L. (L) mexicana*. Os parasitos apresentam dois estágios de desenvolvimento distintos, a promastigota que se encontra no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (fêmea de flebótomos) e amastigota, formas intracelulares presente no sistema monocítico fagocitário do hospedeiro vertebrado (SHAW, 2011; GOTO; LINDOSO, 2012; BRASIL, 2013; REY, 2013; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

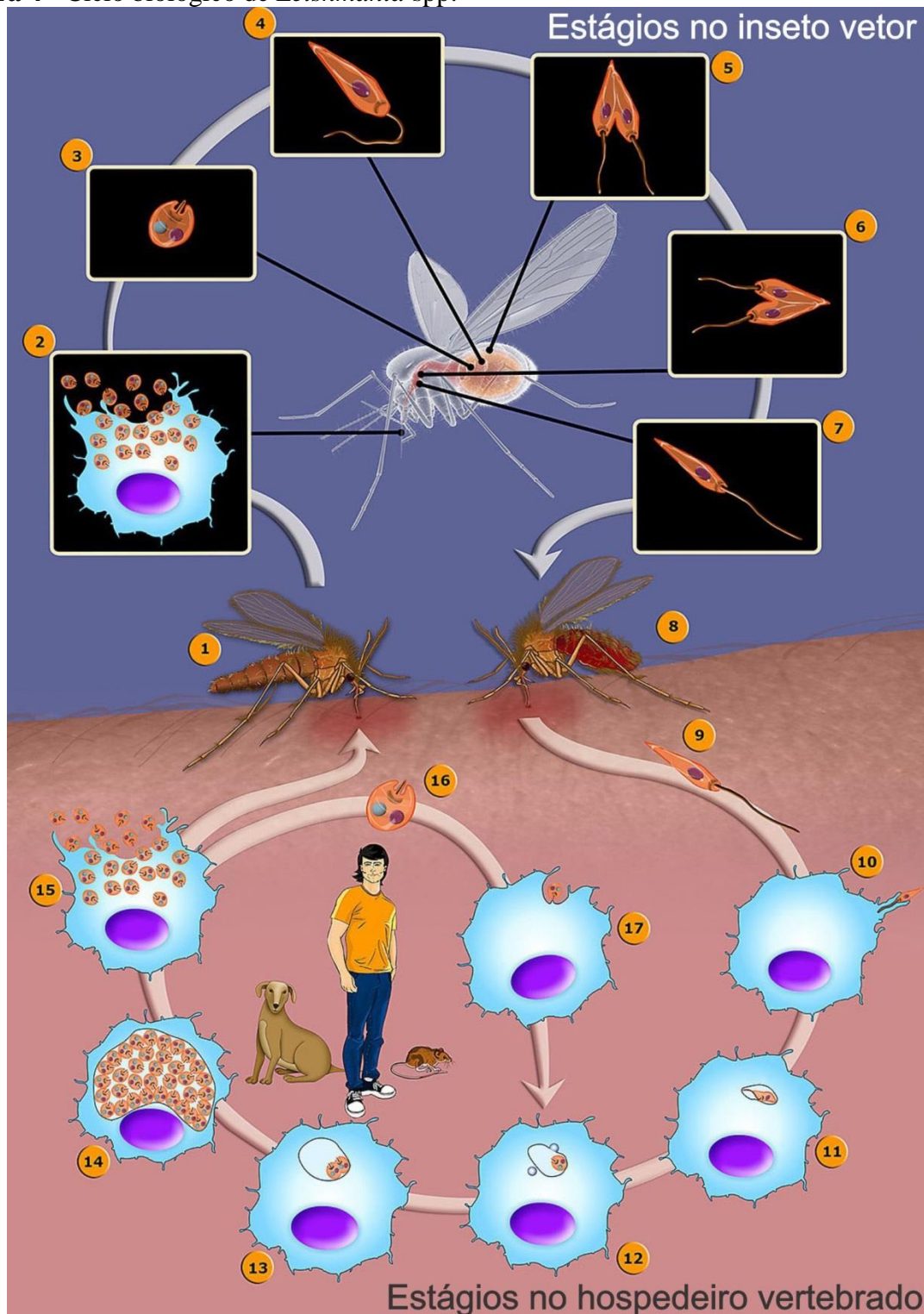
Os insetos vetores ou transmissores são conhecidos como flebótomos (ordem díptera, família Psycodidae, subfamília Phlebotominae), são as fêmeas do gênero *Lutzomia* infectadas com as formas promastigotas de *Leishmania* spp., que tem importância epidemiológica no novo mundo (Américas) e o gênero *Phlebotomus* no velho mundo (Europa, Ásia e África). Estes recebem várias denominações entre elas, mosquito palha, birigui, tatuquira, asa branca e asa dura. A transmissão ocorre porque estes insetos são hematófagos, as fêmeas de flebotomíneos infectadas durante o repasto sanguíneo inoculam os parasitos no hospedeiro vertebrado. Cerca de 70 espécies de animais, incluindo os humanos, são hospedeiros naturais de espécies de *Leishmania* (MIRANDA; DIAS, 2011; GOTO; LINDOSO, 2012; BRASIL, 2013; BAHMANI et al., 2014; OMS, 2015b).

Espécies do gênero *Leishmania* incluem um vasto número de protozoários unicelulares eucarióticos, que apresentam um ciclo celular heteroxênico ou digenético, por alternar o ciclo de vida no inseto vetor (formas promastigotas extracelulares) e no hospedeiro vertebrado (formas amastigotas intracelulares), este pode ser o homem (ciclo antroponótico) ou animais silvestres ou domésticos (ciclo zoonótico), ambos são considerados importantes reservatórios envolvidos na manutenção do parasito (CUNNINGHAM, 2002; BORGES; REIS e BARCINSKI, 2011; BRASIL, 2013; TEIXEIRA et al., 2013; REY, 2013; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

O ciclo biológico da *Leishmania* (Figura 4) começa quando a fêmea adulta de flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo células (macrófagos teciduais) contendo amastigota, estas no intestino do inseto vetor se diferenciam em promastigotas procíclicas (formas com flagelos proeminentes) e por divisão binária (metaciclogênese) originam as promastigotas metacíclicas (formas infectivas). Estas ficam localizadas na faringe e cavidade bucal (probóscide do inseto), durante um novo repasto sanguíneo o inseto vetor regurgita o parasito e este é inoculado em um novo hospedeiro vertebrado. Estas promastigotas metacíclicas são capazes de aderir à membrana dos macrófagos, por possuírem glicoconjugados e desencadear a fagocitose. As promastigotas metacíclicas são fagocitadas especialmente pelos macrófagos teciduais, são incorporados no fagolisossomos (vacúolo parasitóforo) e diferenciam-se em amastigotas. No interior do vacúolo parasitóforo o pH é ácido, associado à temperatura corporal do mamífero, são fatores que influenciam a diferenciação das promastigotas para formas amastigotas, estas se dividem por fissão binária intensamente, provocando a lise do macrófago. As amastigotas livres podem ser fagocitadas por outros macrófagos. A infecção do inseto vetor (hospedeiro invertebrado) ocorre durante o repasto sanguíneo no humano ou animal infectado. Então, as amastigotas são diferenciadas em promastigotas no intestino do inseto vetor e reinicia-se um novo ciclo (CUNNINGHAM, 2002; KAYE; SCOTT, 2011; TEIXEIRA et al., 2013; REY, 2013; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

As formas evolutivas de *Leishmania* spp. estão ilustradas na Figura 5, estes protozoários apresentam características celulares que são específicos desses micro-organismos distinguindo-as das células de mamíferos, como por exemplo, a mitocôndria única, ramificada, distribuída por todo corpo celular do parasito, que contém um DNA mitocondrial denominado de cinetoplasto (kDNA). Por ser específica destes protozoários, a mitocôndria torna-se um alvo terapêutico interessante. Contudo, há várias estruturas e organelas que as espécies de *Leishmania* compartilham com os mamíferos (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

Figura 4 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Legenda: (1) Flebotomíneo fêmea pica mamífero infectado, (2) macrófago infectado com amastigotas, (3) amastigotas, (4) promastigota procíclica, (5) promastigota procíclica no intestino médio no inseto vetor, em fissão binária, (6) migração das promastigotas procíclicas para o intestino anterior do inseto vetor, (7) diferenciação formas promastigotas metacíclicas, (8) promastigotas metacíclicas são regurgitadas durante repasto sanguíneo do inseto vetor (9) promastigotas metacíclica (10) promastigotas metacíclica infecta macrófagos (11) promastigota metacíclica são diferenciadas em amastigotas (12) amastigotas ligam-se a membrana do vacúolo parasitóforo (13) multiplicação das amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo (14) multiplicação intensa das amastigotas (15) amastigota rompe o macrófago (16) forma amastigota livre (17) amastigota infecta outro macrófago. **Fonte:** a autora, 2015, adaptado de TEIXEIRA et al., 2013

A forma promastigota (Figura 5) apresenta corpo alongado, entre 14 e 20 μm de comprimento, possuem núcleo central arredondado, que se apresenta envolvido pelo retículo endoplasmático rugoso, que assim como nas células de mamíferos está relacionado com a síntese de proteínas. O cinetoplasto no interior da mitocôndria fica situado próximo à porção anterior do corpo do parasito, onde se encontra a bolsa flagelar, uma invaginação da membrana plasmática por onde passa o flagelo que emerge do corpo basal, este proporciona movimento às promastigotas (REY, 2013; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

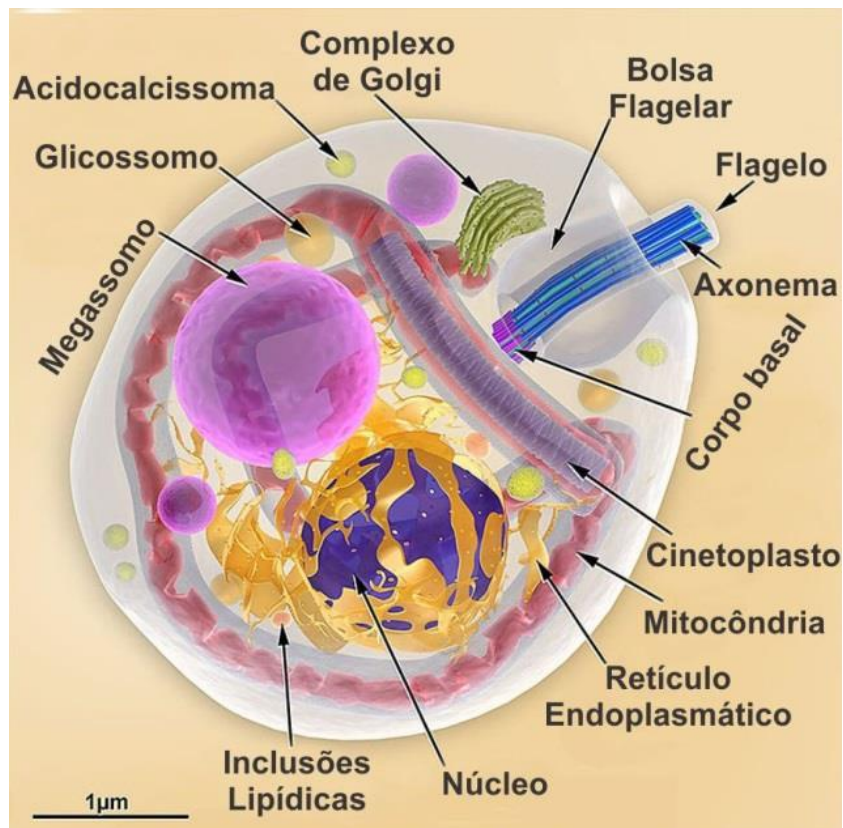
Figura 5 - Forma evolutiva de *Leishmania* spp. – promastigota.



Fonte: a autora, 2015, adaptado de TEIXEIRA et al., 2013

A forma amastigota (Figura 6) apresenta aspecto ovoide, possui um flagelo curto intracelular, alojado no interior da bolsa flagelar, o que impossibilita a mobilização desta forma evolutiva. Apresenta núcleo arredondado, envolto por retículo endoplasmático rugoso como na forma promastigota. As amastigotas do complexo *Leishmania*, medem cerca de 3 μm de comprimento, como a *L. amazonensis* (REY, 2013). As amastigotas apresentam um lisossomo grande, encontrado apenas neste estágio evolutivo, denominado de megassomo, esta organela promove a lise de macromoléculas adquirida por endocitose. Os megassomos são ricos em proteases de cisteína (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS e SOUZA, 2001).

Figura 6 - Forma evolutiva de *Leishmania* spp. - amastigota.



Fonte: a autora, 2015, adaptado de TEIXEIRA et al., 2013

A versatilidade das formas amastigotas subverte as principais vias de sinalização intracelular do macrófago, com isto o parasito consegue se manter e proliferar no interior do vacúolo parasitóforo. Os lipofosfoglicanos (glicopeptídeos) promovem a inibição da atividade da proteína quinase c, o que acarreta na redução da produção de radicais livres de oxigênio. Outros mecanismos de defesa celular também são inibidos, propiciando a infecção

que progride despercebida pelo sistema imune (CUNNINGHAM, 2002; BORGES; REIS e BARCINSKI, 2011; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

Muitas estruturas citoplasmáticas das *Leishmania* spp. são responsáveis pela manutenção da homeostase do parasito, estas fornecem informações de interesse biológico por constituírem prováveis alvos terapêuticos. Como a bolsa flagelar, que é uma estrutura típica dos protozoários flagelados e principal local de endocitose e exocitose no parasito, a presença de vesículas e túbulos que promove a movimentação da membrana realizam estas funções (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010; ARAÚJO-SANTOS et al., 2014; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

As organelas relacionadas com o sistema exocitose e endocitose em *Leishmania* spp. contribuem para sobrevivência deste parasito em diferentes ambientes. Estes parasitos possuem também um sistema de túbulos multivesicular que se estendem da porção anterior, a partir da bolsa flagelar até a porção posterior do corpo celular. No processo de endocitose, os endossomos que se formam juntam-se neste sistema interligado aos lisossomos, formando um sistema dinâmico, caracterizado por fluxo contínuo de vesículas no interior do citoplasma do parasito (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

O complexo de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso, nos tripanosomatídeos têm a mesma estrutura básica que a encontrada em mamíferos (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010). Assim como, os corpos lipídicos responsáveis por estocar e processar lipídios, igualmente presentes nas células de mamíferos e nos protozoários. Além de fonte nutricional, os lipídios desempenham um papel importante na produção de eicosanoides, durante o processo de interação parasito-hospedeiro. E o aumento destes corpos lipídicos na metaciclogênese e nas formas amastigotas, sugere que estão envolvidos com fatores de virulência (ARAÚJO-SANTOS et al., 2014).

Outra organela presente nos tripanosomatídeos são os acidocalcisomas, estas organelas de caráter ácido armazenam cálcio e fósforo, este último na forma de pirofosfato e polifosfato. Além de, estocar íons e enzimas relacionados com a regulação do pH e osmoregulação da célula. Estas organelas são encontradas também em bactérias e células humanas (DOCAMPO; MORENO, 2011).

Os glicosomos são organelas ligadas à membrana do protozoário, que armazenam enzimas da via glicolítica dos tripanosomatídeos. As enzimas presentes nesta organela, que participam de diferentes vias metabólicas, são cinética e estruturalmente diferentes daquelas presentes em células de mamíferos (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

A dinâmica das organelas presentes nos tripanosomatídeos são constantemente estudadas, do ponto de vista estrutural e cinético, conduzindo a uma melhor compreensão destes micro-organismos e sua interação com o hospedeiro vertebrado, contribuindo desta maneira para identificação de possíveis alvos terapêuticos.

3.3.2 - Manifestações Clínicas e Diagnósticos

As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies diferentes de *Leishmania* spp. Sendo que, as manifestações clínicas dependem da espécie envolvida e do estado imunológico do indivíduo infectado. As três formas básicas de manifestação da doença são, leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose mucocutânea (LMC). Entre as principais espécies causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil, estão a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. No velho mundo a principal espécie é a *L. major* (COSTA, 2011; BRASIL, 2013; OMS, 2015b).

A importância da leishmaniose tegumentar americana (LTA) é não somente pela alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas porque as lesões podem assumir formas destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, influenciando de maneira negativa a vida de indivíduos infectados (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A LC e a LMC são modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar, de maneira geral estas lesões, no Brasil, são de pele e/ou mucosa, podem ser únicas ou múltiplas, a característica da lesão é muito variável, sendo inaparentes, discretas, podendo evoluir para cura espontaneamente, ou formar várias lesões e até comprometer a mucosa com metástases e recidivas (COSTA, 2011).

A LC é a mais comum das leishmanioses, representa a manifestação clínica mais frequente. As lesões são exclusivamente cutâneas e pode evoluir para cicatrização. Iniciam como uma lesão eritemato-papulosa, evoluindo para pápulo-pustulosa, em seguida forma uma úlcera-crostosa e podem evoluir para úlceras com aspectos circulares, bordas infiltradas, em moldura, indolores e fundo com granulações grosseiras. Ocorrem mais comumente nas partes expostas do corpo, como braços, pernas, pescoço e cabeça. Normalmente, ocorrem em pequenos números, raramente são numerosas (até 2% dos casos de LTA), e quando ocorrem são caracterizada por leishmaniose cutânea disseminada, as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são também as causadoras da forma disseminada. A regressão das lesões deixam cicatrizes. O período de incubação é variável, pode levar 30 dias, ou até anos (CUNNINGHAM, 2002; COSTA, 2011; BRASIL, 2013).

A forma cutânea difusa (LCD), no Brasil, é causada pela *L. amazonensis*, esta forma é rara e grave, ocorre em indivíduos alérgicos, com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, sendo a resposta terapêutica falha (GOTINJO; CARVALHO, 2003; COSTA, 2011; BRASIL, 2013).

A forma da leishmaniose mucocutânea, é principalmente causada pela *L. braziliensis* na América do sul, contudo, já foram relatados casos onde evidenciou a presença da *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Ao contrário da LCD, a LMC se caracteriza pela exacerbação da resposta imunológica, por haver um exagero na resposta celular antileishmania. Este é um fator pelo qual ocorre a destruição do tecido, onde houver partículas de antígeno. As características clínicas desta infecção são a cronicidade e metástase em mucosas, que conduzem a desfiguração da região acometida no indivíduo. Pois, acometem a região do nariz, boca, olhos, podendo atingir a faringe e laringe. Este tipo de lesão não regride de forma espontânea e as recidivas são frequentes. Há suposições de que a infecção para mucosa sejam resultados da disseminação linfática ou hematogênica das amastigotas da pele, para a região naso-orofaríngea. Contudo, este mecanismo não está esclarecido (COSTA, 2011; BRASIL, 2013).

A forma clínica da leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar é considerada a mais importante, porque se não tratada pode ser letal. Entre as manifestações clínicas observa-se febre irregular, esplenomegalia, anemia e em estágio avançado caquexia, apresenta altas taxas de mortalidade. Sendo a febre o sintoma mais notável seguido da esplenomegalia, como segunda manifestação clínica mais importante. As principais espécies são *L. donovani*, no velho mundo e no novo mundo *L. infantum* e *L. chagasi*. Estes protozoários possuem tropismo visceral, as amastigotas vivem em células do sistema fagocítico mononuclear nas células de Kupffer, no fígado, em células do baço e da medula óssea. Podem infectar também os rins, pulmões e pele, e na corrente sanguínea, podem ser encontradas amastigotas em monócitos (REY, 2013; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014). Existe uma forma dermal de leishmaniose pós-calazar, tem aparência de uma mácula, pápula ou *rash* nodular, que acomete a face, troncos de indivíduos recuperados da LV, podem aparecer de seis meses a um ano após a aparente cura (BRASIL, 2013; RODRIGUES; GODINHO e SOUZA, 2014).

O diagnóstico clínico da LTA pode ser realizado com base nas características da lesão, associados à anamnese. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado mediante a pesquisa do parasito, diagnóstico imunológico ou molecular (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REY, 2013; BRASIL, 2013).

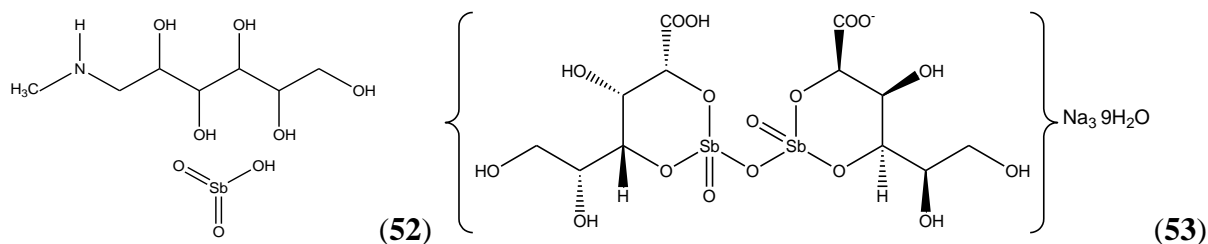
A pesquisa do parasito por método parasitológico é realizado por microscopia, a partir da visualização direta do parasito coletado de fluídos ou nas lesões do individuo infectado. Os procedimentos consistem de escarificação, biópsia e punção aspirativa. Quanto mais crônico for o processo, mais difícil de encontrar o parasito nas lesões. Pode-se também realizar o isolamento em cultivo *in vitro*. O exame imunológico do teste intradérmico da *Leishmania*, conhecido como Intradermoreação de Montenegro (IDRM), que se fundamenta na resposta de hipersensibilidade celular tardia. A leitura é visualizada após a inoculação do antígeno de *Leishmania* na derme do paciente, em casos positivos há formação de pápula no local da inoculação. Este ensaio é muito empregado na rotina laboratorial (GONTIJO; CARVALHO, 2003; REY, 2013; BRASIL, 2013).

Exames moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) vêm sendo utilizado para fins de pesquisa. Mas, na rotina é muito pouco usado, em virtude do alto custo, embora, a sensibilidade dos métodos parasitológicos tradicionais seja aumentada quando se acrescenta esta técnica (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2012; REY, 2013; BRASIL, 2013).

3.3.3 - Terapia Medicamentosa das Leshmanioses e Uso de Substâncias Combinadas

A terapia medicamentosa das leishmanioses é um desafio a ser superado, devido às poucas opções terapêuticas utilizadas a mais de seis décadas no mundo. E por se tratarem de doenças negligenciadas, que acometem, sobretudo, pessoas de baixa renda que residem em países em desenvolvimento, o interesse na inovação de fármacos pela indústria farmacêutica é subestimado. Além, da ocorrência de cepas resistentes que conduz a falha na terapia, e pode ser desencadeada, entre outros motivos, pela desistência dos pacientes ao tratamento, devido a gama de efeitos colaterais provocados pelos medicamentos (LIMA et al., 2007; GOTO ; LINDOSO, 2012; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; JAIN; JAIN, 2013).

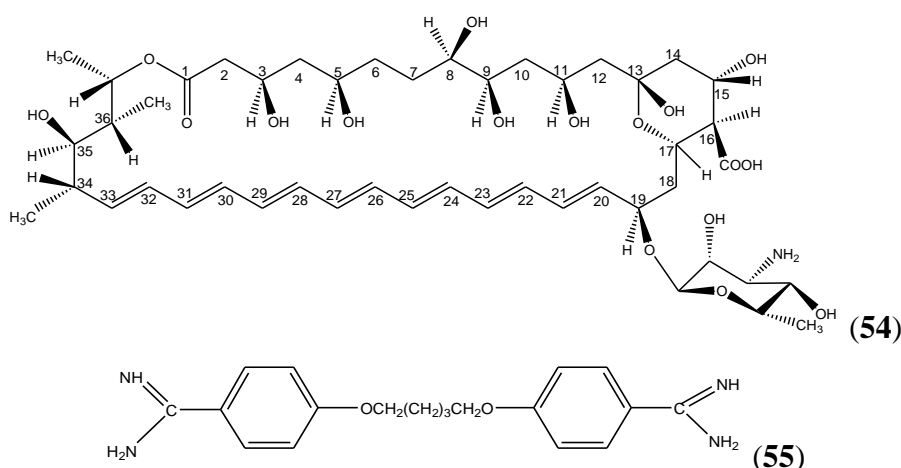
O que há na terapêutica como fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes representados pelo Glucantime[®] - (52) (antimoniato de *N*-metilmeglumina) no Brasil, e o Pentostan[®] - (53) (estibogluconato de sódio) nos Estados Unidos da América (MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2013).



A administração destes medicamentos é por via intramuscular, endovenosa ou via intralesional. Embora, os antimoniais sejam utilizados para todas as formas da leishmaniose, a forma mucocutânea tem resposta mais lenta e maior chances de recidivas. Para exercer a atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas, os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) são reduzidos a antimoniais trivalentes (Sb^{3+}). O mecanismo de ação não é bem esclarecido, mas sabe-se que estes interferem na atividade das vias glicolíticas e oxidativa dos ácidos graxos do parasito (MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2013).

Os antimoniais apresentam efeitos colaterais como artralgia, mialgia, inapetência, cefaleia, febre, vômitos, tontura e edema no local da aplicação. Sendo limitante o seu uso, em função dos efeitos adversos relacionados à cardio, nefro e hepatotoxicidade. Sendo que, o esquema terapêutico envolve o deslocamento do paciente a unidade de saúde, diariamente por no mínimo 20 dias, dependendo da forma da leishmaniose e se não houver cicatrização, após três meses do término do tratamento, o mesmo pode ser repetido por mais 30 dias. Por serem abortivos, estes fármacos não devem ser administrados em gestantes (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2013).

Quando não há resposta satisfatória com os antimoniais ou na impossibilidade de uso destes, deve-se recorrer aos medicamentos de segunda escolha, como a anfotericina B (54) ou o isotionato de pentamidina (55) (BRASIL, 2013).



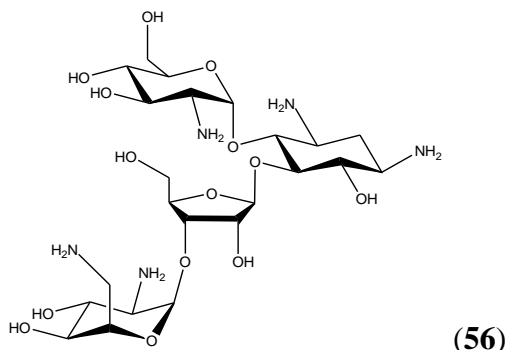
A anfotericina B é um antimicrobiano poliênico, utilizado como antifúngico em infecção sistêmica. Nas *Leishmania* spp. age no ergosterol presente na membrana citoplasmática do parasito, interferindo na permeabilidade e influxo de íons, têm ação leishmanicida sobre as formas promastigotas e amastigotas. A via de administração é endovenosa. Em caso de gestantes infectadas com *Leishmania* spp. anfotericina B é o tratamento de primeira escolha. Apresenta efeitos colaterais, sendo os mais comuns: náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia, alterações cardíacas e flebite no local da aplicação. Por isto, faz-se necessário o monitoramento semanal de enzimas hepáticas, função renal e dosagem de potássio sérico, além de eletrocardiogramas (FILIPPIN; SOUZA, 2006; MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; BRASIL, 2013).

As formulações lipídicas da anfotericina B, conhecida como anfotericina B lipossomal apresenta maior concentração hepática e esplênica do que a forma livre. Componentes lipídicos da anfotericina lipossomal ligam-se aos macrófagos. No Brasil, este fármaco é utilizado para o tratamento da LV. Para o uso em LT não há registro no Brasil, logo é considerada um fármaco “*off label*”, quando o uso do fármaco não consta na bula ou não foi aprovado por órgão competente, sendo prescrito por conta e risco do médico. Contudo, há relatos na literatura que o uso em LT é consistente, mas este medicamento apresenta alto custo, e não é ausente de efeitos colaterais. Embora, estes sejam menos intensos que a anfotericina B livre, os mais comuns para a forma lipossomal são: febre, cefaleia, vômitos, tremores, calafrios, dor lombar e flebite no local da infusão (MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011; BRASIL, 2013).

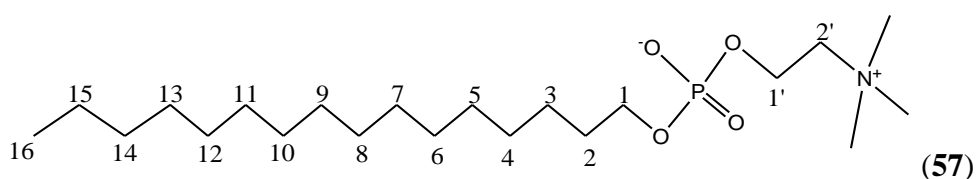
As pentamidinas são diaminas aromáticas, utilizadas como segunda escolha em áreas endêmicas dos continentes americanos, asiático e africano. A pentamidina interfere na síntese do DNA, modificando a morfologia do cinetoplasto e fragmenta a membrana da mitocôndria, da *Leishmania*, levando a morte do parasito. A via de administração é intramuscular profunda. As reações adversas mais comuns são: dor, endurecimento e abscesso estéril no local de aplicação, náuseas, vômitos, dor epigástrica, cefaleia, hipotensão, hipoglicemia e mialgias (MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; REY, 2013; BRASIL, 2013).

A paromomicina (56) é um antimicrobiano aminoglicosídeo, em *Leishmania* spp. interfere na atividade da mitocôndria. Ela é utilizada intramuscular contra LV e topicamente para tratar leishmaniose tegumentar (LT) no velho mundo, não sendo utilizada no novo mundo para o tratamento tópico de LT, exceto em caso de acometimento da mucosa por *L.*

braziliensis. A resposta da paromomicina frente à LT altera em função do parasito e da lesão (MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011). Os efeitos colaterais deste fármaco são principalmente nefro e ototoxicidade (LIMA et al., 2007).



Desenvolvido como fármaco anticancerígeno a miltefosina (57) (hexadecilfosfocolina), uma alquilfosfocolina, que atua sobre as espécies de *Leishmania* provavelmente por interferir nas membranas lipídicas, interagindo com fosfolípidos e esteróis. Estudos apontam que, a estrutura química da miltefosina possuiu alta afinidade por membranas, esta também alterou o funcionamento mitocondrial, conduzindo o parasito à morte celular. Contudo, o mecanismo de ação exato ainda não foi esclarecido (LIMA et al., 2007; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; REY, 2013). Estudos recentes demonstraram que a miltefosina agiu em *L. infantum* por promover alterações no metabolismo de lipídios internos neste parasito (VINCENT et al., 2014). Outro estudo, da miltefosina contra *L. amazonensis* apontou um aumento na dinâmica de lipídios e proteínas de membrana citoplasmática, em concentrações próximas a dose citotóxica (BUSTOS et al., 2014; MOREIRA et al., 2014).



A miltefosina foi o primeiro fármaco antileishmania de uso oral, selecionada em maio de 2005 na Índia, Nepal e Bangladesh para o tratamento da LV, com altas taxas de cura (superior a 90%), porém apresenta tempo de meia-vida de 152 horas, o que torna propício o desenvolvimento de cepas resistentes. Os efeitos colaterais mais comuns são náuseas, vômitos, sendo a teratogenicidade seu efeito adverso limitante para administração em grávidas (LIMA et al., 2007; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; REY, 2013; MOREIRA et al., 2014; KAUR et al., 2015).

A agência norte americana, Food and Drug Administration (FDA), em março de 2014 aprovou a miltefosina (Impavido[®]) para o tratamento das três formas de leishmanioses (FDA,

2014). Altas taxas de cura também são demonstradas para a miltefosina no tratamento de LC e LMC (COELHO et al., 2014; MOREIRA et al., 2014).

Vários fatores estão relacionados às dificuldades no controle e erradicação das leishmanioses, como falhas dos tratamentos medicamentosos, devido ao uso extensivo, abandono do tratamento pelo paciente, os efeitos colaterais, além da ausência de vacinas, falta de políticas públicas efetivas e do controle da disseminação do parasito e vetores (ALVIANO, et al., 2012; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; CHOUHAN et al., 2014).

O desenvolvimento de estratégias novas e eficazes é um dos requisitos para conter o avanço da resistência aos fármacos por protozoários como a *Leishmania*, devido à versatilidade do parasito, bem como para diminuir os efeitos colaterais da medicação, diminuição de custos e facilidade nas práticas terapêuticas, com o intuito de melhorar a adesão dos pacientes ao tratamento. Estas precisam ser prioridades na pesquisa para inovação e obtenção de medicamentos, sobretudo, para doenças negligenciadas como as leishmanioses.

A combinação de fármacos tem se tornado uma alternativa eficaz, para conter em especial a resistência do parasito aos fármacos e diminuir os efeitos colaterais.

Na literatura há relatos de ensaios clínicos da associação de fármacos com antimoniais pentavalentes, a fim de, conter as falhas na terapêutica, como por exemplo, a combinação de antimonial e alopuridol (hipouricemiante), antimonial e imiquimod (imidazoquinolina – uso tópico), contra LV, LC e LMC. Contudo, é necessário que haja uma eficácia acima de 80% da combinação para que a modificação da terapia seja aceita (LIMA et al., 2007; MOURA; DE JESUS e ALMEIDA, 2011).

De acordo, com Chou (2010) a combinação de fármacos visa o efeito terapêutico sinérgico, que apresenta vantagens como melhora da eficiência quando os fármacos são associados, em relação quando a eles isolados. Além, da redução do tempo de terapia, diminuição ou atraso no desenvolvimento de resistência, por atuar em múltiplos alvos terapêuticos simultaneamente, amenização dos efeitos colaterais, com isto, espera-se melhorar a aderência do paciente ao tratamento e reduzir custos.

O uso de terapias combinadas é utilizado há tempos em certas patologias, em especial as relacionadas com agentes infecciosos como vírus, bactérias e fungos. Como por exemplo, no tratamento da tuberculose e da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Outras doenças, também são tratáveis com o uso de medicamentos associados, como o diabetes *mellitus*, hipertensão e cânceres. Todas consideradas patologias complexas, cujo tratamento monoterápico não é eficaz (POURKAVOOS, 2012).

Vários estudos da combinação de fármacos, utilizados em favor do tratamento de leishmanioses, tem mostrado resultados convincentes e promissores para o futuro. Como exemplo, o uso de imunomoduladores (Interferon gama – IFN- γ) que atuam diretamente sobre macrófagos, e aumentam a eficácia do antimonial sobre LV, outro imunoadjuvante o pricolive[®] associado com miltefosina e paromomicina resultou em aumento da eficácia antileishmania (JAIN; JAIN, 2013). Santarem et al. (2014) evidenciaram a eficácia da associação da miltefosina com a pentoxifilina (metilxantina) para o tratamento da leishmaniose cutânea e os resultados foram melhores quando os fármacos foram combinados do que quando utilizada apenas a miltefosina.

A combinação ou associação de fármacos é um processo multifatorial, que culmina para o desenvolvimento de uma nova terapia, que deve ser mais eficaz que o uso dos fármacos sozinhos. Contribuindo também, para a gestão do ciclo de vida de fármacos e novas entidades químicas, neste caso maximizando os resultados comerciais do produto (POURKAVOOS, 2012).

3.3.4 - Morte Celular

A morte celular programada (MCP) é controlada por genes repressores e ativadores, que definem os eventos que estão relacionados neste tipo de morte celular. Quando se referem aos protozoários, parasitos unicelulares, como as espécies de *Leishmania*, a indução de morte celular de determinado número de parasitos pode ser altruísta, como forma de autocontrolar a população celular e evitar a morte do hospedeiro, ou em função da disponibilidade de alimentos. As interações entre subpopulações diferentes são fundamentais para a viabilidade da população do parasito, a fim de, proteger e perpetuar o seu genoma. Neste caso, a morte programada pode representar vantagens seletivas para micro-organismos unicelulares (BORGES; REIS e BARCINSKI, 2011; JAIN, et al., 2013).

Apesar, da complexidade dos fenômenos fisiológicos que envolvem os processos de morte celular, estes podem ser divididos em três tipos, morte celular programada por apoptose, autofagia ou necrose. São caracterizados por eventos bioquímicos e alterações morfológicas, que contribuem para diferenciação dos tipos de morte celular. Dependendo dos fatores que induzirem as alterações, pode haver predominância de um ou mais tipos de MCP (CLARKE, 1990; KROEMER et al., 2009).

A MCP por apoptose é caracterizada por redução do volume celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, arredondamento celular, com discreta ou nenhuma

modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas. Há manutenção da integridade da membrana citoplasmática até o processo final, sem liberação do conteúdo citoplasmático no meio extracelular. Entretanto, há perda de assimetria da membrana citoplasmática com externalização da fosfatidilserina, esta molécula é considerada patognomônica de células em processos apoptóticos, e é reconhecida por células fagocíticas. Ocorre também, alteração mitocondrial, como despolarização do potencial transmembrana da mitocôndria ($\Delta\Psi_m$), e formação de *blebs* de membrana (KROEMER et al., 2009; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; BORGES; REIS e BARCINSKI, 2011).

A autofagia é considerada um processo crucial para a célula, com a função primária de manter a homeostasia celular em condições de degradação e remodelação da célula. Contudo, se o estímulo destrutivo for contínuo, a MCP por autofagia é ativada, resultando em alterações que conduzem a morte da célula (BRENNAND et al., 2011). Morfologicamente a MCP por autofagia pode ser definida como, um tipo de morte celular que ocorre na ausência de condensação da cromatina e acompanha vacuolização intensa no citoplasma. Ao contrário da apoptose, onde as células estão associadas com fagocitose, células em morte por autofagia tem pouco ou nenhuma relação com fagócitos. A autofagia é denominada um processo de reciclagem, neste processo formam-se os autofagossomos ou vacúolos autofágicos, estes apresentam membranas duplas. A membrana externa do autofagossomo funde-se com a membrana do lisossomo, formando o autolisossomo, as vesículas presentes no interior do lúmen do lisossomo são chamadas de corpos autofágicos, que são degradadas por hidrolases lisossomais. Os produtos da degradação são conduzidos de volta ao citosol, via membrana lisossomal. Esta via autofágica é a mais comum, sendo denominada macroautofagia, não é seletiva, assim como a via microautofágica. Nesta última, os constituintes citoplasmáticos são apanhados diretamente pelos lisossomos, através das membranas desta organela (KROEMER et al., 2009; BRENNAND et al., 2011; JAIN et al., 2013).

A MCP por necrose também conhecida por morte celular citoplasmática, é morfolologicamente caracterizada pelo aumento do volume celular, edema de organelas, como dilatação da mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A evidência clássica de morte por necrose é a ruptura da membrana citoplasmática com perda do conteúdo intracelular, este evento ocorre de forma precoce na célula. Ocorre também a presença de vacuolização citoplasmática. Estas alterações são mediadas por vias de transdução de sinais e mecanismos catabólicos. Alguns autores denominam de necroptose, a necrose que ocorre de forma regulada, e não acidental (FESTJENS; BERGHE e VANDENABEELE, 2006; KROEMER et al., 2009; JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; JAIN, et al., 2013).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - ESTUDO QUÍMICO

4.1.1 - Coleta e Processamento do Material Vegetal

As cascas do caule, o caule, as folhas e os galhos de *A. macrocarpon* Mart., e a raiz, cascas da raiz, caule e cascas do caule de *A. tomentosum* Mart. foram coletadas em novembro de 2007 na cidade de Planaltina – GO – Brasil (15° 27' 10" Sul, 47° 36' 50" Oeste) e os frutos, flores, raízes, cascas da raiz, caule e cascas do caule de *A. pyrifolium* Mart., foram coletadas outubro de 2001 em São José da Tapera – AL (9° 33' 28" Sul, 37° 22' 51" Oeste).

As espécies foram identificadas pelo botânico Dr. JE de Paula, da Universidade de Brasília (UnB), onde uma exsicata de cada espécime está depositada. Número das exsicatas: *A. macrocarpon*: n. JEP3767 (UnB); *A. tomentosum* n. JEP 3732 (UnB); *A. pyrifolium* - n. JEP 3686 (UnB).

O material coletado foi seco em estufa de ar circulante (Marconi[®]) a temperatura média de 45 °C, durante 72 horas e moído em moinho de facas (Marconi[®] TE 048), na sequência foi devidamente acondicionado em lugar fresco e escuro para utilização na preparação dos extratos.

O processamento do material vegetal e a preparação dos extratos brutos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais - LPqRN, do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, co-ordenado pelo prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.

4.1.2 - Técnicas Cromatográficas

Os eluentes utilizados para cromatografia em coluna (CC), camada delgada (CCD) e camada delgada preparativa (CCDP) foram de grau P.A. (Synth[®], Nuclear[®], Merck[®]).

As frações obtidas por cromatográfica em coluna, em ordem crescente de polaridade, foram secas a temperatura ambiente em capela de exaustão, sob ventilação forçada. Após, foram analisadas em CCD para verificação qualitativa das amostras, posteriormente submetidas às análises espectrométricas. Para eliminação dos solventes de volumes maiores foi utilizado rota-evaporador modelo R-114 (BÜCHI[®]) e sistema de congelamento em nitrogênio líquido, seguido de liofilização em liofilizador – modelo: 1-2 CHRIST'ALPHA[®],

após a secagem as amostras foram armazenadas em recipientes fechados e mantidas em freezer.

4.1.2.1 - Cromatografia em Coluna (CC) de Adsorção à Pressão Negativa

Foi utilizada uma coluna de vidro com 6,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de comprimento, acoplada a Kitasato e este conectado a uma bomba de vácuo. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 com 70-230 mesh (63 a 230 μm) (MERCK[®]), e como fase móvel solvente puro ou misturas binárias. As frações foram eluídas na CC pelos solventes em escala eluotrópica.

4.1.2.2 - Cromatografia em Coluna (CC) de Adsorção - “Flash”

Foram utilizadas colunas de 2,0 cm de diâmetro por 40,0 cm de comprimento e de 1,5 cm de diâmetro por 30 cm de comprimento, acopladas a aparelho de ar comprimido – pressão positiva. Para a fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 de 230-400 mesh (63 a 37 μm) (MERCK[®]), na eluição foram empregadas fases móveis com solvente puro, misturas binárias, variando as proporções do gradiente em escala eluotrópica. As frações foram coletadas em tubos de ensaio.

4.1.2.3 - Cromatografia em Camada Delgada - CCD

Para realização das análises em CCD foram utilizadas cromatoplasas pré-fabricadas de alumínio com sílica gel 60 GF₂₅₄ (MERCK[®]) 20,0 x 20,0 cm com 0,2 mm de espessura (MERCK[®]). Após, aplicação e eluição das amostras nas placas, as mesmas foram visualizadas em câmara com lâmpada de ultravioleta (UV) em 254 e 366 nm, em seguida foram reveladas com reativo de Dragendorff¹, solução de anisaldeído², ou de vanilina sulfúrica³ e/ou reagente

¹ Dissolveu-se 5 g de carbonato de bismuto (INLAB[®]) em 50 mL de água, após adicionou-se cuidadosamente ácido clorídrico concentrado (SYNTH[®]), após foi acrescentado gradativamente o iodeto de potássio (SYNTH[®]), após completa dissolução, foi completado o volume para 100 mL com água. **Fonte:** SBF, (2014).

² Foi adicionado 0,5 ml de anisaldeído (NEON[®]) em 9 mL de etanol (95%), 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (SYNTH[®]) e 0,1 mL de ácido acético glacial (SYNTH[®]). **Fonte:** Chaves, 1997.

³ Foi adicionado 1 g de vanilina (SYNTH[®]) em etanol (SYNTH[®]) q.s.p. 100 mL, e 10 mL de ácido sulfúrico (SYNTH[®]) em etanol q.s.p. 100 mL, sob banho de gelo, foi aplicado 1:1 (vanilina:ácido sulfúrico – v/v). **Fonte:** Wagner e Bladt, 1996.

NP-PEG⁴. As placas foram aquecidas em estufa a 110 °C, para visualização de bandas, exceção para o reativo de Dragendorff, onde as bandas aparecem imediatamente ao aplicar o reagente. Como fase móvel foram utilizados solventes puros e misturas binárias ou terciárias de polaridades e proporções diferentes, e as suas relativas mobilidades foram expressas pelo fator de retenção (*R_f*), como base para estabelecer o melhor sistema eluente.

4.1.2.4 - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa – CCDP

A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi realizada em cromatoplaça pré-fabricada sobre suporte de vidro com sílica gel 60 GF₂₅₄ (20,0 x 20,0 cm) com 1,0 mm de espessura (MERCK[®]). As amostras aplicadas não ultrapassaram 50 mg/placa.

O procedimento foi realizado segundo descrito por Hostettmann; Marston e Hostettmann (2001).

4.1.3 – Métodos Espectroscópicos

Para a obtenção dos espectros na região do infravermelho (IV) as amostras foram preparadas em pastilha de KBr, em um espectrômetro BOMEM-MV 100 (Hartmann & Braun – Michelson[®]), na região de 400 a 4000 cm⁻¹.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos em aparelho Mercury Plus da Varian[®], operando a 300,06 MHz para o núcleo de ¹H e a 75,45 MHz para o de ¹³C, e em dois espectrômetros Bruker[®] Avance III HD, um operando a 500,13 MHz para o núcleo de ¹H e a 125,75 MHz para o de ¹³C. Foram utilizados os solventes deuterados de metanol (CD₃OD) e clorofórmio (CDCl₃), ambos da Sigma-Aldrich[®]. O deslocamento químico dos picos foram dados em ppm tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) ou o sinal residual do solvente como referência. Foram também obtidos espectros de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) e bidimensionais de COSY (Correlated Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence).

Os espectrômetros foram utilizados no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP - da Universidade Estadual de Maringá – UEM – PR.

⁴ O reagente consiste do NP - difenilboriloxietilamina 1,0% (SIGMA-ALDRICH[®]) em metanol (SYNTH[®]), seguida de solução de PEG-polietilenoglicol 4000 (SIGMA-ALDRICH[®]). **Fonte:** Wagner e Bladt, 1996.

4.1.4 – Extração e Fracionamento da Espécie *A. macrocarpon*

Foi utilizado o processo de percolação, em percolador de aço inoxidável com etanol 95% (grau comercial), em três ciclos de 72 h cada, com o pó dos galhos (1,2 kg), das folhas (1,6 kg), da casca do caule (4,0 Kg), e do caule (3,5 kg) de *A. macrocarpon*, o procedimento foi conduzido em temperatura ambiente (27 ± 1 °C). Após, a solução etanólica foi concentrada sob pressão reduzida a 40 °C em aparelho rota-evaporador, fornecendo os extratos brutos etanólicos de *A. macrocarpon*: dos galhos (**AM1** - 187,10 g), das folhas (**AM2**– 436,00 g), da casca do caule (**AM3** - 507,00g), e do caule (**AM4** – 560,00 g) (Fluxograma 1). Os fracionamentos foram realizados com solventes (hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metanol, ácido clorídrico) grau P.A. ou obtidos por destilação no laboratório.

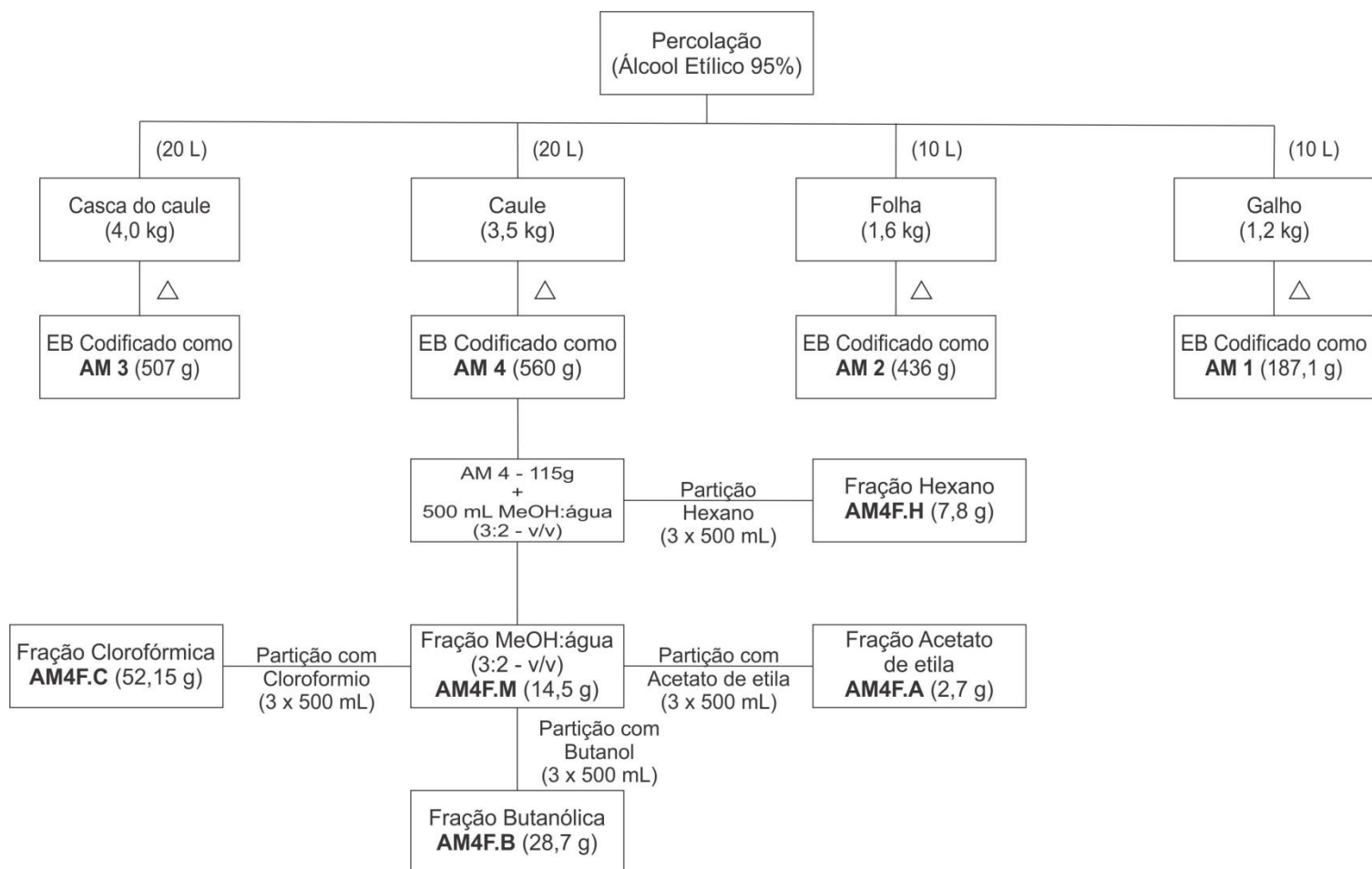
A partir, do extrato bruto etanólico do caule (**AM4**) de *A. macrocarpon* foram realizadas partições (Fluxograma 1). Parte do extrato bruto etanólico (115 g) foi solubilizada em 500 mL de metanol/água (3:2 – v/v) realizou-se a partição com hexano (500 mL), deste procedimento obteve-se a fração hexânica (**AM4F.H** – 7,8 g). Da fração metanol/água (3:2 – v/v) (**AM4F.M.** – 14,5g) realizou-se mais três partições: em clorofórmio, acetato de etila, e outra em butanol, originando as seguintes frações: fração clorofórmica (**AM4F.C.** - 52,15 g), fração acetato de etila (**AM4F.A.** – 2,7 g), e fração butanólica (**AM4F.B.** – 28,7g), (Fluxograma 1).

O extrato bruto etanólico do caule (**AM4**) de *A. macrocarpon* foi submetido à extração ácido/base para obtenção de alcaloides (HENRIQUES et al., 2007). Para esta extração foram utilizados 15 g do extrato bruto etanólico, obtendo-se 0,892 g de fração alcaloídica (**AM4F.ALC.**).

As frações obtidas da extração ácido/base, também foram separadas para realização dos testes antimicrobianos (Fungos e Bactérias), como o precipitado da fração orgânica (**AM4F.O.1.**- 5,00 g), o sobrenadante da fração orgânica (**AM4F.O.2.**- 5,00 g) e a fração aquosa (**AM4F.AQ** – 3,50 g), todos obtidos da extração de alcaloides do extrato bruto etanólico do caule (**AM4**) de *A. macrocarpon* (Fluxograma 2). Os solventes foram removidos das frações através de rota-evaporação, sob pressão reduzida a 40 °C. Os volumes menores de frações foram secos em capela de exaustão, a temperatura ambiente. Os volumes maiores, após rota-evaporação foram congelados em nitrogênio líquido e em seguida liofilizados (Liofilizador – Modelo 1-2 CHRIST'ALPHA[®]). Depois de secos, os extratos e frações foram armazenados em frascos de vidro hermeticamente fechado e permaneceram em freezer. As

pesagens dos extratos e frações foram realizadas em balanças eletrônicas: analítica (Shimadzu[®] - Modelo AX 200) e semianalítica (Bel[®]).

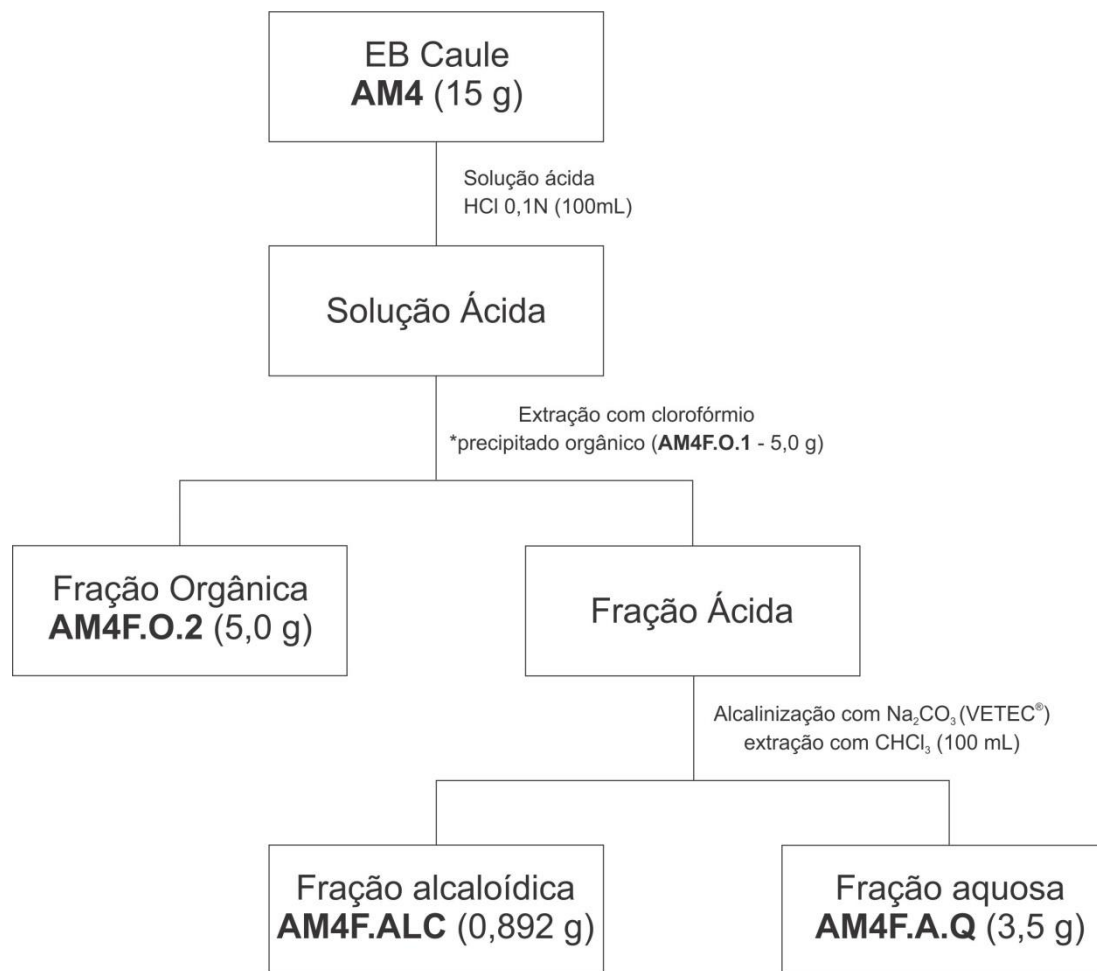
Fluxograma 1 - Procedimento de obtenção dos extratos brutos (EB) da casca do caule, do caule, folhas e dos galhos da espécie vegetal *A. macrocarpon* e partição do extrato bruto etanólico do caule (AM4) desta espécie.



Legenda: △ Filtração, Concentração e Secagem em Capela

Fonte: a autora, 2015.

Fluxograma 2 - Fracionamento do extrato bruto (EB) etanólico do caule (**AM4**) de *A. macrocarpon* para obtenção da fração alcaloídica.



Fonte: a autora, 2015.

4.1.5 - Extração da Espécie *A. tomentosum*

O pó da casca do caule (3,6 kg), cascas da raiz (2,4 kg), caule (3,0 kg) e raiz (2,0 kg) de *A. tomentosum* Mart., foram submetidos à extração por percolação com etanol 95% (grau comercial), a temperatura ambiente (27 ± 1 °C), em três ciclos de 72 h cada.

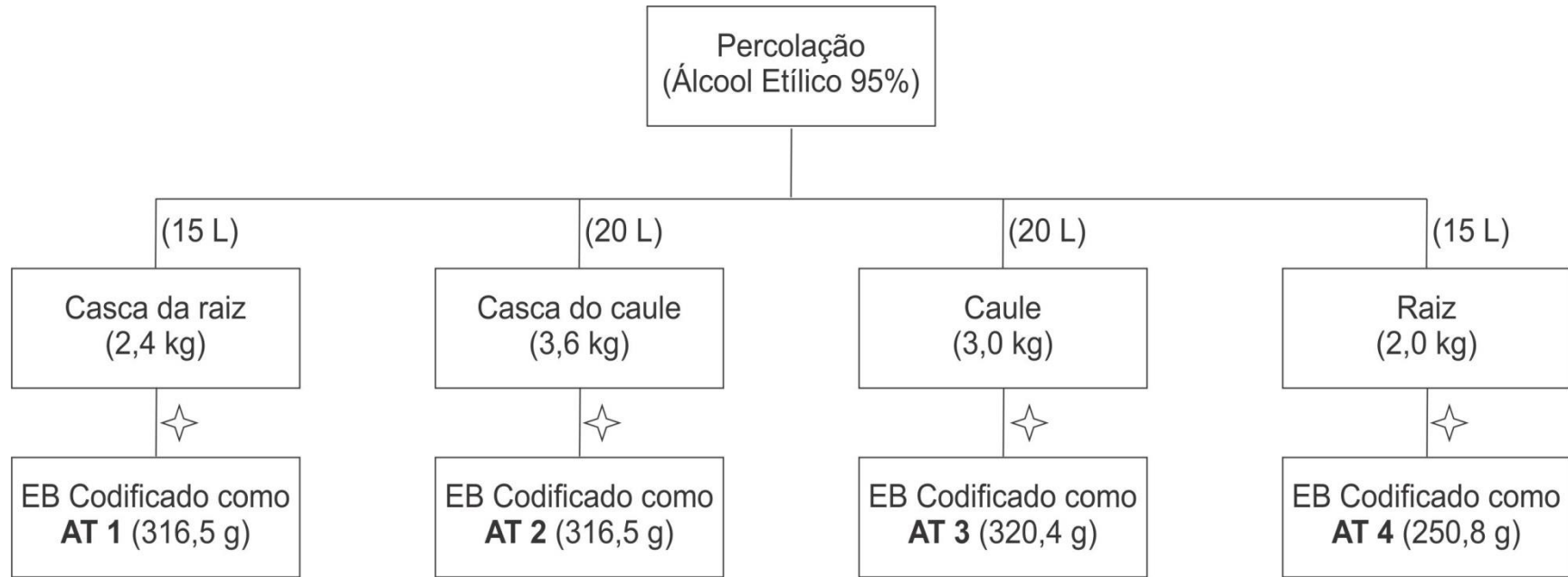
A solução etanólica foi concentrada sob pressão reduzida a 40 °C em aparelho rota- evaporador, para remoção do solvente, fornecendo os respectivos extratos brutos etanólico de *A. tomentosum*: casca da raiz (AT1– 230,60 g), casca do caule (AT2 - 316,50 g), caule (AT3– 320,40 g) e raiz (AT4– 250,80 g). Neste trabalho, para a espécie *A. tomentosum* foram utilizados nos ensaios microbiológicos apenas os extratos brutos (Fluxograma 3). O procedimento de extração, secagem e armazenamento dos extratos foi igual ao descrito no item 4.1.4.

4.1.6 - Extração e Fracionamento da Espécie *A. pyrifolium*

Os extratos brutos etanólicos da *A. pyrifolium* foram obtidos a partir da casca do caule (3,00 kg) (AP3 – 150 g), do caule (2,80 kg) (AP4– 150 g), da casca da raiz (1,00 kg) (AP9– 70 g), da raiz (1,50 kg) (AP12– 80 g), da flor (0,20 kg) (AP11– 10,00 g) e do fruto (0,50 kg) (AP10– 25,00 g) (Fluxograma 4). O processo para obtenção destes extratos foi realizado em aparelho de Soxhlet (sistema de extração fechado a quente), em etanol 95% (grau comercial), exaustivamente por 72 h, a solução etanólica foi concentrada sob pressão reduzida, a 40 °C em aparelho rota- evaporador (Fluxograma 4).

O extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. pyrifolium* foi dissolvido em metanol (300 mL) e água (450 mL), da mistura (fração hidrometanólica) resultante foi realizada uma partição com acetato de etila. A fração acetato de etila (AP1 – 91 g) e hidrometanólica (AP2 – 55 g) foram concentradas sob pressão reduzida em rota- evaporador a 40 °C (Fluxograma 5).

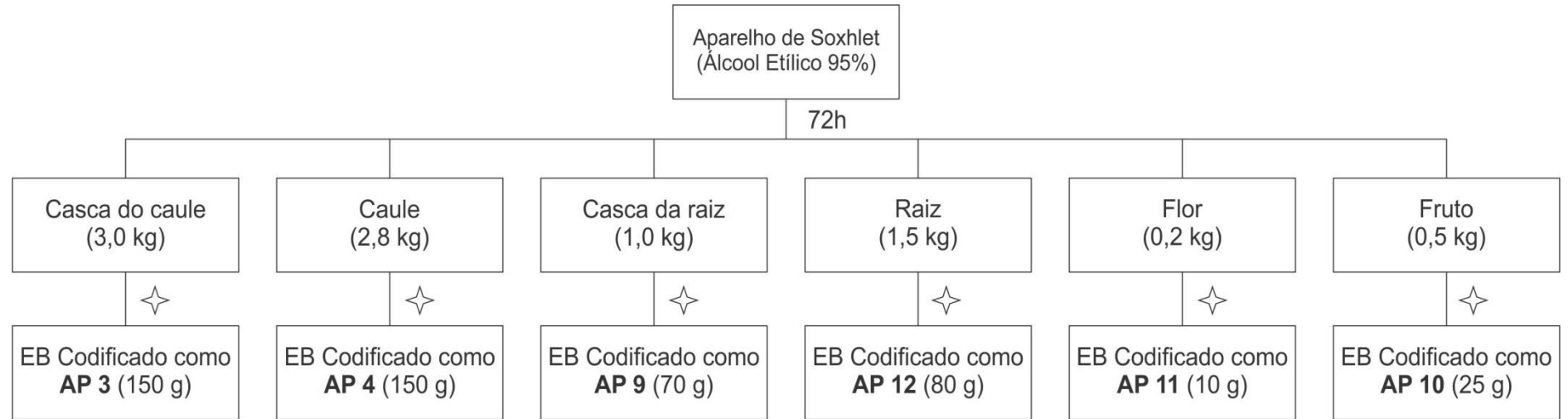
Fluxograma 3 - Procedimento de obtenção dos extratos brutos (EB) da casca do caule, do caule, das cascas da raiz e da raiz da espécie vegetal *A. tomentosum*.



Legenda: ☆ Filtração, Concentração e Secagem em Capela

Fonte: a autora, 2015.

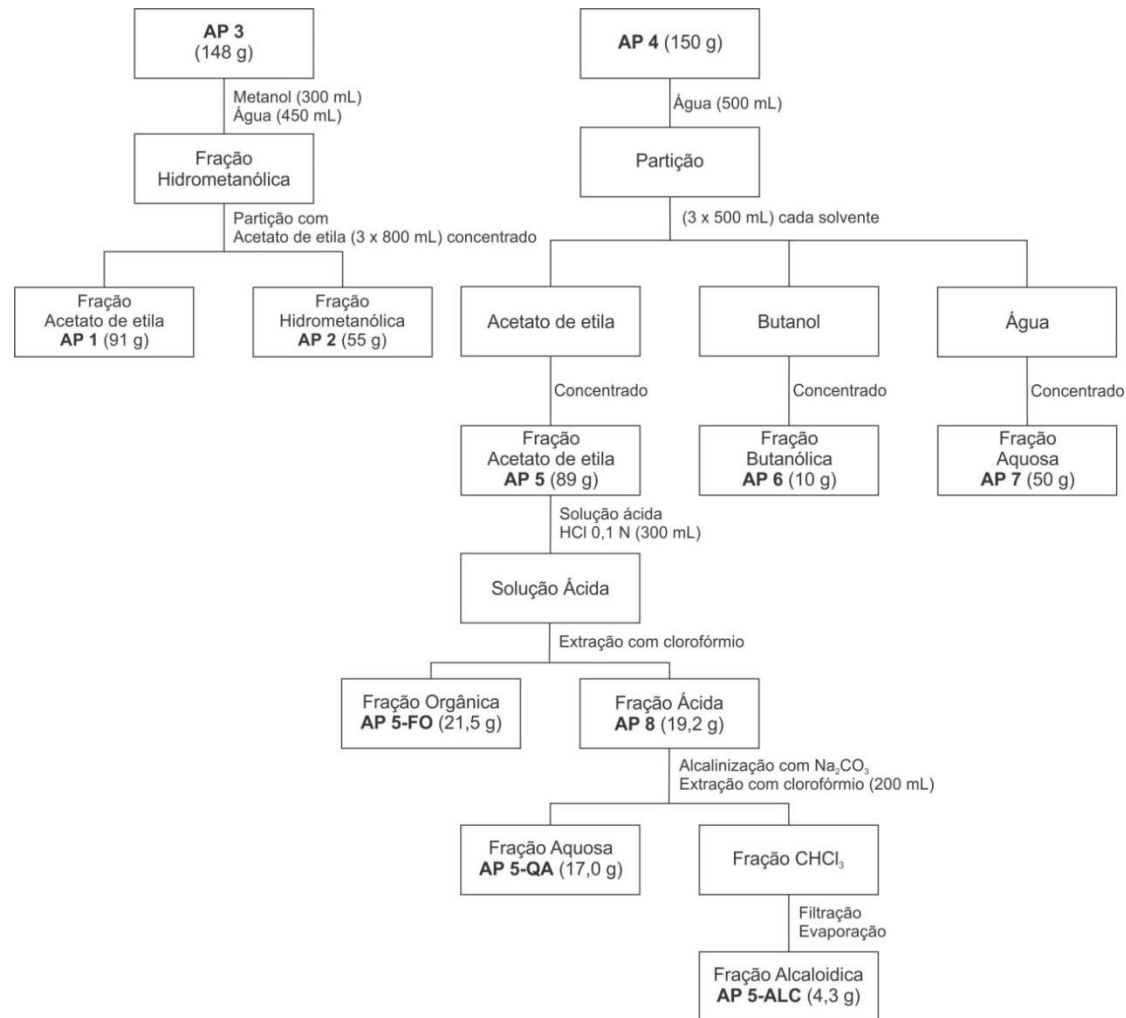
Fluxograma 4 - Procedimento de obtenção dos extratos brutos (EB) da casca do caule, do caule, das cascas da raiz, da raiz, dos frutos e das flores da espécie vegetal *A. pyriformium*.



Legenda: ☆ Concentração e Secagem em Capela

Fonte: a autora, 2015.

Fluxograma 5 - Procedimento de fracionamento da casca do caule (AP3) e do caule (AP4) da espécie vegetal *A. pyriformum*, e procedimento para obtenção da fração alcaloídica do caule de *A. pyriformum*.



Fonte: a autora, 2015.

Para o fracionamento do extrato bruto etanólico do caule (**AP4**) de *A. pyrifolium* primeiro realizou-se a partição, o extrato bruto etanólico (**AP4**) foi solubilizado em água e submetido à partição com acetato de etila e butanol, deste processo foram obtidas as frações: acetato de etila (**AP5** – 89,00 g), butanólica (**AP6** – 10,00 g) e aquosa (**AP7** – 50,00 g) (Fluxograma 5). A partir da fração **AP5** (40,00 g), foi realizada a extração para alcaloides (HENRIQUES et al., 2007). Após, a solubilização em clorofórmio e extração com HCl 0,1 N foram obtidas as frações orgânicas (**AP5-FO**– 21,50 g) e a fração ácida (**AP8**– 19,20 g) da extração para alcaloides. Depois, foi realizada a basificação com Na₂CO₃, seguida de nova extração em clorofórmio, onde se obteve as frações: alcaloídicas (**AP5.ALC.** – 4,30 g) e a aquosa (**AP5.AQ.**– 17,00 g) do caule de *A. pyrifolium* (Fluxograma 5).

O procedimento para eliminação dos solventes e armazenamento dos extratos e frações foi igual ao descrito no item 4.1.4.

4.1.7 – Fracionamento do Extrato Etanólico da Casca do Caule de *A. macrocarpon*.

Os procedimentos de fracionamento (item 4.1.7 ao 4.1.7.3) do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* e a prospecção fitoquímica (item 4.1.8) foram conduzidos pela autora da tese, no laboratório de fitoquímica PALAFITO, da Universidade Estadual de Maringá – UEM – PR, co-ordenado pelo prof. Dr. João Palazzo de Mello.

Os fracionamentos foram realizados com solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol) grau P.A. (SYNTH[®], NUCLEAR[®]).

Baseado no resultado do ensaio antiproliferativo sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (item 5.2.), o extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* foi submetido a um fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção à pressão negativa (vácuo) (Figura 7), (Fluxograma 6). Foram incorporados 70,0 g do extrato bruto em 210 g de sílica gel 60 (70 – 230 mesh – MERCK[®]), utilizando um pistilo e um almofariz, a proporção foi três partes de sílica para uma parte do extrato bruto etanólico (3:1).

A mistura da sílica e o extrato foram empacotados em coluna de vidro com filtro sinterizado e saída para acoplamento de sistema de pressão reduzida (Figura 7). A coluna foi eluída como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Sistemas de eluentes para a coluna de fracionamento a pressão reduzida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon*.

Sistema Eluente	Quantidade Utilizada em mL	Fração
Hexano	2000	F.H
Clorofórmio	3000	F.CHCl ₃
Acetato de Etila	10000	F.A
Metanol	4000	F. MeOH

Fonte: a autora, 2015.

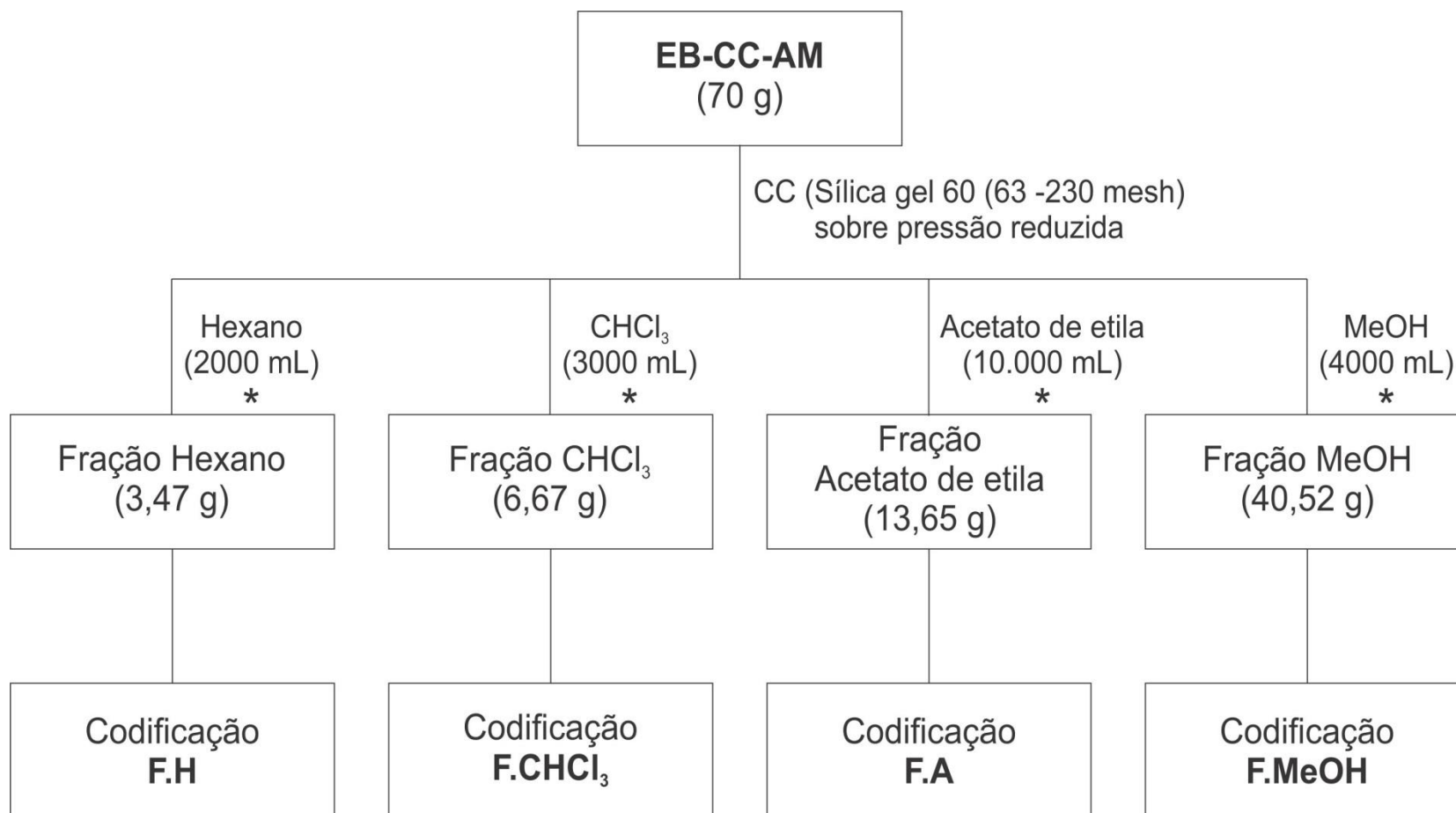
O extrato bruto e as 4 frações (Fluxograma 6) foram submetidas ao ensaio antiproliferativo sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (item 5.4).

Figura 7 - Coluna cromatográfica de sílica gel sob pressão negativa do extrato bruto etanólico da casca do caule da *A. macrocarpon* para obtenção das frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.



Fonte: a autora, 2015.

Fluxograma 6 - Fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção à pressão negativa do extrato etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon*.



Legenda: EB - CC - AM - Extrato Bruto das cascas do caule de *A. macrocarpon*;

* Concentração e liofilização - Exceção a Fração Hexano que após concentrada foi seca a temperatura ambiente em capela de exaustão com auxílio de ventilação forçada.

Fonte: a autora, 2015.

4.1.7.1 – Fracionamento da Fração Clorofórmio (F.CHCl₃) obtida do Extrato Bruto Etanólico da Casca do Caule de *A. macrocarpon* em Coluna Cromatográfica de Adsorção tipo “Flash”.

De acordo, com os resultados obtidos no ensaio antiproliferativo com as formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentados posteriormente (item 5.4), a fração F.CHCl₃ foi selecionada para o fracionamento (Fluxograma 6). A referida fração foi cromatografada com 30 g de sílica gel 60 (230 - 400 mesh), em coluna de 1,5 x 40 cm, empacotada com hexano. A coluna foi eluída como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Condição de eluição da coluna cromatográfica tipo “Flash” da F.CHCl₃ obtida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon*.

Sistema Eluente	Proporção Solvente (%)	Volume Solvente utilizado (mL)	Frações F.CHCl ₃
Hexano	100	200	1-3
Hexano:CHCl ₃	95:5	100	4-6
Hexano:CHCl ₃	90:10	100	7-8
Hexano:CHCl ₃	80:20	100	9-10
Hexano:CHCl ₃	70:30	200	11-15
Hexano:CHCl ₃	60:40	100	16-17
Hexano:CHCl ₃	50:50	100	18-21
Hexano:CHCl ₃	45:55	50	22-27
Hexano:CHCl ₃	40:60	600	28-108
Hexano:CHCl ₃	30:70	200	109-112
Hexano:CHCl ₃	20:80	300	113-122
Hexano:CHCl ₃	10:90	200	123-129
CHCl ₃	100	100	130-133
CHCl ₃ :Acetato de etila	90:10	50	134-135
CHCl ₃ :Acetato de etila	80:20	100	136-139
CHCl ₃ :Acetato de etila	70:30	600	140-173
CHCl ₃ :Acetato de etila	60:40	100	174-177
CHCl ₃ :Acetato de etila	50:50	50	178-181
CHCl ₃ :Acetato de etila	40:60	50	182-183
CHCl ₃ :Acetato de etila	30:70	50	184-186
CHCl ₃ :Acetato de etila	20:80	50	187-189
CHCl ₃ :Acetato de etila	10:90	200	190-198
CHCl ₃ :Acetato de etila	5:95	100	199-202
Acetato de etila	100	800	203-262
Acetato de etila:MeOH	90:10	600	263-285
Acetato de etila:MeOH	85:15	500	286-304
Acetato de etila:MeOH	80:20	600	305-330
Acetato de etila:MeOH	70:30	400	331-351
Acetato de etila:MeOH	60:40	200	352-360
Acetato de etila:MeOH	50:50	300	361-372
Acetato de etila:MeOH	40:60	200	373-380

Continua

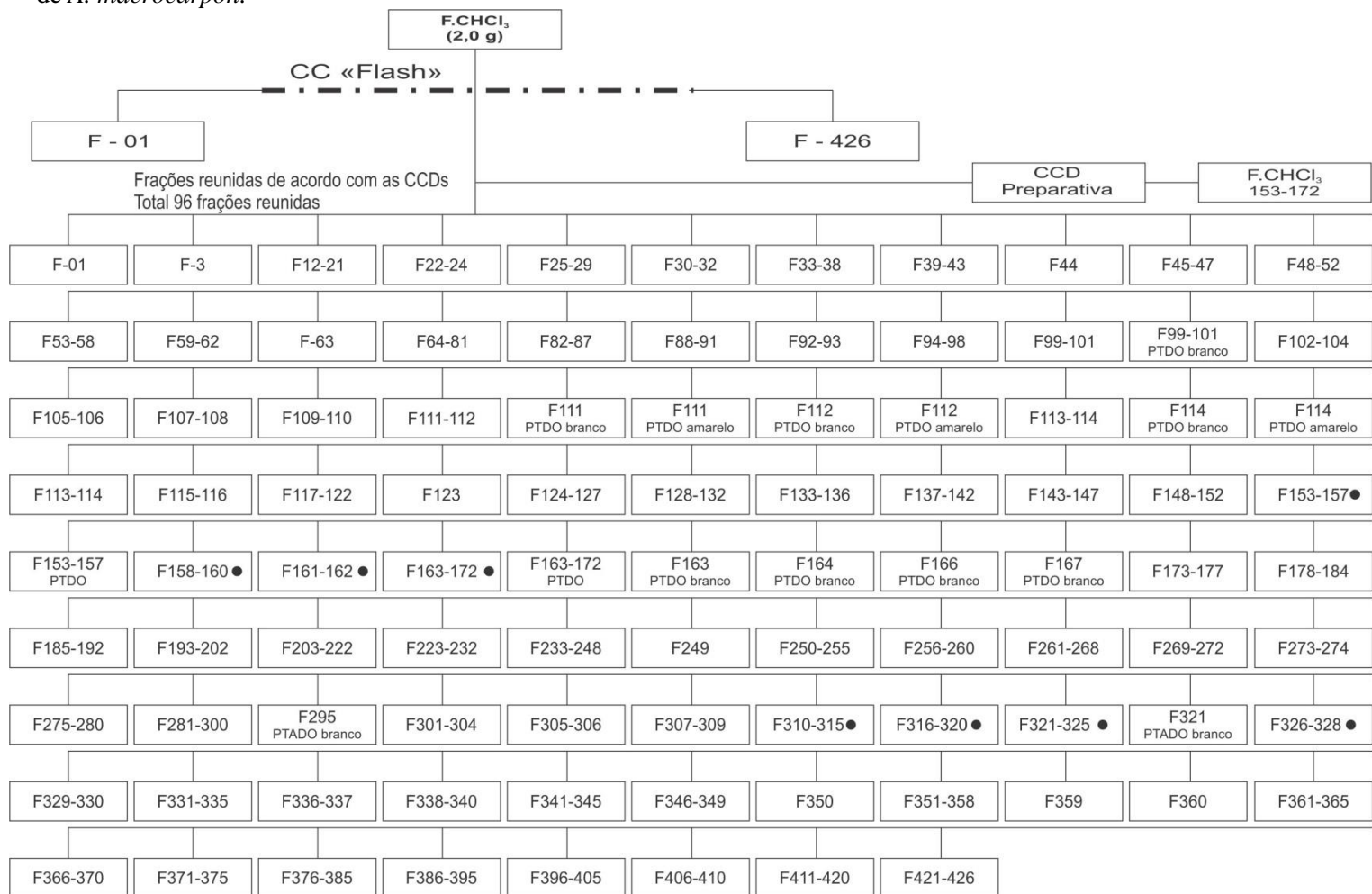
Continuação Tabela 3

Sistema Eluente	Proporção Solvente (%)	Volume Solvente utilizado (mL)	Frações F.CHCl₃
Acetato de etila:MeOH	30:70	200	381-388
Acetato de etila:MeOH	80:20	300	389-396
Acetato de etila:MeOH	90:10	200	397-404
MeOH	100	300	405-415
MeOH:Água destilada	90:10	200	416-426

Fonte: a autora, 2015.

Foram obtidas 426 frações, analisadas em CCD, visualizadas através de radiação UV (254 e 366 nm) e reveladas com reagente de Dragendorff. As frações que apresentaram semelhanças cromatográficas na CDD foram reunidas, em frascos de vidro. Os solventes foram evaporados a temperatura ambiente em capela de exaustão, sob ventilação forçada. Após, as frações foram pesadas e mantidas em freezer até a avaliação da atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (item 5.4) e análises espectrométricas (item 4.1.3). Com este procedimento as 426 frações da F.CHCl₃ geraram 96 frações, destas 38 (Fluxograma 7) foram separadas e testadas para atividade antileishmania (item 5.4).

Fluxograma 7 - Fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção tipo “Flash” da fração clorofórmio (F.CHCl₃) e frações reunidas da casca do caule de *A. macrocarpon*.



Legenda: ● Estas frações apresentaram resultado positivo na CCD com reagente de Dragendorff. PTADO = precipitado.

Fonte: a autora, 2015.

4.1.7.2 - Isolamento por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) da F.CHCl₃ – 153-172 obtida do Fracionamento da F.CHCl₃.

A fração F.CHCl₃ – 153-172, foi submetida ao processo de fracionamento, por cromatografia em camada delgada preparativa - CCDP, para purificação e realização de novos testes antileishmania e análises espectrométricas.

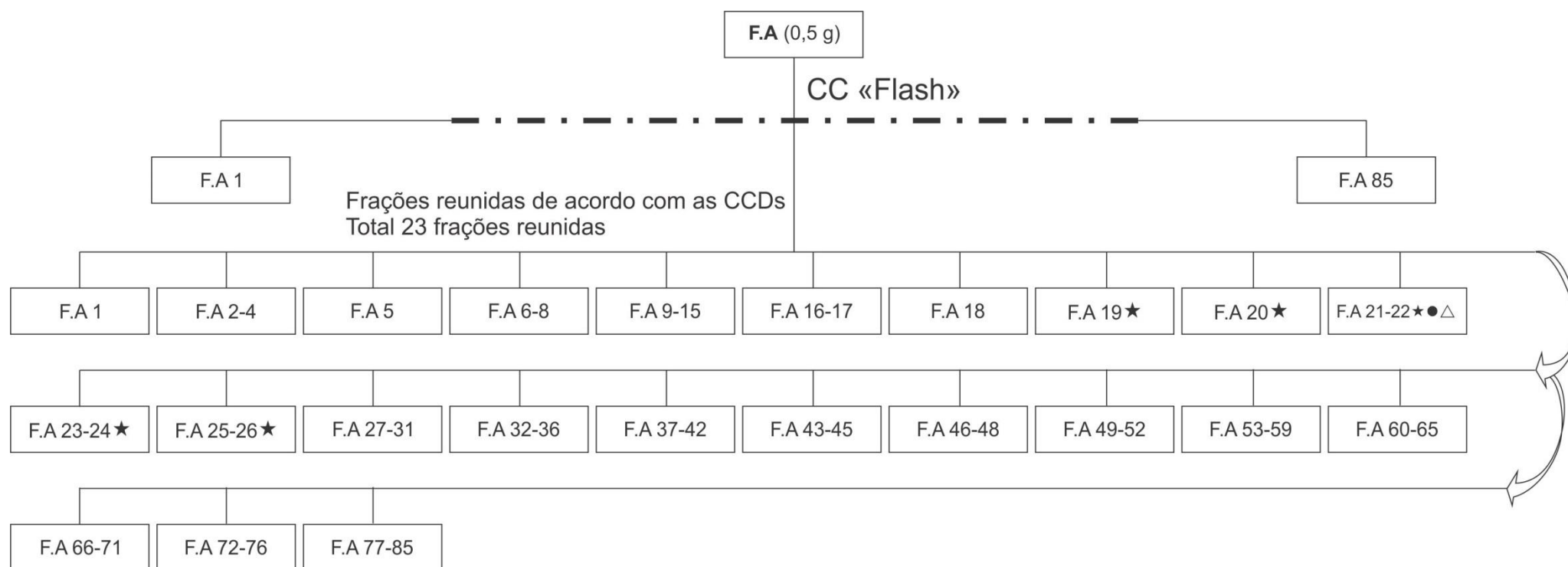
Para o desenvolvimento da CCDP foi utilizado à mesma fase móvel da CCD, (FM: CHCl₃:Acetato de etila:MeOH – 1:4:1) rendendo manchas definidas e separadas entre si, que foram raspadas, solubilizadas, filtradas, concentradas e secas a temperatura ambiente, em capela de exaustão, sob ventilação forçada. A amostra obtida da CCDP foi codificada como F.CHCl₃–153-172 e encaminhada para análises espectrométricas descritas anteriormente (item 4.1.3).

4.1.7.3 - Fracionamento da Fração Acetato de Etila (F.A) obtida do Extrato Bruto Etanólico da Casca do Caule de *A. macrocarpon* em Coluna Cromatográfica de Adsorção tipo “Flash”.

Conforme os resultados obtidos no ensaio antiproliferativo com as formas promastigotas de *L. amazonensis* (item 5.4), apresentados posteriormente, a fração F.A também foi selecionada para o fracionamento. A fração F.A foi eluída em fase estacionária de sílica gel 60 (230 - 400 mesh) (20 g), em coluna de vidro de 1,5 x 40 cm, empacotada com diclorometano (Fluxograma 8). Foram utilizados 0,5 g da F.A, a proporção de fração e sílica foi de 1:40, partes de fração e sílica, respectivamente. Após, o empacotamento da coluna esta apresentou 27 cm de altura. A coluna foi eluída como apresentado na Tabela 4, e os volumes de coleta por tubo variaram (5 a 20 mL) de acordo com o monitoramento visual, com base nas cores das bandas formadas na coluna.

Desse fracionamento obteve-se 85 frações, analisadas em CCD, e eluídas junto com a amostra padrão de quercetina (MERCK®), e visualizadas através de radiação UV (254 e 366 nm). Após, foram reveladas com reagente Natural mais PEG (NP-PEG). As frações com semelhanças cromatográficas na CCD foram reunidas em frascos de vidro. Os solventes foram evaporados a temperatura ambiente, em capela de exaustão, sob ventilação forçada.

Fluxograma 8 - Fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção tipo “Flash” da fração acetato de etila (F.A) e frações reunidas após avaliação dos perfis das cromatografias em camada delgada (CCD).



Legenda: ★ Frações onde o Rf foi compatível com o Rf da quercetina padrão (MERCK®), após eluição na CCD;
● Apresentou uma única mancha quando analisada qualitativamente por CCD;
△ Rendimento da F.A 21-22 = 195,30 mg.

Fonte: a autora, 2015.

As frações foram pesadas e mantidas em freezer até a avaliação da atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e análises espectrométricas. As frações denominadas de F.A - 01 a 85, depois de reunidas constituíram 23 frações (Tabela 4), (Fluxograma 8).

Tabela 4 - Sistema de eluição da coluna cromatográfica tipo “Flash” da F.A obtida do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon*.

Sistema Eluente	Proporção Solvente (%)	Volume Solventes utilizados (mL)	Frações F.CHCl ₃
Diclorometano	100	300	1-11
Diclorometano:MeOH	90:10	700	12-35
Diclorometano:MeOH	80:20	200	36-47
Diclorometano:MeOH	70:30	200	48-58
Acetato de etila:MeOH	90:10	200	59-69
Acetato de etila:MeOH	80:20	50	70-73
Acetato de etila:MeOH	50:50	50	74-77
MeOH	100	300	78-85

Fonte: a autora, 2015.

4.1.8 - Prospecção Fitoquímica do Extrato Bruto e Frações da Casca do Caule de *A. macrocarpon*

Para o ensaio de prospecção fitoquímica foram utilizadas as frações:hexânica (FH), clorofórmica (F.CHCl₃), acetato de etila (F.A), metanólica (F.M) e o extrato bruto etanólico (EBE) da casca do caule de *A. macrocarpon*.

De acordo com Matos (2009) foram preparadas soluções extrativas etanólicas de cada amostra para os ensaios, com cerca de 1 mg para cada 2 mL de solvente (álcool etílico). Exceção para a fração hexânica, onde se utilizou a proporção de 2:1 – fração: solvente (hexano).

Os testes utilizados seguiram técnicas de caracterização qualitativa de grupos de metabólitos secundários de origem vegetal, segundo marcha analítica prospectiva descrita por Matos (2009), relatada no Anexo A.

4.2 – ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os extratos e frações descritos anteriormente para as três espécies de *Aspidosperma* foram testados para atividade antifúngica e antibacteriana relatadas neste estudo e no artigo em anexo. Contudo, para os ensaios antileishmania foram selecionados alguns extratos e frações das três espécies de *Aspidosperma* descritas neste trabalho. Estes foram testados para atividade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, como modo de selecionar o extrato com o melhor índice de seletividade (IS).

A atividade antimicrobiana (bactérias e leveduras) dos extratos brutos e frações da *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium* foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este teste de susceptibilidade antimicrobiana (bactérias e leveduras) foi realizado no laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas – DAC, da Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá – PR, sob a co-ordenação do prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

O ensaio para avaliação da atividade antileishmania, sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foi realizado para as espécies vegetais *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium*.

Baseado no resultado do ensaio antiproliferativo sobre as formas promastigotas e na citotoxicidade sobre células LLCKM₂ (célula epitelial de rim de *Macaca mulatta*), o extrato bruto etanólico, suas frações e substâncias isoladas da casca do caule de *A. macrocarpon* foram submetidos à avaliação da atividade antileishmania sobre formas promastigotas, amastigotas axênicas e intracelulares de *L. amazonensis*. Além, da avaliação da atividade citotóxica sobre macrófagos e eritrócitos humanos.

As subfrações F.CHCl₃-203-222 e F.A-21-22, foram submetidas a análises espectrométricas e a novos ensaios relacionados à atividade antileishmania. Além de, avaliadas quanto às alterações morfológicas e ultraestruturais sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, em microscopia eletrônica de varredura e transmissão, respectivamente.

Experimentos relacionados ao mecanismo de ação sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* foram conduzidos para a amostra F.CHCl₃-203-222.

Estudo para avaliação do índice de combinação foi realizado com a quercetina (substância da F.A-21-22) combinada com a anfotericina B (Q+A) e miltefosina (Q+M), fármacos padrão para o tratamento das leishmanioses. Diferentes concentrações das combinações Q+A e Q+M foram testadas frente à promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e a citotoxicidade foi averiguada em macrófagos e eritrócitos humanos.

Todos os ensaios sobre a atividade antileishmania foram conduzidos no laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, sob a co-ordenação do prof. Dr. Celso Vataru Nakamura. As atividades relacionadas à microscopia eletrônica de varredura e transmissão, e citometria de fluxo foram realizadas no COMCAP (Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa) da Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá - PR. Para todos os ensaios microbiológicos as amostras de extratos, frações, substâncias isoladas e controles positivos (antimicrobianos) foram pesados na balança eletrônica analítica (METTLER TOLEDO®).

4.2.1 - Avaliação do Potencial Antibacteriano e Antifúngico do Extrato Bruto e Frações obtidas de *A. macrocarpon*; *A. tomentosum* e *A. pyrifolium*.

4.2.1.1 - Micro-organismos Utilizados e Condições de Crescimento

A atividade antibacteriana foi observada para linhagens de bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. E para atividade antifúngica foram utilizadas leveduras de espécies de *Candida* (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* de isolado clínico de fluido vaginal). As cepas foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente (DIFCO®) a 37 °C e mantidas em ágar nutriente inclinado a 4 °C. As leveduras se desenvolveram em caldo Sabouraud dextrose (CSD) e foram mantidas em ágar Sabourad dextrose (ASD) a 4 °C (MERCK®).

Antes de cada experimento as amostras de todos os micro-organismos eram ativadas em meio líquido, como o caldo Muller-Hilton (CMH) (MERCK®) ou o caldo Sabouraud (CS) (DIFCO®), para as bactérias e leveduras, respectivamente, onde permaneciam incubados a 37 °C, durante 24 h, para assegurar a viabilidade e pureza (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; ENDO et al., 2010; TOLEDO et al., 2011).

4.2.1.2 - Padronização da Suspensão Bacteriana e Fúngica

Para cada amostra bacteriana foi realizada uma suspensão padronizada, a partir da cultura de 24 h em CMH (MERCK®). Em um tubo contendo salina estéril (NaCl - 0,85%) foi adicionada gota a gota, a cultura de bactéria até a obtenção de uma turvação idêntica aquela

comparada ao tubo 0,5 da escala de McFarland (suspensão de BaSO₄ que corresponde a 1,0 x 10⁸ UFC/mL de bactérias) (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; TOLEDO et al., 2011).

Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em tubo eppendorf contendo CMH, de modo a obter uma suspensão bacteriana de 10⁷ UFC/mL, cujo inóculo foi utilizado no ensaio para determinação da CIM (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; TOLEDO et al., 2011).

As leveduras foram padronizadas a partir da cultura de 24 h, em um tubo contendo salina estéril, foi adicionada gota a gota a suspensão de levedura até a obtenção de uma turvação, padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland (10⁶ UFC/mL). Após, foi realizado uma diluição 1:100 em tubo eppendorf contendo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Medium Institute – SIGMA[®], St Louis, MO, USA), de modo a obter uma suspensão de 10⁴ UFC/mL, cujo inóculo foi utilizado no ensaio para determinação da CIM (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; ENDO et al., 2010; TOLEDO et al., 2011).

4.2.1.3 - Preparo dos Fármacos Controle

A penicilina (SIGMA[®]) foi utilizada como controle para *S. aureus*. Preparou-se uma solução A de 5,0 mg/mL (0,001 g em 200,0 µL de água destilada), em seguida esta solução foi diluída 1:100 em água destilada (solução B: 0,05 mg/mL), por fim a solução B foi diluída 1:10 em CMH, obtendo uma concentração de 5,0 µg/mL no tubo eppendorf, desta diluição foi transferida para o primeiro poço da microplaca (100,0 µL), obtendo uma concentração inicial de 2,5 µg.

A vancomicina (SIGMA[®]) foi utilizada para *B. subtilis* e a tetraciclina (SIGMA[®]) utilizada para *E. coli* e *P. aeruginosa*, foram preparadas através da diluição de 5 mg das respectivas drogas em 100,0 µL de água destilada (solução A). Esta foi diluída 1:100 em água destilada (solução B: 0,5 mg/mL) e a solução B foi diluída 1:10 em CMH, sendo então transferida para o primeiro poço da microplaca (100,0 µL), obtendo uma concentração de 25 µg/mL.

A nistatina (SIGMA[®]) utilizada como controle para as leveduras (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) foi preparada a partir de uma solução estoque de 1,024 mg diluída em 100,0 µL de DMSO (SYNTH[®]). Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em meio RPMI 1640 (solução A), 100,0 µL da solução A foram adicionados em 300,0

μL de meio RPMI 1640 (solução B). Esta solução B foi transferida para o primeiro poço da microplaca (100,0 μL) (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005).

4.2.1.4 – Método de Diluição em Caldo (microdiluição) para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Bactérias e Leveduras.

As microplacas com as bactérias e as leveduras foram incubadas a 37 °C, e a CIM foi avaliada após 24 h de incubação para as bactérias e 48 h para as leveduras (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; ENDO et al., 2010; TOLEDO et al., 2011).

A CIM é definida como a menor concentração de um agente capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo empregado no teste de susceptibilidade. Neste trabalho a CIM foi definida com base na menor concentração do extrato e fração que resultou em inibição de crescimento visual, observados a olho nu e em microscópio invertido (ZEISS® - Axiovert 25) para bactérias e leveduras (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; ENDO et al., 2010; TOLEDO et al., 2011).

O procedimento para adição dos meios, micro-organismos, extratos, frações e controles positivos na microplaca de 96 poços, estão esquematizados na Figura 9 e seguem descritos a seguir.

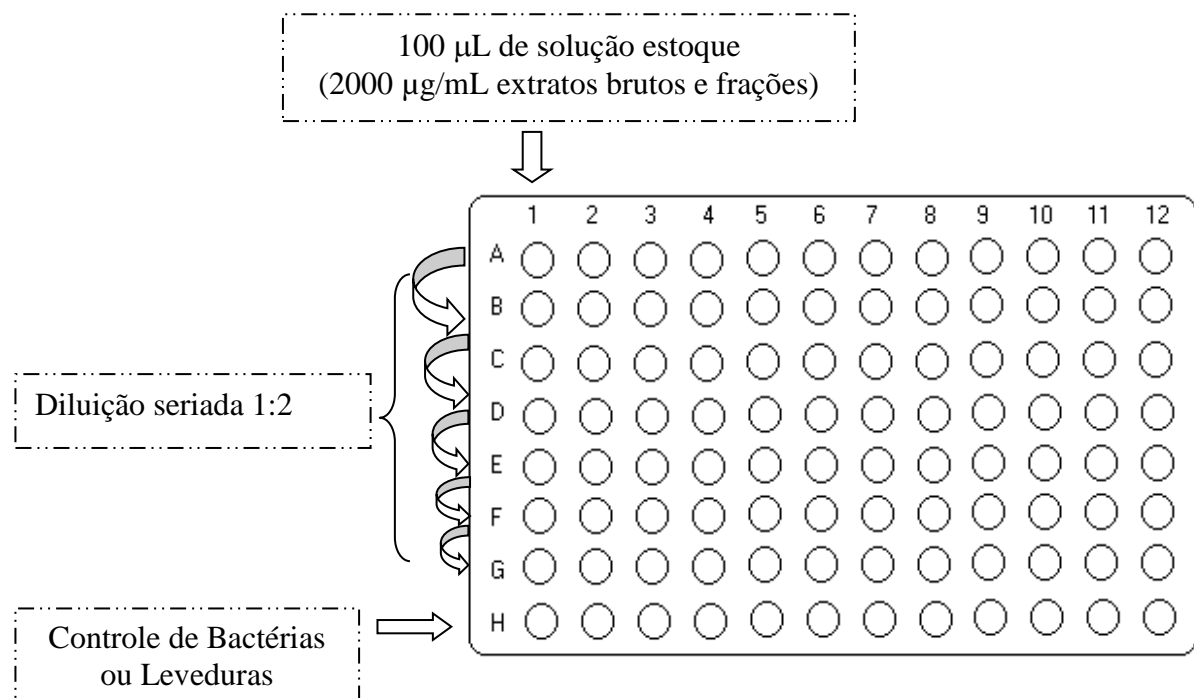
Foram pipetados 100 μL de CMH (para bactérias) ou RPMI 1640 (para leveduras) nos poços. Em seguida, foi pipetado 100 μL da solução estoque no primeiro poço, onde foi obtida uma concentração de inicial de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Diluições seriadas foram realizadas transferindo 100 μL do primeiro poço para os poços subsequentes. Homogeneizando bem antes de transferir de um poço para outro. Estas diluições também foram feitas para os poços com os controles positivos (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005). Após, volumes de 5 μL de suspensão de bactérias ou de leveduras foram adicionadas em cada poço, de acordo com as concentrações descritas acima (item: 4.2.1.2 - Padronização da Suspensão Bacteriana e Fúngica), exceto no poço controle dos extratos e frações (meio mais extrato ou fração). As microplacas foram incubadas (Figura 8) (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; ENDO et al., 2010; TOLEDO et al., 2011).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos e frações da *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyrifolium* foram determinadas para a atividade antibacteriana junto com os controles positivos (tetraciclina, penicilina e vancomicina) pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços na presença de caldo Muller-Hinton de

acordo com os procedimentos estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) para bactérias. Para as leveduras, a concentração inibitória mínima (CIM) das amostras (extratos, frações e a nistatina – controle positivo) também foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), mas utilizando meio de cultura RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute - SIGMA-ALDRICH®), tamponado com MOPS (tampão ácido-3-[N-morfolino] propanosulfônico a 0,165 M) (SIGMA-ALDRICH®) em pH 7,0 (PESSINI et al., 2003; PESSINI et al., 2005; ENDO et al., 2010 e 2012; TOLEDO et al., 2011).

Para a realização da determinação concentração bactericida mínima (CBM) e da concentração fungicida mínima (CFM), foram realizadas subculturas de todos os poços onde ocorreu inibição do crescimento microbiano e do poço controle da bactéria ou do fungo. Estas foram semeadas com alça calibrada de 10,0 μL , em placas de Petri com capacidade para 15,0 mL de AMH e de ASD. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h. As CBMs e as CFMs foram definidas como a menor concentração que produziu subculturas negativas ou somente uma colônia (NCCLS, 2002; ENDO et al., 2012).

Figura 8 - Esquema para determinação da concentração inibitória mínima em microplaca de cultura de células de 96 poços.



Fonte: a autora, 2015.

4.2.2 - Avaliação da Atividade Antileishmania *in vitro* dos Extratos Brutos, Frações e Substâncias da *A. macrocarpon*, e dos Extratos Brutos da *A. tomentosum* e *A. pyriformium* sobre *L. amazonensis*.

Todos os materiais utilizados durante os experimentos para atividade antileishmania foram acondicionados e esterelizados em autoclave vertical (PRISMATEC[®] e PHOENIX[®]) a 121 °C, por 15 minutos ou foram adquiridos estéreis de fábrica. As placas de cultura de células de 12, 24 e 96 poços foram utilizadas novas, eram de poliestireno, de fundo chato, livre de pirogênios e impurezas, com vedação que permitiu as trocas gasosas. Esterilizadas com raio gama de fábrica da marca TPP[®], com superfície opticamente clara. Além, das placas foram utilizados tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL adquiridos esterilizados (LABCON[®]), microtubos (tipo eppendorfs) esterilizados em autoclave, e garrafas ou frascos de cultura de tecidos de poliestireno com capacidade para 25 cm² (60 mL) e 75 cm² (270 mL), de tampa rosqueável sem filtro e com estágio intermediário “posição *vent*”, possibilitando as trocas gasosas e com alta transparência (TPP[®]).

Os meios de culturas utilizados, bem como as soluções tampão, soro fetal bovino (SFB) (GIBCO INVITROGEN[®], Gaithersburg, MD, EUA) e demais reagentes colorimétricos ou não, foram preparados pouco antes de cada experimento a partir de kits laboratoriais, no laboratório de Tecnologia e Inovação em Fármacos e Cosméticos – UEM – Maringá - PR. Os meios de culturas depois de preparados e acondicionados foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos e separados dos meios em uso para o controle de esterilidade, antes de serem colocados em uso. O meio de cultura RPMI 1640 e o meio de Schneider (SIGMA[®] St Louis, MO, USA) foram esterilizados por filtração em membrana estéril com porosidade de 0,22 µm (TPP[®]).

Durante o cultivo e manutenção dos parasitos e das culturas de células foi adicionada uma solução de 1% de penicilina (SIGMA[®] St Louis, MO, USA) e estreptomicina (GIBCO[®] - Life Technology). Logo, para um frasco de cultura com 5 mL de *pool* (meio de cultura, SFB e inóculo do parasito), foram adicionados 50 µL de solução de penicilina e estreptomicina. A solução de antibióticos foi preparada utilizando 0,1418 g de estreptomicina e 0,066 g de penicilina, solubilizadas em 20 mL de água destilada. Após, foi filtrada em capela de fluxo laminar com membrana estéril de 0,22 µm, e distribuídas em alíquotas de 1 mL em tubos do tipo eppendorf, e armazenada a -20 °C, até o momento do uso.

Os experimentos com os protozoários foram conduzidos em capela de fluxo laminar (VECO[®] BioProtector 12 e ESCO[®] Airstream). E separadamente na sala de cultura de células os experimentos com a linhagem de macrófagos J774-A1 e as células LLCKM₂ (célula epitelial de rim de *Macaca mulatta*) foram manipulados em outra capela de fluxo laminar (VECO[®] BioProtector 12) e mantidas em estufa com tensão de CO₂ em 5%, umidificada e regulada a 37 °C (SANYO[®]). As estufas onde as formas promastigotas e amastigotas axênicas foram mantidas antes e durante os experimentos são do tipo B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e reguladas a 25 (FANEM[®] modelo 347F) e 32 °C (LABTORE[®] 411D).

O preparo e a composição dos meios de culturas, corantes, contrastantes, marcadores soluções salinas e tampões seguiram as recomendações do fabricante ou protocolo padronizado para uso diário no laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da UEM – Maringá - PR.

Os protocolos dos experimentos que envolveram a utilização de camundongos, para a manutenção de formas promastigotas de *L. amazonensis* e a obtenção de macrófagos peritoneais, são práticas rotineiras no laboratório de Inovação e Desenvolvimento Tecnológico de Fármacos e Cosméticos da UEM – Maringá - PR, estes foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Maringá – UEM- PR (protocolo de aceitação n. 029/2014).

4.2.2.1 - Preparo das Soluções Estoque

Os extratos, frações e substâncias isoladas, ou seja, as amostras testes, assim como os padrões e controles positivos foram solubilizados em DMSO (dimetilsufóxido – SIGMA CHEMICAL[®] Co, St Louis, MO, EUA) para preparação da solução estoque. Depois, foram diluídos em meio de cultura adequados a cada experimento, de maneira que a concentração final do DMSO não ultrapassou 1% (v/v). A anfotericina B, foi utilizada como fármaco de referência e também foi diluída em DMSO (RODRIGUES; URBINA; SOUZA, 2005; BRITTA et al., 2012 e 2014; LAZARIN-BIDÓIA et al. 2013; GARCIA et al., 2013; VOLPATO et al., 2013; SOUSA et al., 2014).

As amostras testes foram transferidas das soluções estoque e submetidas a diluições seriadas (v/v) em ordem decrescente de concentração, na presença do meio de cultura específico, suplementado com SBF 10 ou 20%. As diluições foram realizadas em microtubos (tipo eppendorf). A concentração inicial utilizada nos ensaios antiproliferativos para os extratos e as frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) foi de 1000 µg/mL e

para as subfrações da fração clorofórmio e substâncias puras a maior concentração foi de 100 µg/mL ou baseado em dados da literatura para a substância. Quando necessário à concentração foi diminuída até encontrar o valor de CI_{50} para a amostra teste. Para os ensaios de citotoxicidade procurou-se utilizar concentrações altas, acima da concentração ativa encontrada nos ensaios contra formas promastigotas e amastigota.

No caso dos ensaios de combinação de substâncias, o esquema utilizado foi descrito no item 4.2.2.12, considerando o esquema de “*checkerboard*” (CHOU e TALALAY, 1984; CHOU, 2010; ZHAO; AU e WIENTJES, 2010).

4.2.2.2 - Cultivo do Parasito

4.2.2.2.1 - Cultivo de Formas Promastigotas de *Leishmania amazonensis*

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cepa WHOM/BR/75/JOSEFA originalmente isoladas de um caso humano de leishmaniose cutânea difusa por C.A. Cuba-Cuba (Universidade de Brasília, DF, Brasil) foram recuperadas de lesão de camundongos Balb/c, cultivadas e mantidas em frascos para cultura de células de 25 cm², contendo meio Warren (infusão de cérebro e coração DIFCO[®], acrescido de hemina e ácido fólico, pH 7,2) suplementado com 10% de SFB, inativado a 56 °C por 30 minutos. Os frascos contendo as formas promastigotas permaneceram em estufa a 25 °C. Para manutenção das culturas foram realizados repiques a cada 72 horas, e para os ensaios foram utilizadas culturas na fase logarítmica de crescimento (48 h após a incubação do subcultivo) (BRENZAN et al., 2007; STEFANELLO, 2014).

4.2.2.2.2 – Diferenciação de Formas Promastigotas de *Leishmania amazonensis* em Amastigotas Axênica.

As formas amastigotas axênicas foram obtidas da diferenciação de formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) em função do meio (pH 4,6) e da temperatura de incubação (STEFANELLO, 2014).

O procedimento foi iniciado com uma cultura das formas promastigotas de 72 h, transferido para outro frasco de cultura com meio Warren, pH 7,2, suplementado com 20% de SFB e incubado a 25 °C por 48 h. Após este período, as culturas foram transferidas para a estufa de B.O.D. regulada a 30 °C, onde ficaram por 24 h. Então, foram incubadas a 32 °C,

até a observação em microscópio ótico (OLYMPUS® CX31) das formas amastigotas axênicas (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS e SOUZA, 2001).

Para manutenção das formas amastigotas axênicas, estas foram cultivadas em frascos para cultura de células de 25 cm² em meio de Schneider (SIGMA®), pH 4,6 suplementado com 20% de SFB, bovino inativado a 56 °C por 30 minutos e incubados em estufa a 32 °C. Para os ensaios foram utilizadas culturas na fase logarítmica de crescimento (72 h). Os experimentos foram conduzidos na presença de 80 a 100% de formas amastigotas axênicas (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS e SOUZA, 2001).

4.2.2.3 - Obtenção de Macrófagos Peritoneais e Cultura de Macrófagos J774-A1

Camundongos BALB/c, com 3 a 8 semanas de vida, foram eutanasiados com Ketamina (CRISTALIA®) 90 mg/kg de peso animal e Xilazina 2% (BAYER®) 10 mg/Kg de peso via intraperitoneal e utilizados para obtenção dos macrófagos peritoneais. Após, a retirada dos pelos e da pele da região abdominal dos camundongos, foi injetado na cavidade peritoneal 5 mL de PBS (Tampão Fosfato Salina) (GIBCO®) gelado com 3% de SFB estéril. O conteúdo foi então aspirado e as seringas estéreis mantidas no gelo. Logo em seguida, o aspirado foi adicionado em um tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4 °C (centrífuga – EPPENDORF modelo 5810R). Os macrófagos foram processados e utilizados logo após serem retirados do peritônio.

A manutenção da cultura de macrófagos murinos da linhagem J774-A1 foram cultivados em meio RPMI 1640 (pH 7,6), suplementado com 10% de SFB, incubados em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de tensão de CO₂.

4.2.2.4 - Cultura de Células LLCMK₂

A cultura de células LLCMK₂ (célula epitelial de rim de *Macaca mulatta*) foram cultivadas em frascos para cultura de células de 25 cm² contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO®) suplementado com 10% de SFB, incubados a 37 °C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. As células eram observadas diariamente em microscópio invertido (OLYMPUS® CKX41), e o meio de cultura foi trocado quando o pH do meio ficava ácido (coloração laranja a amarelo). Após, a confluência de pelo menos 80% da monocamada de células, estas eram tripsinizadas (tripsina - GIBCO®) por 1 minuto,

ressuspensas em meio DMEM e 10% do inóculo foram transferidos para outro frasco de cultura de células 25 cm² contendo meio DMEM e 10% de SFB (MIRANDA, 2013).

4.2.2.5 - Atividade Antiproliferativa dos Extratos Brutos, Frações e Substância da *A. macrocarpon*, e dos Extratos Brutos da *A. tomentosum* e *A. pyriformium* em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*.

Após, 48 h de repique do cultivo (fase logarítmica da cultura) das formas promastigotas de *L. amazonensis* uma concentração inicial de 1×10^6 células/mL, contadas em câmara de Neubauer (hemocitômetro) foram cultivadas em meio Warren com 10% de SFB. Foram utilizadas placas de cultura de células de 24 poços estéreis (TPP®), na ausência (controle negativo) e presença de diferentes concentrações dos extratos, frações, substâncias isoladas, e combinações de substâncias (BRITTA et al., 2012; STEFANELLO, 2014).

A placa foi incubada em estufa B.O.D. a 25 °C, por 72 h. Depois do período de incubação para cada concentração foi realizada a leitura em câmara de Neubauer, com a contagem dos parasitos. Cada concentração foi testada em duplicata no mesmo experimento, e foram realizados ao menos três experimentos independentes (BRITTA et al., 2012; SANTOS et al., 2013; STEFANELLO, 2014). O crescimento dos parasitos foi avaliado diariamente por 24, 48 e 72 h após a incubação, através da diluição da cultura dos protozoários em formalina 5% e contagem das células em câmara de Neubauer (BRENZAN et al., 2007).

A atividade antileishmania foi expressa pelo percentual de inibição do crescimento de 50% das formas promastigotas (CI₅₀) e de 90% de inibição das formas promastigotas (CI₉₀) em relação ao controle negativo, sendo a análise realizada por meio de regressão linear. Os dados plotados no gráfico demonstraram a relação da concentração da amostra testada e a porcentagem de inibição do crescimento (BRITTA et al., 2012; STEFANELLO, 2014).

4.2.2.6 - Atividade Antiproliferativa sobre Formas Amastigotas Axênica de *L. amazonensis* do Extrato Bruto, Frações e Substâncias Isoladas da casca do caule de *A. macrocarpon*.

As formas amastigotas axênicas da mesma maneira que as promastigotas foram utilizadas para o experimento na fase logarítmica de crescimento (48 h), e na mesma concentração (1×10^6 células/mL), mas foi utilizado o meio de Schneider com a adição de 20% de SFB. A atividade antiproliferativa foi conduzida em placas de cultura de células estéreis de

12 poços (TPP[®]), e acondicionada em estufa a 32 °C, por 72 h. Todos os demais procedimentos foram iguais aos realizados para a forma promastigota (item 4.2.2.5) (BRITTA et al., 2012; STEFANELLO, 2014).

4.2.2.7 - Atividade Antiproliferativa em Formas Amastigotas Intracelulares de *L. amazonensis* da Fração Isolada da Casca do Caule de *A. macrocarpon*.

Os macrófagos foram obtidos da cavidade intraperitoneal dos camundongos BALB/c e ressuspendidos em uma concentração de 5×10^5 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, e adicionados (500 µL) em placa de cultura de células de 24 poços, com lamínulas de vidro redondas no interior de cada poço. Após, a placa foi incubada por 2 h em estufa a 37 °C, umidificada e com tensão de 5% de CO₂. Depois deste período de incubação a placa foi analisada no microscópio invertido (OLYMPUS[®]), para observação dos macrófagos que aderiram nas lamínulas no interior dos poços. Em seguida, as células não aderidas foram removidas por enxague com meio de cultura (KAPLUM, 2014).

Os macrófagos que aderiram nas lamínulas foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, na fase estacionária de crescimento (culturas de 5 - 6 dias de repique), e incubadas por 4 h, a 34 °C em presença de umidade e 5% de tensão de CO₂. Após a incubação a fração foi diluída em RPMI 1640 suplementada com 10% de SFB, e adicionada nos respectivos poços, depois de lavados com meio RPMI-1640, para retirada das formas promastigotas não internalizadas. Cada concentração foi realizada em duplicata no mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados (KAPLUM, 2014).

Após um período de incubação de 48 h, a 34 °C em estufa úmida com 5% de tensão de CO₂, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas foram fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com Giemsa 10% em PBS durante 40 minutos. As lamínulas depois de secas foram montadas sobre lâminas e coladas com Entellan (MERCK[®]), após foram visualizadas em microscópio ótico (OLYMPUS[®] CX31) para contagem de 200 células, em imersão a fim de quantificar a porcentagem de macrófagos infectados e o número amastigota por macrófago peritoneal. Foi obtido assim o Índice de Sobrevivência (Is), de acordo com a equação abaixo (KAPLUM, 2014):

$$Is = \frac{\% \text{ Macrófagos Infectados} \times \text{Número de Amastigotas por Macrófago}}{\text{Número de Macrófagos Contados}}$$

Através do Is foi possível calcular o percentual de inibição do crescimento de 50% das amastigotas intracelulares em relação ao controle negativo (CI₅₀). A análise foi realizada por meio de regressão linear, e a Anfotericina B foi utilizada como controle positivo.

4.2.2.8 - Avaliação da Citotoxicidade sobre Macrófagos J774-A1

Neste ensaio foi preparada uma suspensão de macrófagos da linhagem J774-A1 após 72 h do repique (fase logarítmica de crescimento) na concentração de 5×10^5 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, foram adicionados (100 µL) nos poços da placa de 96 poços (TPP[®]) que foi incubada por 24 h, em estufa a 37 °C, umidificada, e com 5% de tensão de CO₂ (BRITTA et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

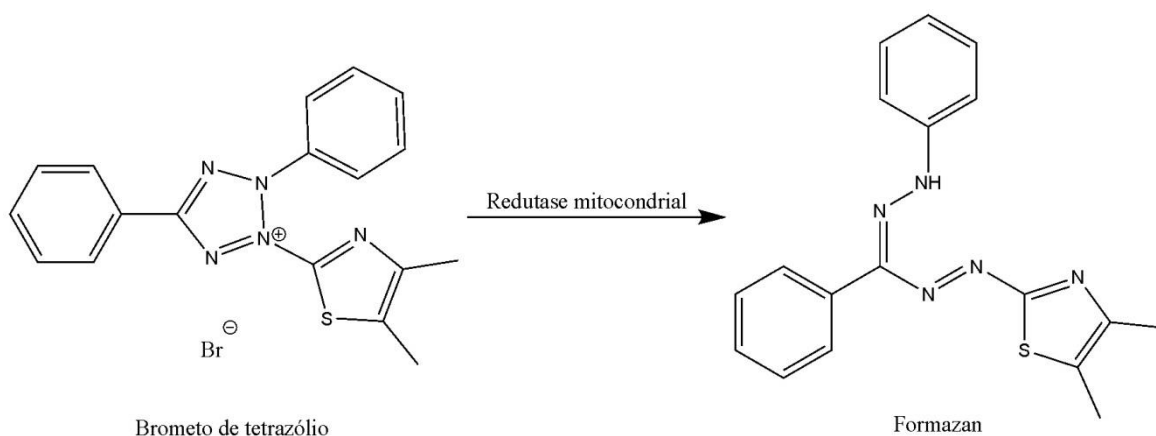
Após o período de 24 h, a placa foi visualizada em microscópio invertido (OLYMPUS[®] CKX41) para verificação da confluência dos macrófagos, que aderiram e multiplicaram-se nos poços. O sobrenadante foi retirado de cada poço, e em seguida foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações da amostra teste (extrato, frações, substância isolada). Alguns poços foram separados como controle negativo (meio e macrófagos) e outros não foram adicionados nada, foi considerado branco. Em seguida, a placa foi novamente incubada em estufa a 37 °C, em presença de umidade, e 5% de CO₂, por 48 h (BRITTA et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Depois do período de 48 h, foi retirado da placa os 100 µL das diferentes concentrações das amostras testes, e o meio dos poços controle, em seguida os poços foram lavados com 100 µL de tampão fosfato salina (PBS), posteriormente foi adicionado 50 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio ou brometo de tetrazólio) (AMRESCO[®]), na concentração de 2 mg/mL. O MTT é utilizado em ensaios de viabilidade celular, pois na presença de células viáveis, são reduzidos, pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, a cristais de formazan que apresentam coloração púrpura (Figura 9). Este processo ocorre quando há enzima ativa em células responsáveis pela cadeia respiratória (mitocôndria) encontram-se intacta. Logo, a presença do formazan indica a presença de células viáveis e pode ser quantificado por espectrofotômetro (MOSMANN, 1983; LIU et al., 1997).

A placa foi novamente incubada por 4 h na ausência de luz, a 37 °C, em tensão de CO₂ e presença de umidade. Então foram adicionados 150 µL de DMSO como solução de lise para romper as células e solubilizar os cristais de formazan (cor púrpura) (Figura 9). A leitura foi

realizada na sequência em um leitor de microplacas (BIO-TEK® Power Wave XS spectrophotometer) a 570 nm (MOSMANN, 1983), pouco antes da leitura a placa foi agitada no próprio leitor de placas, durante 60 segundos para solubilização dos cristais formazan. Os resultados foram expressos com base em três experimentos independentes, sendo que para cada ensaio as amostras foram testadas em triplicata na placa. Os dados foram plotados em um gráfico de porcentagem de macrófagos (células) viáveis em relação à concentração de amostra testada. Determinado desta forma a concentração da amostra teste capaz reduzir 50% da densidade óptica das células tratadas (CC₅₀) em relação ao controle negativo, a análise foi realizada graficamente por meio de regressão linear. Desta maneira foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS), (descrito no item 4.2.2.7) (BRENZAN et al., 2007; VENDRAMETTO et al., 2010; KAPLUM, 2014).

Figura 9 - Esquema da reação de conversão do MTT em cristais de formazan.



Fonte: a autora, 2015, adaptado de TEIXEIRA, 2012.

4.2.2.9 - Avaliação da Citotoxicidade sobre Células LLCMK₂

Para avaliação a citotoxicidade dos extratos brutos de *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium* (amostras testes) foram utilizadas cultura de células LLCMK₂ confluentes (inóculo de 2,5 x 10⁵ células/mL) em microplaca com 96 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de SFB, e incubadas por 24 h, a 37 °C, em 5% de CO₂, e atmosfera umidificada. Após 24 h o meio foi substituído por diferentes concentrações das amostras testes diluídos em meio DMEM, e incubados por 96 h, a 37 °C, em estufa umidificada, e 5% de CO₂. Depois de 96 h de incubação, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 50

μL de MTT (2,0 mg/mL) em cada poço, e incubados por mais 4 h, então os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO, e a absorbância foi registrada em um leitor de microplacas a 570 nm (RODRIGUES et al., 2014) pouco antes da leitura a placa foi agitada no próprio leitor de placas, durante 60 segundos para homogeneização dos cristais formazan.

A concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) foi observada por análise de regressão linear. A citotoxicidade das amostras sobre células LLCMK₂ também foi comparada com a atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* para determinação do Índice de Seletividade (IS). Onde o IS é a razão: CC_{50} células LLCMK₂/ CI_{50} protozoário. Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos três vezes (VEIGA-SANTOS et al., 2010).

4.2.2.10- Avaliação da Citotoxicidade sobre Eritrócitos Humanos

O efeito do potencial de hemólise foi verificado pela avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos com base no ensaio de lise celular de hemácias. Para o ensaio foi utilizado sangue humano (tipo A+) de doadores voluntários saudáveis, o sangue foi coletado por punção da veia braquial por profissional habilitado (Aceitação 293/2006 COPEP/UEM/PR).

A coleta do sangue foi realizada no momento do uso sem anticoagulantes, e desfibrinado com pérolas de vidro em um erlenmeyer, este foi vagarosamente agitado com movimentos circulares por 15 minutos. Em seguida, o sangue foi lavado com salina glicosada a 1%, esta solução foi centrifugada em tubo tipo Falcon a 3000 rpm por 10 minutos (centrífuga HETTICH[®] – Rotofix 32A). O processo foi repetido até que o sobrenadante tornou-se límpido, e com o pellet de hemácias preparou-se uma suspensão a 6% em salina glicosada 1%, sendo adicionado (100 μL) a uma placa de 96 poços. Após, sobre as hemácias adicionou-se 100 μL das diferentes concentrações das amostras testes. Também foi adicionado na placa o controle negativo (meio, hemácias e 1% de DMSO) e o controle positivo (tensoativo - Triton X - 100 a 1% - SIGMA ALDRICH[®]). A placa foi incubada por 2 h a 37 °C. A próxima etapa consistiu em transferir o conteúdo dos poços para eppendorfs que foram centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos, posteriormente 100 μL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços nova e a absorbância lida a 540 nm em leitor de microplacas (BIO-TEK[®] Power Wave XS). A porcentagem de hemólise foi obtida pela equação a seguir e expressa graficamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes (VEIGA-SANTOS et al., 2010; KAPLUM, 2014; RODRIGUES et al., 2014).

$$\% \text{ de Hemólise} = \frac{((\text{absorbância da amostra teste} - \text{absorbância do controle negativo}) \times 100)}{\text{Controle positivo (Triton X100 1\%)}}$$

4.2.2.11 - Avaliação Flagelar das Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas por 72 h como descrito anteriormente para atividade antiproliferativa, item 4.2.2.5. Neste ensaio foram utilizadas as concentrações de CI_{50} e CI_{90} da F.CHCl₃-203-222. Após o final do experimento antiproliferativo as células foram recolhidas da placa de 24 poços e transferidas para tubos tipo eppendorf e centrifugadas a 3000 rpm, por 5 minutos e lavadas com SFB, por três vezes para retirar o excesso de meio, o pellet foi então re-suspendido em um volume pequeno de SFB e realizado esfregação com lâmina extensora. Após seco a temperatura ambiente o esfregação foi coberto com 20 gotas de corante May-Grünwald⁵ (NEWPROV[®]) por 3 minutos, sem retirar o corante foi gotejado a mesma quantidade de água, e depois de 2 minutos as lâminas foram vertidas. Depois foi adicionado Giemsa⁶ 10% (GIBCO - Karyo MAX[®]) por 30 minutos. Então o corante foi retirado e lavado com picete de água. Após secar as lâminas foram montadas com lamínulas em Entellan (MERCK[®]). Foram contadas 200 células em microscópio óptico (OLYMPUS[®] CX31) com imersão, para quantificação do número de flagelos por parasito comparado ao controle negativo (parasitos não tratados). Foram realizados três experimentos independentes. As aquisições das imagens foram realizadas em microscópio (OLYMPUS[®] BX51) com câmera (OLYMPUS[®] UC30) (STEFANELLO, 2014).

4.2.2.12 - Avaliação da Atividade Antileishmania *in vitro* da Quercetina Isolada e em Combinação com Anfotericina B (Q+A) e Miltefosina (Q+M).

A determinação do efeito antileishmania das combinações de substâncias foi avaliado de acordo com a metodologia “*checkerboard*” e aplicado o índice de combinação proposto por Chou e Talalay (1984), e revisado por Chou (2010) e Zhao, Au e Wientjes (2010). Este método foi utilizado para avaliar a atividade sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e a ação citotóxica das combinações sobre macrófagos J774-A1 e eritrócitos humanos.

⁵ A solução contém: eosina e azul de metileno 180 mg/dL (**Fonte:** bula do fabricante).

⁶ A solução contém: 6.0 g azur II, eosina e 1.6 g azur II por litro em glicerol/metanol (**Fonte:** bula do fabricante).

As diferentes concentrações das combinações entre a quercetina isolada da F.A da casca do caule de *A. macrocarpon* e a anfotericina B (CRISTÁLIA[®]) (Q+A), bem como as combinações da quercetina com a miltefosina (AVANTI POLAR LIPIDS[®]) (Q+M) foram distribuídas na placa segundo esquema demonstrado na Figura 10 para a atividade antiproliferativa em formas promastigotas de *L. amazonensis*, o procedimento metodológico do ensaio foi igual ao descrito no item 4.2.2.5.

Portanto, foi utilizado um inóculo de $1,0 \times 10^6$ células/mL de formas promastigotas de *L. amazonensis*, distribuído em placas de 24 poços na presença de meio Warren suplementado com 10% de SFB, totalizando 900 μ L por poço, então foram adicionados mais 100 μ L em cada poço correspondente as diferentes concentrações das amostras testes, ou seja, foram adicionados 100 μ L de diferentes concentrações de quercetina em combinação com a anfotericina B e em outra placa a combinação de diferentes concentrações de quercetina e miltefosina, além das concentrações destas substâncias isoladamente, sendo a anfotericina B e a miltefosina padronizados para o tratamento de leishmaniose. A diluição da quercetina, anfotericina B e miltefosina a partir da solução estoque foram realizadas em tubos tipo eppendorf. A distribuição na placa de 24 poços foi em ordem decrescente de concentração. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes, e por experimento cada concentração foi realizada em duplicata (Figura 10).

Para a atividade antiproliferativa em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, as diferentes concentrações das combinações entre a quercetina e a anfotericina B (Q+A) e as combinações da quercetina com a miltefosina (Q+M) foram organizadas segundo o esquema demonstrado na Figura 11. E o experimento foi conduzido como descrito no item 4.2.2.7 e da mesma forma que descrito acima para as promastigotas, as combinações e as substâncias isoladas foram diluídas em tubos tipo eppendorf, e distribuídas nas placas de 24 poços. Foram realizados ao menos três experimentos independentes, em duplicata (Figura 11).

A atividade sobre macrófagos J774-A1 pelo método colorimétrico MTT, como descrito no item 4.2.2.8, avaliou a citotoxicidade das combinações Q+A e Q+M em diferentes concentrações e para as substâncias isoladamente, e as diluições partiram das soluções estoque diluídas em DMSO, e seguiram uma ordem decrescente de concentração. Cada concentração foi disposta em triplicata na placa de 96 poços, e foram realizados ao menos três experimentos independentes (Figura 12).

A avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos seguiu o método descrito no item 4.2.2.10, para o ensaio de lise celular de hemácias, as combinações Q+A e Q+M, assim como estas substâncias isoladas foram diluídas em tubo tipo eppendorf e transferidos para as

placas de 96 poços contendo solução com as hemácias, em ordem decrescente de concentração. Assim como, no ensaio com macrófagos os parâmetros de distribuição das concentrações na placa se assemelham, ou seja, em triplicata para cada experimento e foram realizados pelo menos três ensaios independentes (Figura 13).

A análise dos resultados foi calculada e expressa matematicamente como índice de combinação (I_c) (CHOU e TALALAY, 1984; CHOU, 2010; ZHAO; AU e WIENTJES; 2010; TALLARIDA, 2012).

Esta análise foi válida para os experimentos realizados com as formas promastigotas, amastigotas intracelulares, com macrófagos J774-A1 e eritrócitos humanos.

O cálculo para obtenção do I_c segue o descrito abaixo, onde:

$$I_c = \left[\frac{IC_{50} \text{ substância A combinada}}{IC_{50} \text{ substância A sozinha}} \right] + \left[\frac{IC_{50} \text{ substância B combinada}}{IC_{50} \text{ substância B sozinha}} \right]$$

Sendo o numerador as concentrações de cada substância que em combinação são ativas contra 50% das células testadas. Enquanto o denominador expressou as concentrações que apresentaram o efeito em 50% das células testadas para cada substância isoladamente.

O I_c prediz se houve ou não vantagens para o processo de combinação de fármacos utilizado para determinada atividade, ou seja:

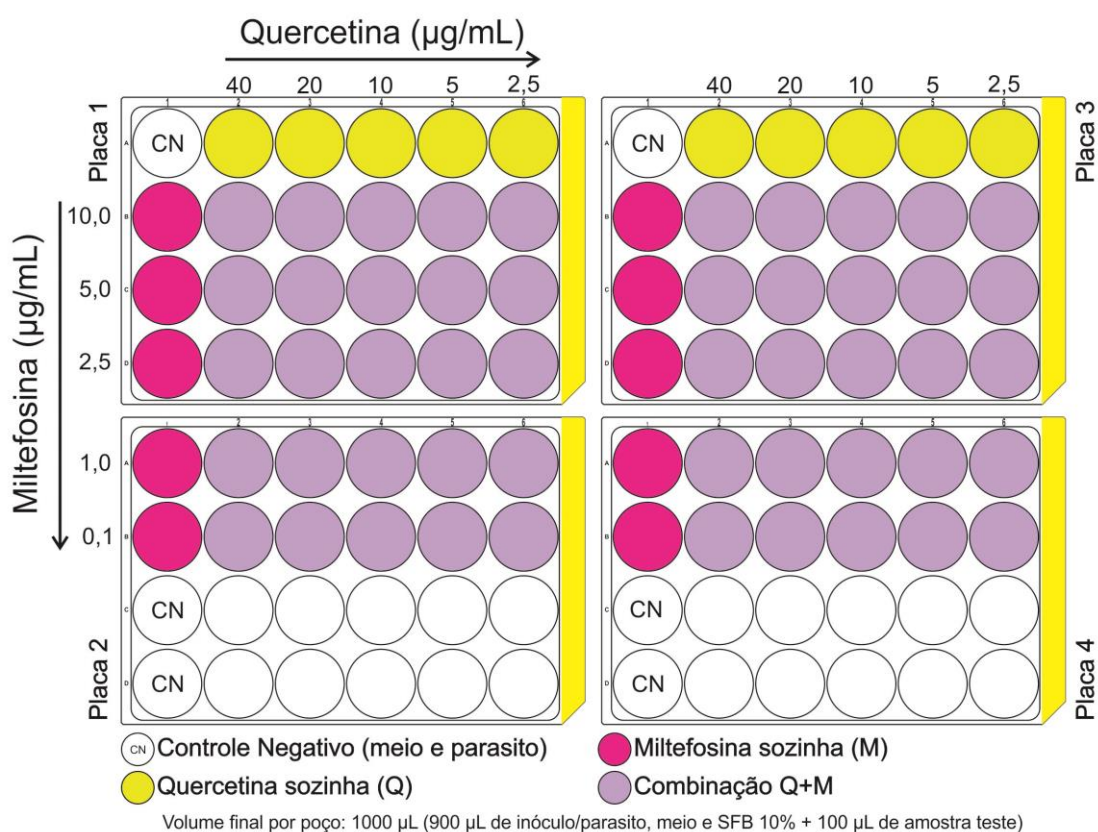
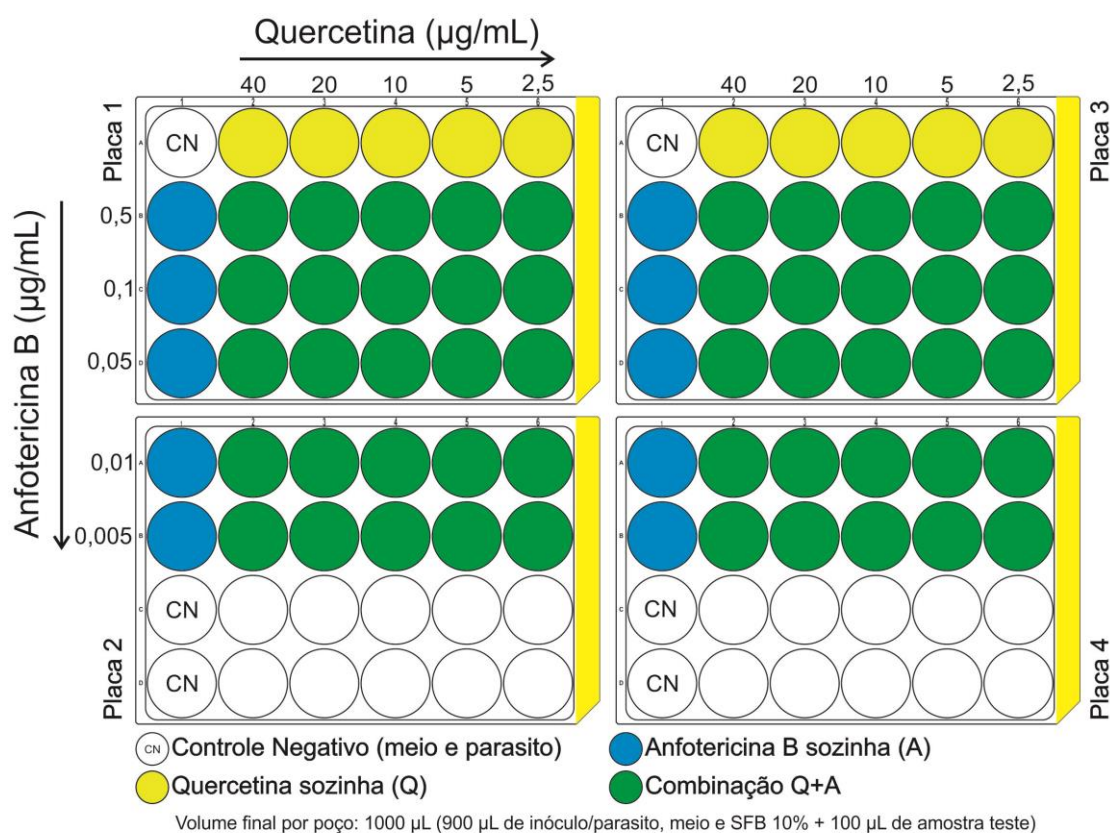
$I_c > 1$ - atividade antagônica, menos eficaz que as substâncias sozinhas;

$I_c = 1$ – efeito aditivo, ação somadas das substâncias, mas não potencializada;

$I_c < 1$ – atividade sinérgica, ação melhorada com a combinação das substâncias em concentrações menores do que quando utilizadas isoladamente.

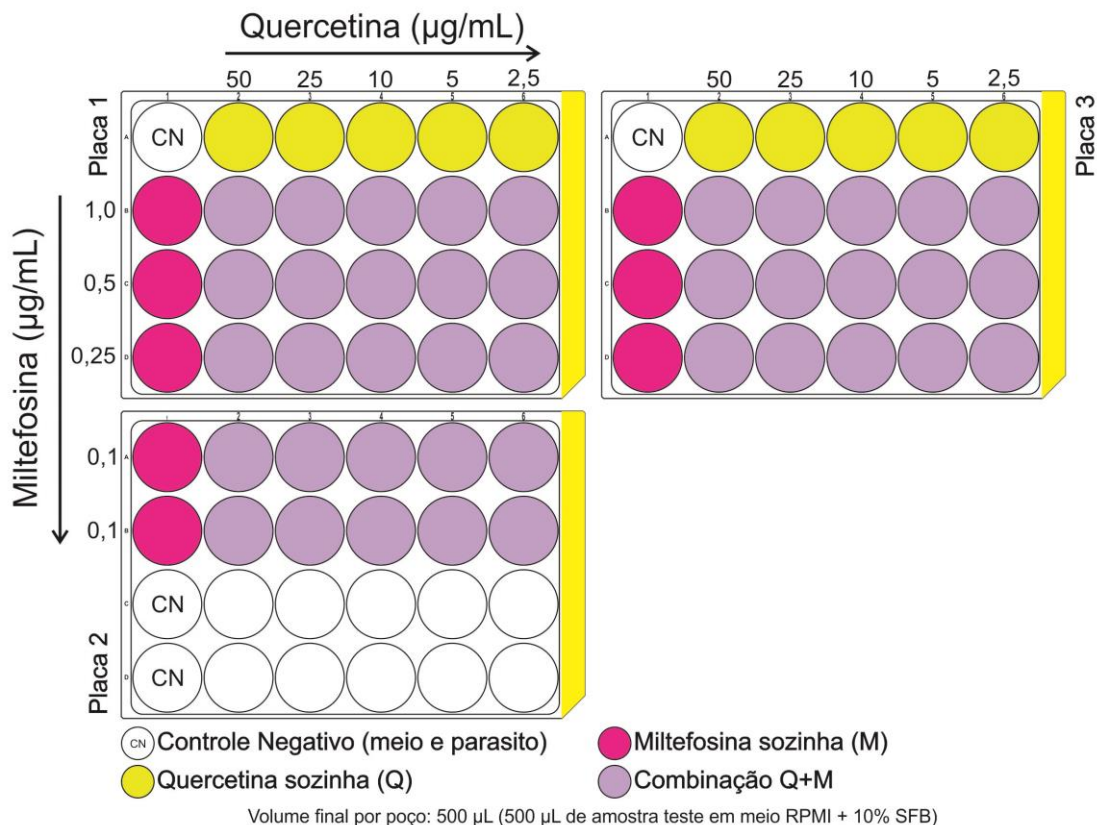
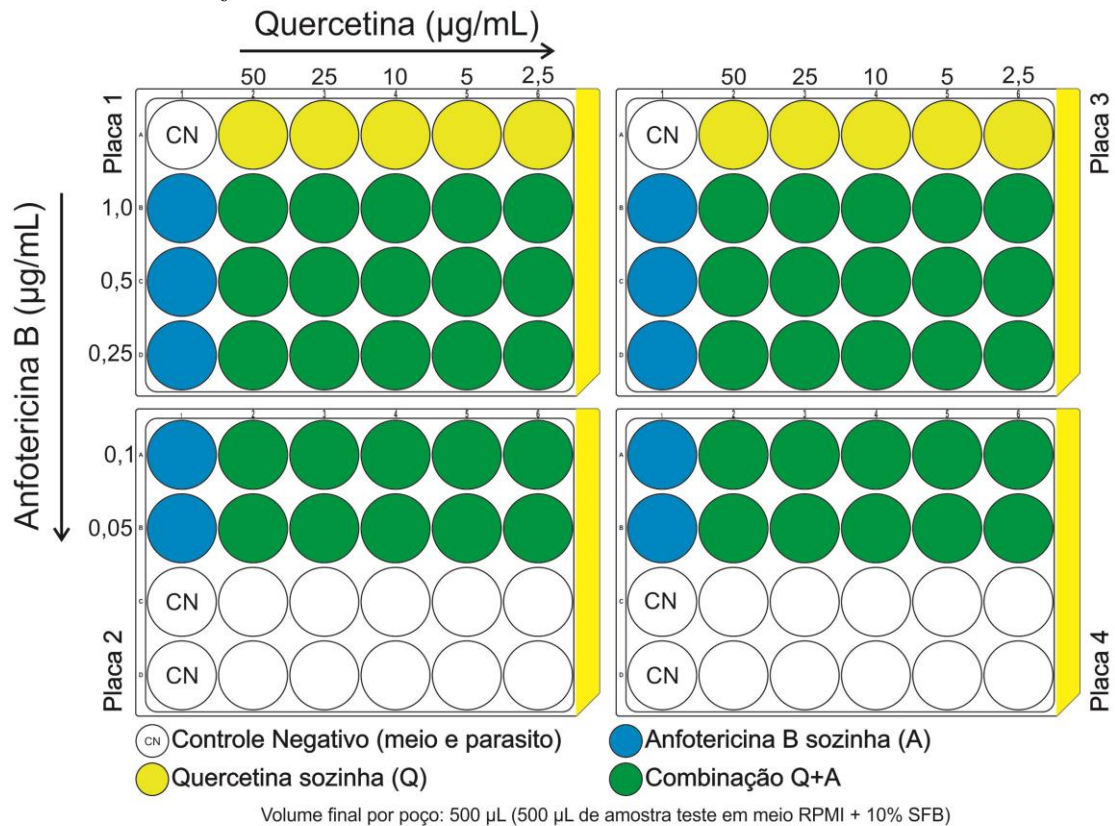
Além da expressão dos resultados pelo I_c , a ferramenta gráfica utilizada para a expressão dos dados de combinação de fármacos foi o isoblograma. Onde, os pontos dispostos sobre o gráfico predizem o resultados, ou seja, pontos abaixo da linha de tendência que cruza o gráfico indicou sinergismo (união dos pontos originou uma curva côncava), sobre a linha aditividade e acima da linha indicaram antagonismo (união dos pontos originou uma curva convexa) (CHOU e TALALAY, 1984; CHOU, 2010; ZHAO; AU e WIENTJES; 2010; TALLARIDA, 2012; RODRIGUES et al., 2014).

Figura 10 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 24 poços utilizadas no experimento para avaliação do efeito antileishmania sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.



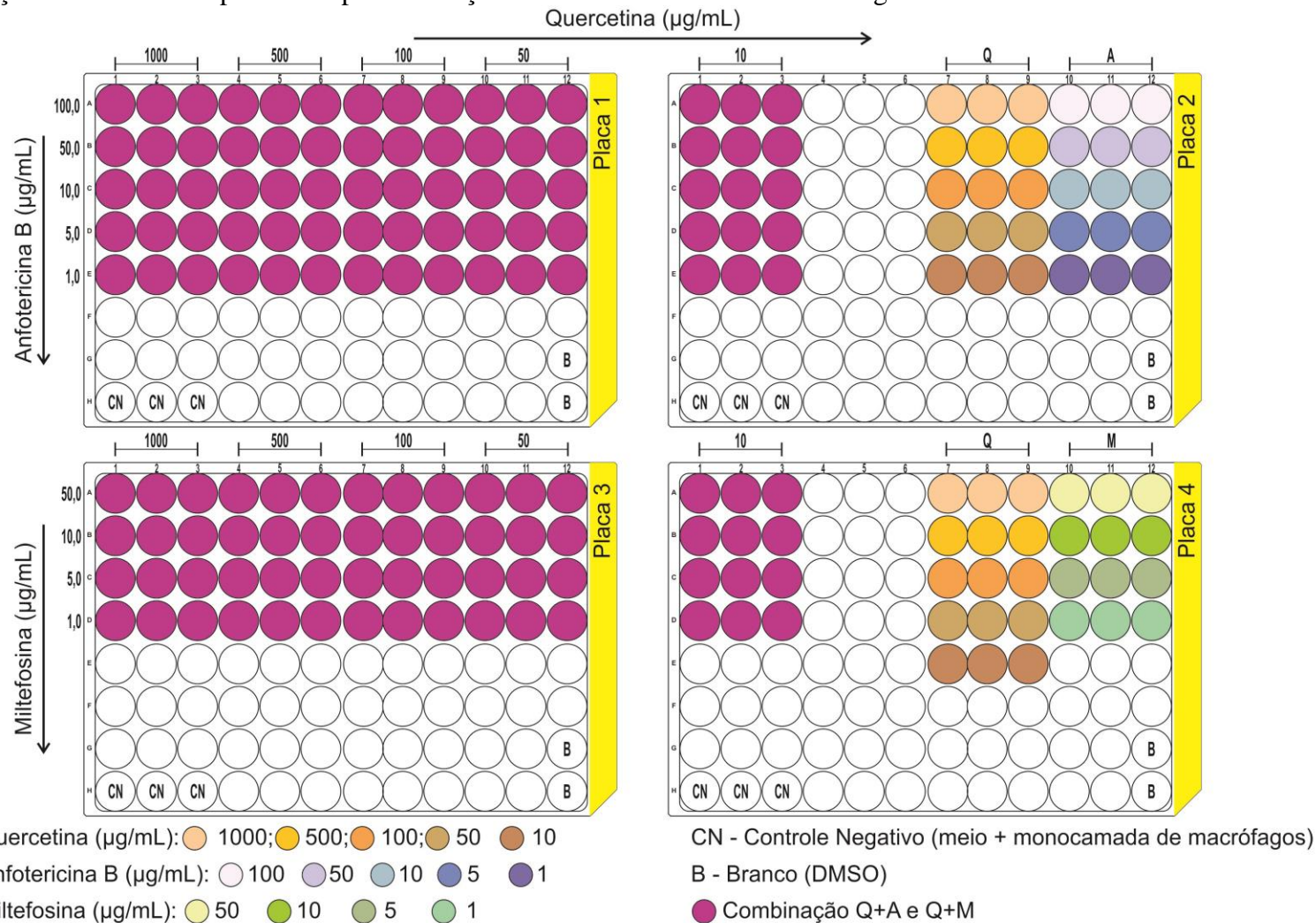
Fonte: a autora, 2015.

Figura 11 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 24 poços utilizadas no experimento para avaliação do efeito antileishmania sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.



Fonte: a autora, 2015.

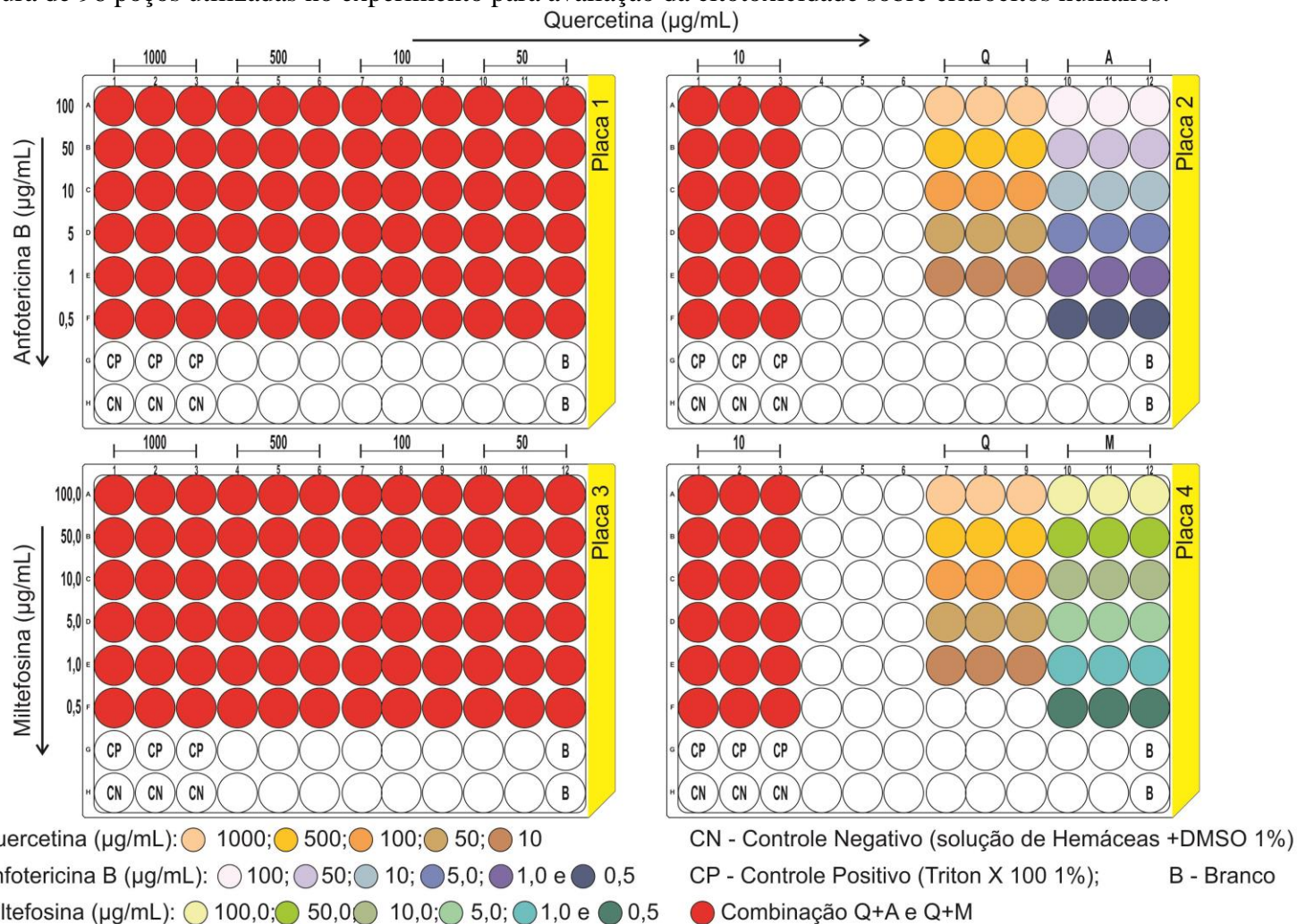
Figura 12 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 96 poços utilizadas no experimento para avaliação da citotoxicidade sobre macrófagos J774-A1.



Foi transferido do tubo tipo eppendorf 100 μL de cada concentração para os poços com a presença da monocamada de macrófagos

Fonte: a autora, 2015.

Figura 13 - Esquema de distribuição das diferentes concentrações das combinações Q+A, Q+M e destas substâncias sozinhas nas placas de cultura de 96 poços utilizadas no experimento para avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos.



Foi transferido do tubo tipo eppendorf 100 μL das diluições das amostras testes para os poços com 100 μL de solução de hemácea

Fonte: a autora, 2015.

4.2.2.13 - Avaliação das Alterações Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura das Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

As alterações morfológicas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura - MEV (SHIMADZU® SS-550). As amostras selecionadas para esta avaliação foram à fração F.203-222 (CI₅₀ e CI₉₀) e a combinação de quercetina e anfotericina B (Q+A) e quercetina mais miltefosina (Q+M), onde foi utilizado o CI₅₀ e o CI₉₀ de ambas as combinações com a melhor atividade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Também foram realizadas micrografias do CI₅₀ e CI₉₀ da quercetina, anfotericina B e miltefosina isoladas. E do controle negativo (promastigotas não tratadas).

Foi utilizado 1×10^6 células/mL de formas promastigotas de *L. amazonensis*, após 48 h de incubação, estas foram tratadas com o CI₅₀ e CI₉₀ das amostras descritas acima, incubadas a 25 °C, por 72 h, este procedimento é um ensaio antiproliferativo como o descrito no item 4.2.2.5. Após este período as células tratadas e não tratadas foram recolhidas e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS, para retirar o excesso de meio. Foi utilizado o *pellet* das amostras tratadas e não tratadas, que após serem lavadas foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (E.M.S.® - Electron Microscopy Sciences – HATFIELD PA, USA) 0,1M, pH 7,2 a temperatura ambiente por 2 h. Esta fixação garantiu a integridade das células para os passos seguintes da técnica.

As formas promastigotas foram então lavadas por três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1M, depois estas foram gotejadas sobre pequenos pedaços lamínulas de vidro devidamente cortadas e recobertas com solução de poli-L-lisina 0,1% em água (p/v) (SIGMA-ALDRICH®), e incubadas por 1 h em estufa a 56 °C, para secagem das amostras e aderência das mesmas sobre as lamínulas. Em seguida as lamínulas foram novamente lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (E.M.S.® - Electron Microscopy Sciences – HATFIELD PA, USA), e simultaneamente foi realizada a retirada do tampão cacodilato e iniciado o procedimento de desidratação em gradiente crescente de etanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 e 100%), no último gradiente (etanol 100%) as lamínulas foram lavadas três vezes. Em cada gradiente o tempo de desidratação foi de 15 minutos.

Todos estes procedimentos até a desidratação com o etanol 80% foram realizados em placas de 24 poços, após as lamínulas foram transferidas para o porta amostra (cesta permeável), e mergulhadas dentro de um béquer com álcool 85%, até o etanol 100%. A fim de obter amostra isentas de umidade, transferidas para o aparelho de Ponto Crítico, onde ocorreram várias substituições da água residual presente na amostra por dióxido de carbono

(CO₂). O material biológico seco sobre as lamínulas foi colocado sobre um suporte de metal (*stub*) com fita dupla face para fixar as lamínulas, em seguida foi metalizada com uma camada de ouro (material condutor) para serem visualizadas em microscópio eletrônico de varredura – MEV (SILVEIRA, 2007; RODRIGUES et al., 2014).

4.2.2.14 - Avaliação das Alterações Ultraestruturais por Microscopia Eletrônica de Transmissão das Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

As mesmas amostras, nas mesmas concentrações, processadas e visualizadas por MEV foram submetidas ao ensaio para visualização das alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão – MET, das formas promastigotas de *L. amazonensis*.

As suspensões contendo $1,0 \times 10^6$ células/mL de formas promastigotas de *L. amazonensis*, foram tratadas ou não com IC₅₀ e IC₉₀ das amostras testes e cultivadas em meio Warren, suplementado com 10% de SFB inativado e incubadas durante 72 h em estufa a 25 °C, descrito anteriormente no item 4.2.2.5.

Após, estas culturas foram centrifugadas (300 rpm por 10 minutos) o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas com PBS e pré-fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (E.M.S.[®] - Electron Microscopy Sciences – HATFIELD PA, USA) (pH 7,4) a temperatura ambiente, por 2 h. Depois as promastigotas foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1,0% (E.M.S.[®] - Electron Microscopy Sciences – HATFIELD PA, USA) e ferrocianeto de potássio 0,8% (E.M.S.[®] - Electron Microscopy Sciences – HATFIELD PA, USA) por 60 minutos na ausência de luz. Em seguida as células foram lavadas novamente com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por três vezes e desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100%) (ATTIAS, 2007).

A próxima etapa do processo consistiu na inclusão das promastigotas tratadas ou não em resina do tipo epóxi em estado líquido – epon (POLYBED[®] - kit de Resina Epon 812), com concentrações crescentes de resina e decrescente de acetona, iniciou-se na proporção 2:1 (resina:acetona), seguida de 1:1 (resina:acetona), depois 2:1 (resina:acetona), e resina pura. As amostras foram transferidas para um molde de silicone com identificação para cada amostra e a fim de promover a polimerização da resina de epon, o molde foi mantido em estufa a 60 °C, por 72 h (ATTIAS, 2007; RODRIGUES et al., 2014).

A etapa subsequente à solidificação do material (polimerização da resina) foi à retirada dos blocos de resina da forma e a lapidação dos mesmos. Em seguida, foram confeccionados cortes ultrafinos em escala nanométrica (60 a 70 nm) no ultramicrotomo (POWER TOME[®] X

RMC Products). Os cortes foram recolhidos do ultramicrotomo com grades de cobre (300 mesh) (E.M.S.[®] - Electron Microscopy Sciences – Hatfield PA, USA) e contrastados com acetato de uranila (EMS[®] – Electron Microscopy Sciences– Hatfield PA, USA) por 40 minutos, após lavados com água, secos em papel filtro e contrastados com citrato de chumbo (E.M.S.[®] – Electron Microscopy Sciences– Hatfield PA, USA) por mais 40 minutos, lavados em água e secos a temperatura ambiente (ATTIAS, 2007; RODRIGUES et al., 2014).

As grades contrastadas contendo as amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão – MET (JEOL JEM 1400), com feixe eletrônico emitido por filamento de tungstênio, e tensão de aceleração dos elétrons de 80 Kv de energia (ATTIAS, 2007).

4.2.2.15 – Citometria de Fluxo

Os ensaios para avaliação dos possíveis mecanismos de ação da fração F-203-222 (amostra teste) da casca do caule de *A. macrocarpon*, sobre formas promastigotas foram realizados em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (BECTON-DICKINSON[®], Rutherford, NJ, EUA) e os dados adquiridos foram analisados pelo software CellQuest (Joseph Trotte, Scripps Institute, La Jolla, CA, EUA), utilizou laser de argônio para excitação dos marcadores que emitiram fluorescência em comprimentos de ondas específicos e foram quantificados 10.000 eventos (células) para cada análise, em região específica que correspondeu ao parasito (formas promastigotas de *L. amazonensis*).

Foram utilizadas as seguintes concentrações das amostras testes: 25, 50, 100 e 200 µg/mL. Considerando que o período de tratamento das formas promastigotas para os ensaios utilizando o citômetro de fluxo foi de 24 h. Para cada análise foram utilizados marcadores específicos e controles positivos relacionados com a análise. Após o período de incubação de 24 h das formas promastigotas utilizadas para todas as análises por citometria de fluxo, os procedimentos foram realizados fora da capela de fluxo laminar. Todos os experimentos foram conduzidos na ausência de luz, e os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2.2.15.1 - Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizou como marcador celular a rodamina 123 (Rh 123) (SIGMA[®], St Louis, Mo, USA). As formas promastigotas, foram utilizadas após 48 h de cultivo, na concentração de $5,0 \times 10^6$ células/mL, contadas em câmara de Neubauer, depois tratadas ou não com as amostras testes, e incubadas por 24 h, a 25 °C. Neste experimento o controle positivo foi o cianeto de carbonil 3-clorofenil-hidrazona (CCCP) (SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, MO, USA) na concentração de 100 μ M, adicionado após o tratamento com o marcador Rh 123.

Depois da incubação as promastigotas foram retiradas da placa de 24 poços e transferidas para tubos tipo eppendorf identificados, respeitando cada concentração da amostra teste e do controle. Então foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas duas vezes com solução salina 0,9%, e o *pellet* com as promastigotas foi ressuscitado em 500 μ L de solução salina 0,9%. Após foi adicionado 1 μ L da solução de rodamina 123 (5mg/mL em etanol – 13,1 μ M) incubados por 15 minutos a temperatura ambiente, e ao abrigo da luz. Então foram novamente lavadas com salina 0,9%, ressuscitadas em salina 0,9% e incubadas por mais um período (30 minutos, a temperatura ambiente, na ausência de luz).

Após a incubação e ressuspensão dos *pellets*, foi realizada a aquisição de 10.000 eventos na região correspondente ao parasito no citômetro de fluxo. O marcador Rh 123 apresenta excitação em comprimento de onda de 480 nm e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (detector FL1). Alterações neste marcador que se acumulou na mitocôndria foi quantificada usando um índice de variação (iv) obtido pela equação $(Mt-Mc) / Mc$, onde Mt é a média da fluorescência dado pelos parasitos tratados com as diferentes concentrações de F.CHCl₃-203-222, e Mc é a média da fluorescência dos parasitos não tratados. Valores negativos de iv corresponderam à despolarização da membrana mitocondrial (BRITTA et al., 2012; GARCIA et al., 2013; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013).

4.2.2.15.2 - Avaliação da Integridade da Membrana Celular em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

O marcador utilizado para avaliação da integridade de membrana foi o iodeto de propídio (IP) (INVITROGEN[®]- Eugene, OR, USA), este é excitável por laser de argônio a

488 nm e promove emissão de fluorescência de 630 nm. Nesta avaliação utilizou-se culturas de 48 h com inóculo de 5×10^6 células/mL, em seguida foram tratadas ou não (controles negativos) com diferentes concentrações da F.CHCl₃-203-222, e incubadas por 24 h a 25 °C. O controle positivo foi a digitonina (40 µM) (SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, MO, USA), adicionado às células do parasito logo após a adição do IP.

Com 24 h de incubação as promastigotas foram recolhidas da placa e adicionadas em tubos tipo eppendorf, centrifugadas (3000 rpm por 5 minutos) e descartado o sobrenadante, os *pellets* foram ressuspensos em 500 µL de PBS (0,01 M, pH 7,2), lavados por duas vezes. Então os pellets com as promastigotas foram novamente ressuspensos em 500 µL de PBS e adicionados 50 µL de IP (2,0 mg/mL), agitados levemente e incubados por 5 minutos, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida foram analisados no citômetro de fluxo (GARCIA et al., 2013; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; VOLPATO et al., 2013; BRITTA et al., 2014).

4.2.2.15.3 - Avaliação da Exposição da Fosfatidilserina em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliar a exposição da fosfatidilserina foram utilizados os marcadores anexina V marcada com fluorocromo verde de isotiocianato de fluoresceína ou ficoeritrina (Anexina V - FITC) (INVITROGEN[®] - Eugene, OR, USA) e o iodeto de propídio (IP) (INVITROGEN[®] - Eugene, OR, USA). A anexina-V FITC é excitável por laser de argônio em 480 nm e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm. A anexina é uma proteína de ligação para fosfolipídios, com maior especificidade para a fosfatidilserina.

O procedimento iniciou-se quando formas promastigotas com 48 h de cultivo foram incubadas (inóculo de 5×10^6 células/mL) na presença ou ausência (controle negativo) de tratamento com F.CHCl₃-203-222 em diferentes concentrações, por 24 h. Em seguida as promastigotas foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em tampão de ligação e adicionados 5 µL de anexina-V marcado com FITC, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Depois foram adicionados 400 µL de tampão de ligação e pouco antes da realização da leitura em citômetro de fluxo foi adicionado 50 µL do IP (2,0 mg/mL). Então foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. O controle positivo foi o CCCP (100,0 µM) e o controle negativo foi considerado os parasitos não tratados. O tampão de ligação consistiu de uma

solução de pH 7,4 com os seguintes sais: 140 mM de NaCl (SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, MO, USA); 2,5 mM de CaCl₂ (SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, MO, USA) e 10 mM de HEPES-Na (HEPES - ácido *N*-(2-hidroxietil)-piperazina-*N'*-2-etanosulfônico, sal de sódio) (SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, MO, USA), o mesmo foi armazenado em geladeira (GARCIA et al., 2013; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013).

As populações de formas promastigotas analisadas neste evento avaliaram a fluorescência do FITC excitável por laser de argônio em 480 nm e com emissão de fluorescência entre 515-530 nm (detector FL1) e a fluorescência do iodeto de propídeo (IP) em 630 nm (detector FL2). Foi observada a porcentagem de células em apoptose quando o resultado apresentou positivo para anexina-V FITC, sendo IP positivo ou negativo. E os parasitos foram considerados em necrose quando IP foi positivo e Anexina-V FITC negativo (BRITTA et al., 2012; GARCIA et al., 2013; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013).

4.2.2.15.4 - Avaliação do Volume Celular em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliação do volume celular não foi utilizado marcador, as formas promastigotas após cultivo de 48 h, tiveram o inóculo ajustado para $5,0 \times 10^6$ células/mL, foram ou não tratadas com as amostras testes e com o controle positivo actinomicina D (50 mM) (SIGMA-ALDRICH[®], St. Louis, MO, USA), que promove a diminuição do volume celular. Depois de 24 h da incubação em estufa a 25 °C, as promastigotas tratadas e não tratadas (controle negativo) foram centrifugadas em tubos tipo eppendorf (3000 rpm por 5 minutos), lavadas duas vezes com PBS (500 µL). Após o último processo de lavagem as promastigotas foram novamente ressuspensas com 500 µL de PBS e encaminhadas para a aquisição de 10.000 eventos em citômetro de fluxo, que foram adquiridos na região correspondente ao parasito (BRITTA et al., 2012; GARCIA et al., 2013; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014).

4.2.2.15.5 - Avaliação do Ciclo Celular em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

As formas promastigotas (5×10^6 células/mL), com 48 h de cultivo, foram tratadas ou não (controle negativo) com as amostras teste, e incubadas por 24 h, a 25 °C. O taxol (20

$\mu\text{g/mL}$) (Paclitaxel - SIGMA[®]) foi utilizado como controle positivo. Depois da incubação os parasitos foram lavados duas vezes em PBS (pH 7,4) e centrifugados (3000 rpm por 5 minutos). O *pellet* foi ressuscitado em 500 μL da mistura de metanol gelado a 70% em PBS (v/v), os tubos tipo eppendorf com as respectivas concentrações foram agitados lentamente e mantidos a 4 °C por 1 h. Depois o pellet foi centrifugado e ressuscitado em PBS (500 μL) e adicionado mais 20 μL de iodeto de propídeo com RNase A, livre de DNase (IP-RNase A), um componente do kit do ensaio da APO-BrdU TUNEL (LIFE TECHNOLOGIES[®] - Molecular Probes), após foram incubados por 45 minutos a 37 °C. Os dados foram adquiridos por citômetro de fluxo. Os resultados apresentaram a distribuição da população das formas promastigotas na diferentes fases do ciclo celular: fase sub-G0/G1 (aquisição M1), fase G0-G1 (aquisição M2), fase S e fase G2/M (aquisição M3), os dados foram expressos em porcentagens de células presentes em cada estágio do ciclo comparados com o controle de parasitos não tratados (controle negativo), e os eventos (10.000 células) foram adquiridos na região que corresponde ao parasito (GARCIA et al., 2013; STEFANELLO, 2014).

4.2.2.16 - Análise Estatística

Os dados mostrados nas tabelas e gráficos expressam a média \pm desvio padrão (DP) da média de pelo menos três experimentos independentes, para todos os experimentos celulares, onde a concentração relativa à inibição de 50% e 90% do crescimento das células (IC_{50} e IC_{90} e CC_{50}) foi obtida a partir da concentração-resposta. Os dados foram analisados utilizando o teste ANOVA (one ou two-way), seguido do teste *post test* de Tukey ou Bonferroni, respectivamente, considerando $*p \leq 0,05$ significativo. A análise estatística foi realizada em Prism 5 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA, 2007).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Avaliação do Potencial Antibacteriano e Antifúngico do Extrato Bruto e Frações obtidas de *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium*.

Os resultados e discussão descritos abaixo foram publicados no *Pharmacology On Line* (2012) e estão no anexo B no final da tese.

Na análise dos resultados do teste de susceptibilidade microbiana, realizado pelo método de microdiluição foi avaliada a concentração inibitória mínima (CIM), e a atividade foi considerada boa para CIM < 100 µg/mL, moderada para a CIM entre 100 e 500 µg/mL, fraca para CIM entre 500 e 1000 µg/mL e inativa para CIM > 1000 µg/mL, onde a amostra teste não apresentou inibição microbiana até a concentração testada. E o CBM e CFM foram definidos como a menor concentração que apresentou subculturas negativas ou somente uma colônia (HOLETZ et al., 2002).

O extrato bruto etanólico da casca da raiz de *A. tomentosum* (AT1) demonstrou atividade antibacteriana fraca sobre *S. aureus* e *B. subtilis* (CIM: 1000 e 500 µg/mL, respectivamente) (Tabela 5) e não apresentou atividade contra as leveduras testadas (CIM: >1000 µg/mL). Para a espécie *A. pyriformium* somente a fração alcaloídica (AP5.ALC) do caule apresentou uma atividade moderada com CIM de 125 e 250 µg/mL para *S. aureus* e *B. subtilis*, respectivamente (Tabela 5), e a CBM foi de 1000 µg/mL para ambas as bactérias. Esta fração (AP5.ALC) também demonstrou um atividade fraca contra *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (CIM: 500 µg/mL, para ambas as leveduras) (Tabela 6).

A fração acetato de etila (AM4F.A) (CIM: 250 µg/mL) e a fração alcaloídica (AM4F.ALC) (CIM: 500 µg/mL) do caule de *A. macrocarpon* apresentaram atividade fraca para *C. parapsilosis* (Tabela 6). Os extratos e demais frações de *A. macrocarpon* não demonstraram atividade contra as bactérias testadas (CIM >1000 µg/mL).

Contudo, segundo relatos da literatura para a espécie *A. macrocarpon* foram descritas atividade contra tripanosomatídeos, como apresentado por Mesquita et al. (2005) para o extrato hexano das folhas de *A. macrocarpon* contra formas amastigotas de *T. cruzi* (CI₅₀: 59,2 ± 1,2%). E o estudo demonstrado por Mesquita et al. (2007), para o extrato etanólico da casca da raiz de *A. macrocarpon* com atividade contra o *Plasmodium falciparum* (CI₅₀: 4,9 ± 1,1 µg/mL).

Os outros extratos e frações das espécies de *Aspidosperma* descritas neste estudo e não demonstrados nas Tabelas 5 e 6, não apresentaram atividades sobre os micro-organismos testados neste trabalho, nas concentrações e técnica utilizada (CIM >1000 µg/mL).

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2009a) com os extratos brutos etanólicos da casca do caule de diferentes espécies de *Aspidosperma*, entre elas *A. disperrum*, *A. polyneurum* e *A. pyriformium* que apresentaram CIM > 1000 µg/mL sobre as bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL) de *A. tomentosum* e da *A. pyriformium* sobre bactérias Gram positiva e Gram negativa.

Amostras	Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AT1	1000	500	>1000	>1000
AP5 F.ALC	125	250	>1000	>1000
Penicilina	0,019	-	-	-
Vancomicina	-	0,18	-	-
Tetraciclina	-	-	1,57	3,15

AT1: Extrato etanólico da casca da raiz de *A. tomentosum*. **AP5 F.ALC:** Fração alcaloídica do extrato etanólico do caule de *A. pyriformium*. **Fonte:** a autora, 2015.

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL) das frações de *A. macrocarpon* e da *A. pyriformium* em espécies de *Candida*.

Amostras	Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
AM4.F.A	>1000	250	1000
AM4.F.ALC	>1000	500	500
AP5.ALC	>1000	500	500
Nistatina	1,56	1,56	3,12

AM4.F.A: fração acetato de etila do caule de *A. macrocarpon*; **AM4.F.ALC:** fração alcaloídica do caule de *A. macrocarpon*; **AP5.ALC:** fração alcaloídica do caule de *A. pyriformium*. **Fonte:** a autora, 2015.

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações das espécies de *Aspidosperma* testados contra as bactérias Gram positiva, Gram negativa, e espécies de *Candida* neste trabalho não apresentaram resultados significativos. Embora, resultados da literatura

descrevam a utilização de espécies de *Aspidosperma* do Suriname com atividade antimicrobiana, como a observada para os alcaloides do tipo secamina isolados do caule da casca da *A. marcgravianum* Woodson. Os alcaloides secamina: tetrahydro-secamina, decarbometóxi-tetrahydro-secamina e três alcaloides indólicos monoméricos: dihydro-corinanteol, e os derivados filinos 10,11-dimetóxi-picrafilino e o hidroxí-dimetóxi-picrafilino foram ativos contra bactérias Gram positiva (*S. aureus* e *B. subtilis*) e os alcaloides indólicos aspidoscarpina, reserpinina e reserpilina apresentaram ação contra *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (VERPOORTE; RUIGROK e BAERHEIM, 1982).

De acordo com Verpoorte et al. (1983), os alcaloides isolados da casca da raiz de *A. excelsum* Benthly apresentaram atividade contra a bactéria Gram positiva *B. subtilis*, a melhor atividade foi para o alcaloide 16-demotoxi-carbonil-tetrahydro-secamina (CIM de 0,07 mg/mL).

Granato et al. (2005) relataram a atividade antibacteriana para o extrato etanólico obtido da madeira da espécie *A. polyneuron* que apresentou ação contra *Proteus mirabilis* (halo de 21 mm de inibição). Enquanto, Ferreira et al. (2003) realizaram um estudo com o extrato etanólico da raiz, caule e folha de *A. polyneuron* que foram inativos sobre os microorganismos *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Alternaria* sp., *Botryosphaeria* sp., *Pleurotus ostreatus*, e contra a *C. albicans*.

Outros resultados semelhantes aos relatados na Tabela 5 e 6, foram averiguados por Tanaka et al. (2006), onde o extrato metanólico da casca do caule da espécie de *A. ramiflorum* demonstrou atividade moderada contra *B. subtilis* (CIM: 250 µg/mL) e *S. aureus* (CIM: 500 µg/mL), e foram inativos contra *E. coli* e *P. aeruginosa* (CIM: > 1000 µg/mL). Entretanto, os alcaloides bis-indólicos ramiflorina A e ramiflorina B apresentaram boa atividade contra *S. aureus* (CIM: 25 µg/mL) e *Enterococcus faecalis* (CIM: 50 µg/mL).

Souza et al. (2006) descreveram a atividade dos alcaloides ramiflorina A e B contra diferentes cepas do fungo *Cryptococcus neoformans* (CIM: 3,12 - 12,5 µg/mL e CIM: 12,5 - 25 µg/mL, respectivamente).

Segundo Agripino et al. (2004), o extrato bruto etanólico de galhos e folhas de *A. ramiflorum* e de *A. olivaceum* foram inativos contra *S. aureus* e *C. albicans*.

Enquanto, Oliveira et al. (2009a) relataram que os extratos brutos etanólico de *A. pyricolum* e *A. olivaceum* foram moderadamente ativos contra *B. subtilis* (CIM/MBC: 125 e

250 µg/mL e CIM/MBC: 250 e >1000 µg/mL, respectivamente), e inativos para *E. coli* e *S. aureus*.

Neste estudo (Tabela 5 e 6) a CIM demonstrada para o extrato etanólico da casca da raiz de *A. tomentosum* (AT1) foi fraca para *S. aureus* (CIM: 1000 µg/mL) e *B. subtilis* (CIM: 1000 µg/mL), sendo inativas para as bactérias Gram negativas testadas. Nenhum extrato de *A. tomentosum* testado apresentou atividade contra as espécies de *Candida*.

Segundo relatos da literatura, o extrato etanólico de *A. tomentosum* demonstrou atividade sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, e uso etnofarmacológico como anti-hiperlipêmico, sendo que a própria população cita o uso desta espécie com atenção, em função dos seus efeitos tóxicos (SILVA et al., 2010). Também foi relatada, a ação antiproliferativa sobre linhagens de células tumorais humanas (células mamárias e pulmonares), da fração terpênica do extrato diclorometano das partes aéreas de *A. tomentosum* (KOHN et al., 2006).

A fração alcaloídica (AP5.ALC) obtida do caule da espécie *A. pyrifolium* demonstrou atividade moderada para *S. aureus* e *B. subtilis* (CIM: 125 e 250 µg/mL, respectivamente) (Tabela 9), e atividade fraca contra *C. parapsilosis* (CIM: 500 µg/mL) e *C. tropicalis* (CIM: 500 µg/mL) (Tabela 6).

Entretanto, de acordo com a literatura os extratos etanólicos da casca do caule, do fruto e da raiz de *A. pyrifolium* apresentaram atividade inseticida contra larvas de *Plutella xylostella* com taxas de mortalidade de $51,7 \pm 11,6\%$ para o extrato da casca do caule, de $13,3 \pm 2,0\%$ para o extrato da raiz e $11,7 \pm 3,3\%$ para o extrato do fruto. Sub-frações obtidas do extrato etanólico da casca do caule apresentaram $100,0 \pm 0,0\%$ de mortalidade sobre as larvas *P. xylostella*, a atividade inseticida destas sub-frações foi relacionada com a presença dos alcaloides monoterpênicos indólicos: aspidofractina, 15-demotoxipirifolina e *N*-formilaspidofractina isolados de *A. pyrifolium* por Trindade et al. (2008).

Apesar dos resultados, apresentados na Tabela 5 e 6 sobre os micro-organismos não terem sido promissores, a investigação da atividade antibacteriana e antifúngica destas espécies de *Aspidosperma* podem ser investigadas novamente, após realização de nova coleta, e processamento de extratos, a fim de, averiguar possíveis diferenças na constituição química destes. Bem como, o fracionamento mais detalhado, para investigar se a atividade de alguma substância isoladamente possa ser maior que o extrato bruto ou a fração, frente a esses micro-organismos, usados neste estudo ou frente a outros fungos ou bactérias.

Devem-se considerar também os fatores relacionados aos micro-organismos, como por exemplo, a membrana externa das bactérias Gram negativas, sabe-se que esta representa uma barreira que impede a penetração de diversos antibióticos, e o espaço periplasmático contém enzimas que são capazes de degradar moléculas exógenas (TANAKA et al., 2006). Endo et al. (2012) relataram sobre a presença de biofilmes produzidos por *C. albicans* que podem levar à resistência destas leveduras a ação de agentes antifúngicos e de extratos de plantas.

Por isto, estudos relacionados à ação de plantas, sobre bactérias e fungos são continuamente foco de estudos, visando à obtenção de novas entidades químicas, seja na atividade desta e/ou mecanismo de ação, ou sinergismo com medicamentos padrão sobre os micro-organismos. Para suprir diversos mecanismos de resistência, desenvolvidos pelas bactérias e fungos aos antibióticos de referência.

5.2 - Avaliação da Atividade Antileishmania *in vitro* dos Extratos Brutos de *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium* Contra Formas Promastigotas de *L. amazonensis*, Efeito Citotóxico sobre Células LLCKM₂ e Índice de Seletividade.

Para avaliação da atividade antileishmania, foram selecionados os extratos brutos das três espécies de *Aspidosperma* descritas neste estudo. Sendo testadas também, as frações alcaloídicas do caule da *A. macrocarpon* e do caule da *A. pyriformium*.

Foi considerado para o índice de seletividade (IS) valores maiores que 1 (um), como representando maior seletividade para a atividade contra o protozoário e valores menores que 1 (um) como apresentando maior toxicidade sobre células de mamíferos, nas análises para as células LLCKM₂ e posteriormente, para os macrófagos J774-A1 (TIUMAN et al., 2005).

O extrato com o melhor IS foi selecionado para continuação dos estudos antileishmania e químico bioquímico.

O extrato bruto do fruto de *A. pyriformium* foi o extrato com a melhor atividade descrita neste estudo, com CI₅₀ de 18,52 ± 7,75 µg/mL, contudo, assim como o extrato da casca do caule de *A. tomentosum*, este apresentou um CC₅₀ (28,95 ± 4,50 µg/mL) muito próximo a CI₅₀, embora o valor do índice de seletividade tenha sido maior que um (IS: 1,56) (Tabela 7). Os demais extratos da espécie *A. pyriformium* apresentaram CI₅₀ acima de 250 µg/mL, sobre às promastigotas de *L. amazonensis* descritas neste estudo, inclusive a fração alcaloídica do caule (CI₅₀: 680,00 ± 113,14 µg/mL) (Tabela 7).

De acordo com dados da literatura, os extratos brutos do caule e da casca do caule de *A. pyriformium* foram inativos sobre o protozoário *P. falciparum* (BOURDY et al., 2004; DE PAULA; DOLABELA e OLIVEIRA, 2014). Entretanto, os alcaloides aspidoespermina e *N*-formil-aspidoespermidina presentes na *A. pyriformium* foram ativos sobre o *P. falciparum* (MITAINE-OFFER et al., 2002). Estes dados sugerem que o alcaloide isolado desta espécie é mais ativo, do que o fitocomplexo sobre este protozoário.

Tabela 7 - Avaliação da atividade antiproliferativa sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* dos extratos brutos e frações de *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium*.

Extrato Bruto e Frações/Partes Utilizadas	CI ₅₀ (µg/mL) Promastigotas	CC ₅₀ (µg/mL) LLCMK ₂	IS
<i>A. macrocarpon</i> - Folhas	100,25 ± 14,49	25,90 ± 4,37	0,26
<i>A. macrocarpon</i> - Caule	925,00 ± 106,1	NR	NR
<i>A. macrocarpon</i> - Caule - AM4F.O.1	153,70 ± 5,6	238,87 ± 10,30	1,55
<i>A. macrocarpon</i> - Caule - Fração alcaloídica	166,65 ± 7,28	325,40 ± 4,49	1,95
<i>A. macrocarpon</i> - Casca do Caule	151,5 ± 2,12	989,00 ± 67,18	6,52
<i>A. tomentosum</i> - Casca da raiz	160,70 ± 15,13	248,33 ± 47,52	1,54
<i>A. tomentosum</i> - Casca do caule	61,50 ± 2,12	48,85 ± 1,63	0,79
<i>A. tomentosum</i> - Caule	264,40 ± 26,73	302,50 ± 10,61	1,14
<i>A. tomentosum</i> - Raiz	256,80 ± 9,62	415,00 ± 7,07	1,62
<i>A. pyriformium</i> - Casca do caule	350,00 ± 53,03	NR	NR
<i>A. pyriformium</i> - Caule	553,55 ± 136,40	NR	NR
<i>A. pyriformium</i> - Caule - Fração alcaloídica	680,00 ± 113,14	NR	NR
<i>A. pyriformium</i> - Fruto	18,52 ± 7,75	28,95 ± 4,50	1,56
<i>A. pyriformium</i> - Flor	336,10 ± 19,66	NR	NR
<i>A. pyriformium</i> - Raiz	> 1000	NR	NR

Legenda: NR: não realizado; AM4F.O.1: precipitado orgânico obtido do processo de extração do extrato bruto do caule de *A. macrocarpon* para obtenção da fração alcaloídica (Fluxograma 2). **Fonte:** a autora, 2015.

Como descrito anteriormente neste estudo, Trindade et al. (2008) avaliaram a atividade inseticida de *A. pyriformium* sobre as larvas de *Plutella xylostella*. O extrato etanólico da casca do caule resultou em 51,7% de mortalidade sobre as larvas, quando comparado com o extrato do fruto e raiz. Entretanto, a fração alcaloídica da casca do caule de *A. pyriformium* que contém os alcaloides indólicos monoterpenos aspidofractina, 15-demotoxi-pirifolina e o *N*-formi-

aspidofractina (ARAÚJO JÚNIOR et al., 2007) apresentaram 100% de mortalidade sobre as larvas de *P. xylostella* (TRINDADE et al., 2008). Torres, Barros e Oliveira (2001) relataram que o extrato aquoso da casca do caule de *A. pyrifolium* também produziu 100% de mortalidade nas mesmas larvas.

O segundo extrato mais ativo sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* descrito neste estudo, foi o da casca do caule de *A. tomentosum*, com CI_{50} de $61,50 \pm 2,12 \mu\text{g/mL}$, contudo o IS foi menor que 1 (IS: 0,29), pois a CC_{50} ($48,85 \pm 1,63 \mu\text{g/mL}$) foi menor que a atividade deste extrato sobre o parasito. Outro extrato, com atividade interessante foi o da casca da raiz de *A. tomentosum* com CI_{50} de $160,70 \pm 15,13 \mu\text{g/mL}$ e IS de 1,54 (Tabela 7).

De acordo com Kohn et al. (2006), o extrato bruto diclorometano das partes aéreas de *A. tomentosum* apresentou atividade antiproliferativa citocida de 46% sobre as células tumorais da linhagem MCF7 (mama), em uma concentração dose-dependente.

Um levantamento etnobotânico avaliou o uso de espécies pela população como anti-hiperlipêmicas e anorexígena, a planta mais citada foi a *A. tomentosum*. Contudo, os entrevistados relataram que a planta deveria ser utilizada em pequenas quantidades por dia, devido aos efeitos tóxicos (SILVA et al., 2010).

Segundo Dolabela et al. (2012) o extrato etanólico da madeira, folhas e frutos de *A. tomentosum* apresentaram atividade sobre o protozoário *P. falciparum*, com CI_{50} de 26,5, 23,75 e 20,52 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Por fim, o extrato bruto da casca do caule de *A. macrocarpon* demonstrou ser um dos mais promissores, considerando a atividade frente ao parasito com CI_{50} de $151,5 \pm 2,12 \mu\text{g/mL}$ e o IS de 6,52 predizendo uma toxicidade relativa maior para o parasito, do que para a linhagem de células LLCKM₂ (CC_{50} : $989,00 \pm 67,18 \mu\text{g/mL}$). O extrato das folhas de *A. macrocarpon* apresentou CI_{50} de $100,25 \pm 14,49 \mu\text{g/mL}$, e CC_{50} de $25,90 \pm 4,37 \mu\text{g/mL}$, e o IS foi inferior a 1 (IS extrato folhas: 0,26) demonstrando maior toxicidade para a célula do que para o parasito.

Segundo Mesquita et al. (2005), o extrato bruto hexânico das folhas de *A. macrocarpon* avaliado contra amastigotas de *T. cruzi* apresentou CI_{50} de $59,2 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$. Em outro estudo, os autores avaliaram o extrato etanólico da casca da raiz de *A. macrocarpon* contra o *P. falciparum* que apresentou CI_{50} de 4,9 $\mu\text{g/mL}$, com IS de 16,2 avaliados sobre células pulmonares humanas (MESQUITA et al., 2007).

As frações foram obtidas pelo processo de isolamento de alcaloides do extrato bruto do caule de *A. macrocarpon* (AM4F.O.1 - CI_{50} : $153,70 \pm 53,60 \mu\text{g/mL}$; Fração alcaloídica - CI_{50} :

166,65 ± 7,28 µg/mL) demonstrando maior atividade sobre o parasito, do que o extrato bruto do caule de *A. macrocarpon* (CI₅₀: 925,00 ± 67,18 µg/mL) (Tabela 9). Apesar da CI₅₀ da fração alcaloídica ser menor do que o apresentado pelo extrato bruto, por se tratar de fração com a presença majoritária de alcaloides, esperava-se uma ação melhor sobre os parasitos.

Como o observado por Tanaka et al. (2007), para o extrato alcaloídico (DL₅₀ de 47 ± 1 µg/mL) da casca do caule de *A. ramiflorum* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, que foi menos ativo, do que os alcaloides isolados ramiflorina A (DL₅₀ de 16,3 ± 1,6 µg/mL) e ramiflorina B (DL₅₀: 4,9 ± 0,9 µg/mL).

Cunha et al. (2012), também evidenciaram a atividade antileishmania das frações alcaloídicas do caule e folhas de *A. ramiflorum* sobre promastigotas de *L. amazonensis*.

Grande parte do estudo biológico envolvendo espécies de *Aspidosperma* atribui as atividades biológicas aos alcaloides indólicos, muitos destes relataram a ação dos extratos, frações e alcaloides isolados sobre protozoários, como o *P. falciparum*. Entre, o relato de uso popular das *Aspidosperma* destacou-se o uso sobre problemas cutâneos e febris, e por isto há relatos e interesse contínuo no estudo das espécies vegetais deste gênero em *Leishmania* spp.

Com base na explanação dos dados da Tabela 7 descritos acima, foi selecionado para continuação dos estudos sobre a atividade antileishmania e químico bioguiado o extrato bruto da casca do caule de *A. macrocarpon*, por este apresentar o melhor IS, comparado com os demais extratos e frações testadas.

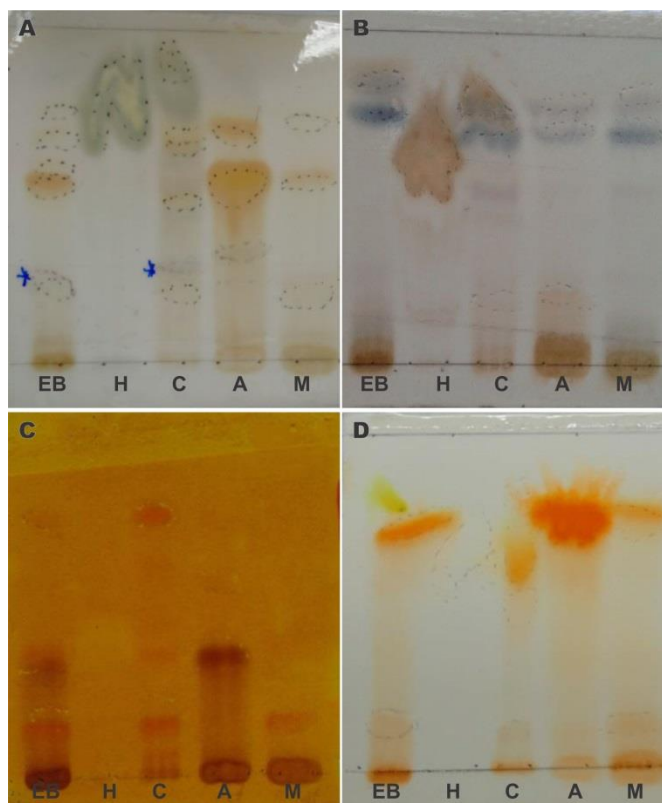
5.3 - Estudo Químico do Extrato Etanólico e Frações da Casca do Caule de *A. macrocarpon*

O extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* foi selecionado a partir do estudo microbiológico bioguiado (item 5.2), para realização do fracionamento. Foram obtidas como descrito anteriormente (item 4.1.7, Fluxograma 6), a fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol.

A CCD na Figura 14 revelada com o reagente de anisaldeído (imagem A) apresentou manchas que podem estar relacionadas aos princípios ativos como esteroides, óleos essenciais ou terpenos, saponinas agliconas e substâncias fenólicas (JORK et al., 1990; WAGNER; BLADT, 1996; WALL, 2005). Assim como, o reagente de vanilina sulfúrica (CCD B), este quando em contato com moléculas orgânicas na CCD originam manchas coloridas que podem

ser indicativas de alcaloides, substâncias fenólicas, óleos essenciais e esteroides (JORK et al., 1990; WAGNER; BLADT, 1996; WALL, 2005).

Figura 14 - Cromatografias em camada delgada (CCD) do extrato bruto etanólico (EB) e das frações: hexano (H), clorofórmio (C), acetato de etila (A) e metanol (M) obtido da casca do caule da *A. macrocarpon*.



Legenda: Fase móvel (FM) utilizada para as CCDs: Clorofórmio:Metanol (9:1), sendo a CCD A e C coeluídas duas vezes nesta FM, a CCD B uma vez e a CCD D 3 vezes. (A) Revelador de Anisaldeído, (B) Revelador Vanilina Sulfúrica, (C) Revelador de Dragendorff, (D) Revelador de Reagente NP-PEG. **Fonte:** a autora, 2015.

Estes reagentes são comumente utilizados em análise qualitativa de CCDs como reveladores, são considerados reagentes universais por revelarem diversos grupos de moléculas orgânicas, formando corantes do tipo trifenilmetano (JORK et al., 1990; WAGNER; BLADT, 1996; WALL, 2005).

A fim de identificar de maneira mais específica, determinado grupo de substâncias, utilizou-se o reagente de Dragendorff na CCD C da Figura 14, este reagente é utilizado para visualização de substâncias orgânicas nitrogenadas, como os alcaloides (JORK et al., 1990; CHAVES, 1997). Na CCD C foi possível verificar a presença de manchas alaranjadas em especial no extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon*, na fração clorofórmio e metanólica. A mancha marrom visualizada na CCD C, referente à fração

acetato de etila, já demonstrava esta coloração antes da revelação com o reagente de Dragendorff.

Outra CCD do extrato e das frações da casca do caule de *A. macrocarpon*, após, ser eluída foi revelada com o reagente de NP-PEG (Figura 14 – CCD D). Este reativo normalmente é utilizado para identificação de flavonoides, em particular na presença da quercetina, mirecetina e derivados 3- ou 7-*O*-glicosídeos, onde apresentam manchas de coloração de amarelo a alaranjado (ANDERSEN; MARKHAN, 2006). A CCD D (Figura 14) apresentou mancha de coloração alaranjada para o extrato bruto etanólico, para fração clorofórmio, fração metanol e para a fração acetato de etila, sendo negativo para fração hexânica.

5.3.1 - Prospecção Fitoquímica do Extrato Bruto e Frações da Casca do Caule de *A. macrocarpon*

Para os ensaios de prospecção fitoquímica foram utilizados o extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* e suas frações hexano (F.H), clorofórmio (F.CHCl₃), acetato de etila (F.A) e metanol (F. MeOH), a fim de caracterizar de forma qualitativa a presença dos grupos de metabólitos secundários, através de reações de precipitação e coloração características (metodologias descritas no Anexo A).

Na Tabela 8 estão descritos os resultados, que foram positivos para a presença de compostos fenólicos, taninos e flavonoides, tanto para o extrato bruto da casca do caule de *A. macrocarpon*, quanto para as frações F.CHCl₃, F.A e F.MeOH.

Os ensaios para determinação da presença de alcaloides foram positivos para o extrato bruto e para as frações F.CHCl₃ e F.MeOH. Enquanto, a presença de esteroides foi positiva para o extrato bruto e as frações F.H, F.CHCl₃ e F.MeOH (Tabela 8).

Os dados supracitados, sobre a presença qualitativa de esteroides no extrato bruto e frações da casca do caule de *A. macrocarpon*, coincidem com os relatos descritos na literatura para o caule de *A. macrocarpon*, da qual foi isolado a mistura de esteroides estigmasterol, sistosterol e campesterol (AQUINO, 2012).

Os resultados para presença de alcaloides na prospecção fitoquímica corrobora com o visualizado na CCD C da Figura 14, onde foi verificada a presença de manchas alaranjadas, após revelação com o reagente de Dragendorff, em especial para a fração F.CHCl₃ e F.MeOH.

Os alcaloides são considerados marcadores quimiotaxonômicos das espécies de *Aspidosperma*, como já descrito anteriormente neste estudo. De acordo com dados da

literatura foram isolados alcaloides indólicos da semente, da casca do caule e das folhas de *A. macrocarpon* (FERREIRA FILHO et al., 1966; MITAINE et al., 1996; BANNWART et al., 2013a).

Tabela 8 - Prospecção fitoquímica do extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon* e suas frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol).

Análise Qualitativa	EB-AM-cc	F.H.	F.CHCl ₃	F.A	F.MeOH
Fenóis e Taninos	P	N	P	P	P
Antocianinas e Antocianidinas	N	N	N	N	N
Leucoantocianidinas	N	N	N	N	N
Flavonas, Flavonois, Flavononas, Flavononois e Xantonas	P	N	P	P	P
Chalconas e Auronas	N	N	N	N	N
Catequinas	N	N	N	N	N
Alcaloides	P	N	P	N	P
Esteroides	P	P	P	P	N
Triterpenos	N	N	N	N	N
Saponinas	N	N	N	N	N
Antraquinonas, Antronas e Cumarinas	N	N	N	N	N

Legenda: P – positivo; N – negativo; **EB-AM-cc:** extrato bruto etanólico da casca do caule de *A. macrocarpon*; **F.H.:** fração hexano; **F.CHCl₃:** fração clorofórmio; **F.A.:** acetato de etila; **F.MeOH:** fração metanol. **Fonte:** a autora, 2015.

A presença de substâncias fenólicas como os metabólitos secundários da classe dos flavonoides foram positivos na análise qualitativa para o extrato bruto e frações CHCl₃, F.A e F.MeOH da casca do caule de *A. macrocarpon* (Tabela 8), assim como foram caracterizados de forma qualitativa na CCD D (Figura 14), depois da revelação com reagente de NP-PEG.

Os flavonoides também foram isolados de espécies de *Aspidosperma*, embora seja escasso o relato desta classe de substâncias na literatura para as espécies do gênero *Aspidosperma*. Como o descrito por BANNWART et al (2013a; 2013b) que isolaram pela primeira vez das folhas de *A. macrocarpon* o flavonoide quercetina 3-*O*- α -L-raminopiranosil (1'' \rightarrow 6'')- β -glucopiranosídeo (rutina).

5.3.2 - Fração Clorofórmica da Casca do Caule de *A. macrocarpon*

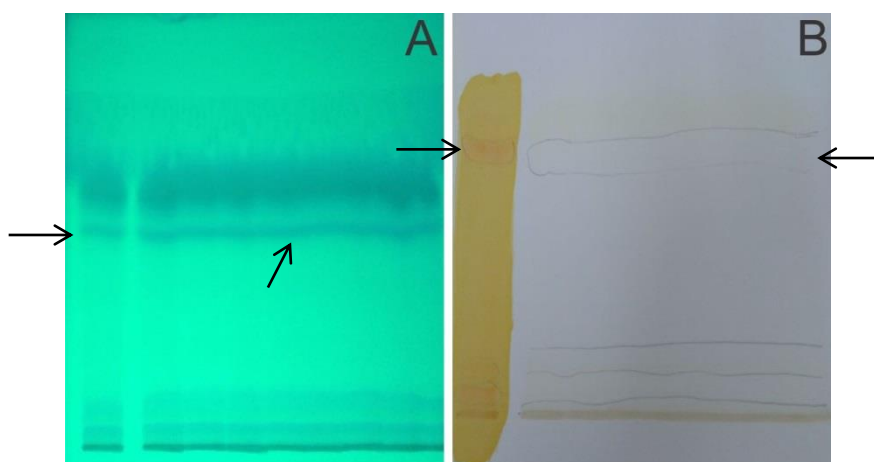
Com base nos resultados dos estudos bioguiados para atividade antileishmania descritos posteriormente (item 5.4), a fração clorofórmica obtida da casca do caule de *A. macrocarpon*, foi selecionada e fracionada para busca das substâncias ativas (Fluxograma 7).

5.3.3 - Isolamento da F.153-172 obtida da Fração Clorofórmica da Casca do Caule de *A. macrocarpon*

As frações F.153-157, F.158-160, F.161-162, F.163-172, após revelação da CCD com reagente de Dragendorff (Fluxograma 7), apresentaram manchas alaranjadas, sugerindo a presença de substâncias alcaloídicas. Então, estas frações foram reunidas e originaram a fração codificada de F.153-172 com rendimento de 14,43% (288,6 mg), quando comparada com a quantidade da fração F.CHCl₃ utilizada no fracionamento. A fração F.153-157 e a F.163-172 foram submetidas ao ensaio antileishmania (item 5.4).

A fração F.153-172 foi submetida ao fracionamento por CCDP, e apresentou uma mancha única em linha, indicada com as setas na Figura 15, sugestiva de alcaloide devido à presença da coloração alaranjada, após revelação com reagente de Dragendorff. Após separação, esta foi encaminhada para análises de RMN de ¹H e ¹³C. A amostra foi codificada com a mesma sigla da fração de origem: F.153-172.

Figura 15 - Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) da subfração F.153-172 isolada da fração F.CHCl₃ da casca do caule de *A. macrocarpon*.



Legenda: Fase móvel utilizada para a CCD: Clorofórmio:Acetato de Etila:Metanol (1:4:1). (A) Luz ultravioleta - 254 nm, (B) faixa alaranjada - Revelador de Dragendorff, faixa branca, separadas por linhas cinzas - local onde foi raspada a sílica para recuperação da amostra. Flechas pretas indicam a faixa sugestiva do alcaloide de interesse. **Fonte:** a autora, 2015.

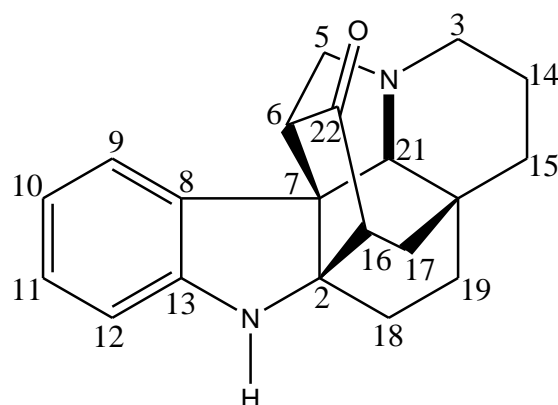
5.3.3.1 - Caracterização Química da Amostra F.153-172 Isolada da Fração Clorofórmio da Casca do Caule de *A. macrocarpon*

A amostra F.153-172 é solúvel em clorofórmio, apresenta aspecto amorfo e coloração amarelo/castanho, foi isolada da subfração F.153-172 obtida da fração F.CHCl₃ da casca do caule de *A. macrocarpon*, e apresentou rendimento de 0,1% (62,3 mg), em relação a porção do extrato bruto da casca do caule de *A. macrocarpon* fracionada (70 g). A F.153-172 foi submetida à análise de RMN de ¹H e ¹³C.

Os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de ¹H e ¹³C da F.153-172 foram comparados com os descritos na literatura para o alcaloide de núcleo indólico do tipo copsano, denominado de copsanona (Tabelas 9 e 10 e Figuras 16, 17 e 18) (MAGNUS et al., 1984; BANNWART, 2012).

No espectro de ¹H foram observados sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios metínicos do anel aromático pertencente ao núcleo indólico, os δ_H foram em 7,30 (ddd; $J = 0,6; 1,4; 7,3; 1H$); referente ao H9, δ_H em 6,79 (td; $J = 1,0; 7,4 1H$) do H10; δ_H em 7,06 (td; $J = 1,3; 7,7; 1H$) para o H11 e δ_H em 6,67 (dt; $J = 0,7; 7,8; 1H$) para o H12. Outros sinais de hidrogênios metínicos foram observados com δ em 2,57 (ddd; $J = 1,9; 4,9; 10,6; 1H$); 2,69 (dt; $J = 1,4; 10,9; 1H$) e 3,38 (d; $J = 2,1; 1H$), referentes aos hidrogênios 6, 16 e 21, estes encontram-se mais desblindados que os demais hidrogênios, pela posição α ao nitrogênio e ao carbono da carbonila na cadeia cíclica alquílica (Tabelas 9). Além destes, também foram observados os hidrogênios metilênicos H5 (dd; $J = 4,9; 9,6; 1H$), H5' 3,51 (t; $J = 9,9; 1H$) e H3 3,03 (m; 2H) próximos ao nitrogênio 4 (Tabela 9 e Figuras 16, 17 e 18).

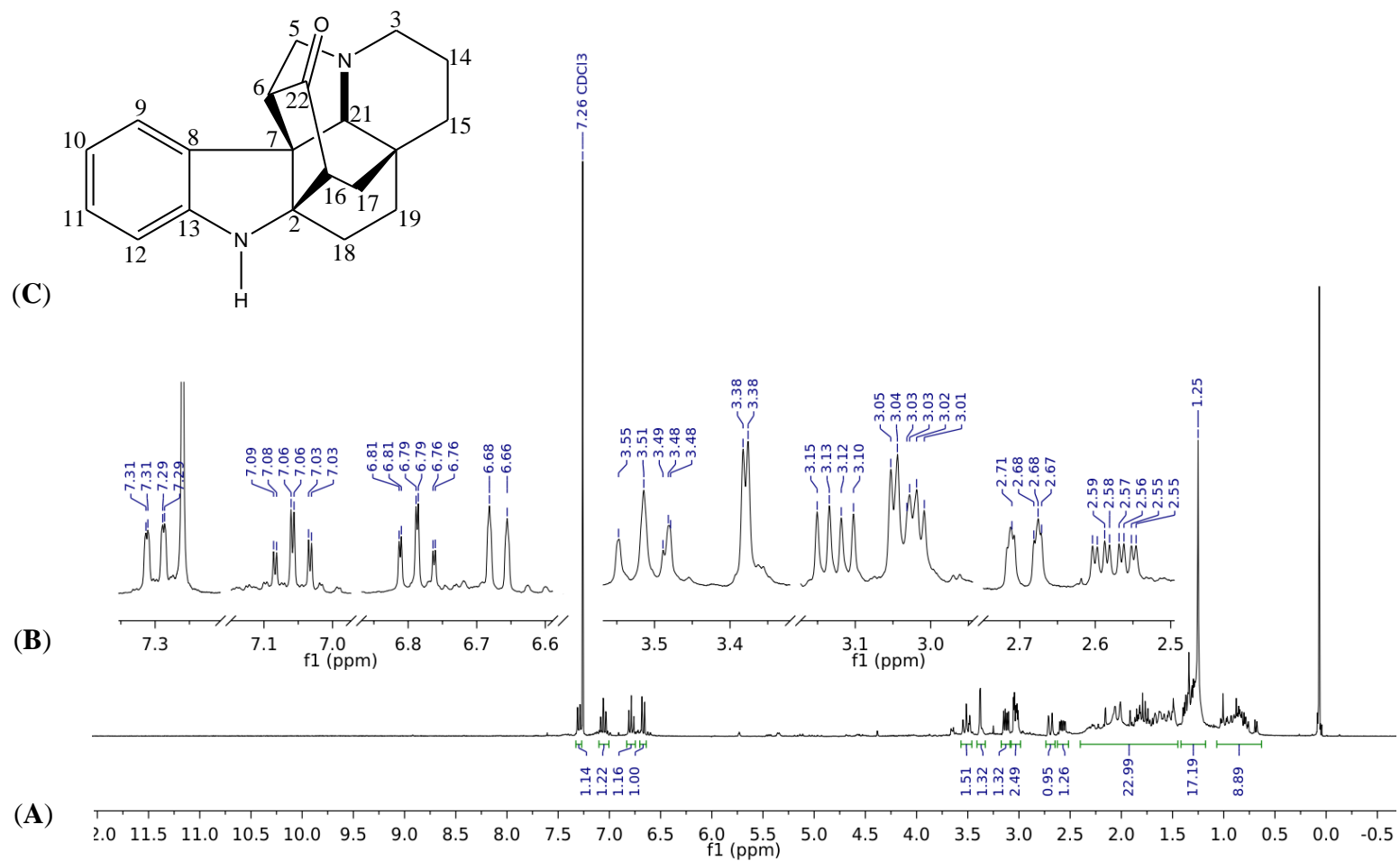
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H (300 MHz, Clorofórmio-*d*) para a fração F.153-172, comparados com valores descritos na literatura para copsanona, demonstrada abaixo.



Hidrogênio	F.153-172 δ_{H}^*	Copsanona ¹ δ_{H}^* (CD ₃ OD)
3	3,03 (m; 2H)	3,02 (m)
5	3,13 (dd; $J = 4,9; 9,6$; 1H)	3,14 (dd; $J = 5,1; 9,9$)
5'	3,51 (t; $J = 9,9$; 1H)	3,45 (t; $J = 9,9$)
6	2,57 (ddd; $J = 1,9; 4,9; 10,6$; 1H)	2,42 (ddd; $J = 1,8; 5,1; 9,9$)
9	7,30 (ddd; $J = 0,6; 1,4; 7,3$; 1H)	7,34 (dd; $J = 1,2; 7,5$)
10	6,79 (td; $J = 1,0; 7,4$ 1H)	6,70 (td; $J = 0,9; 7,5$)
11	7,06 (td; $J = 1,3; 7,7$; 1H)	6,99 (td; $J = 1,2; 7,5$)
12	6,67 (dt; $J = 0,7; 7,8$; 1H)	6,63 (d; $J = 7,5$)
14	–	1,27 – 1,36 (m)
14'	–	1,83 – 1,92 (m)
15	–	1,31 – 1,40 (m)
15'	–	1,50 (dt; $J = 3,0; 13,5$)
16	2,69 (dt; $J = 1,4; 10,9$; 1H)	2,65 (dt; $J = 1,2; 10,8$)
17	–	1,63 – 1,74 (m)
17'	2,04 (d; $J = 15,4$; 1H)	2,02 (dd; $J = 3,0; 15,0$)
18	–	1,66 – 1,89 (m)
19	–	1,29 – 1,35 (m)
21	3,38 (d; $J = 2,1$; 1H)	3,37 (d; $J = 1,8$)
	1,96 – 1,30 (m)	–

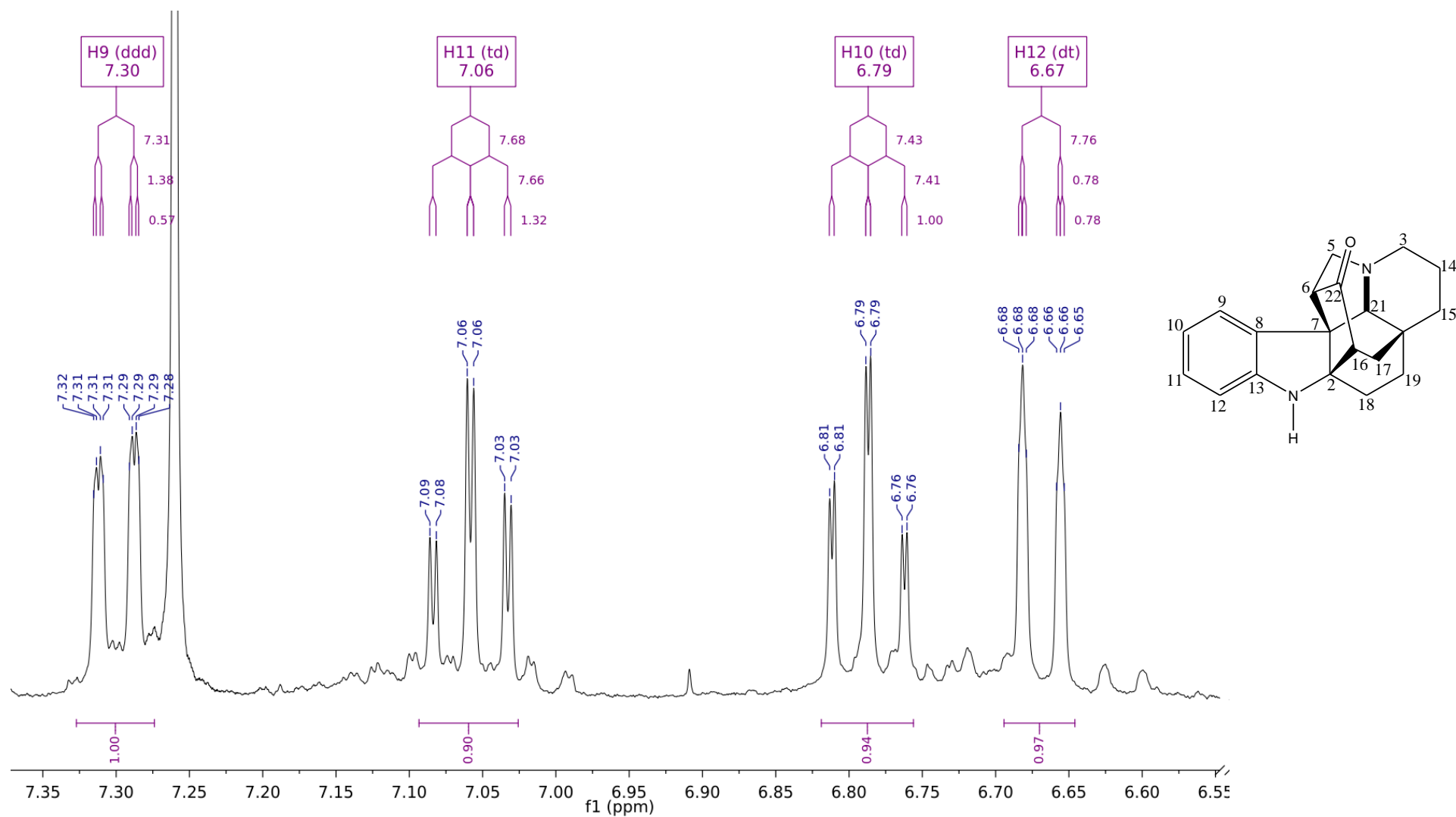
*Deslocamentos químicos em ppm (δ_{H}) com referência ao sinal residual do clorofórmio-*d* e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz. ¹Bannwart (2012). **Fonte:** a autora, 2015.

Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H da fração F.153-172 (300 MHz, Clorofórmio- d) (A) espectro total, (B) expansões e (C) copsanona.



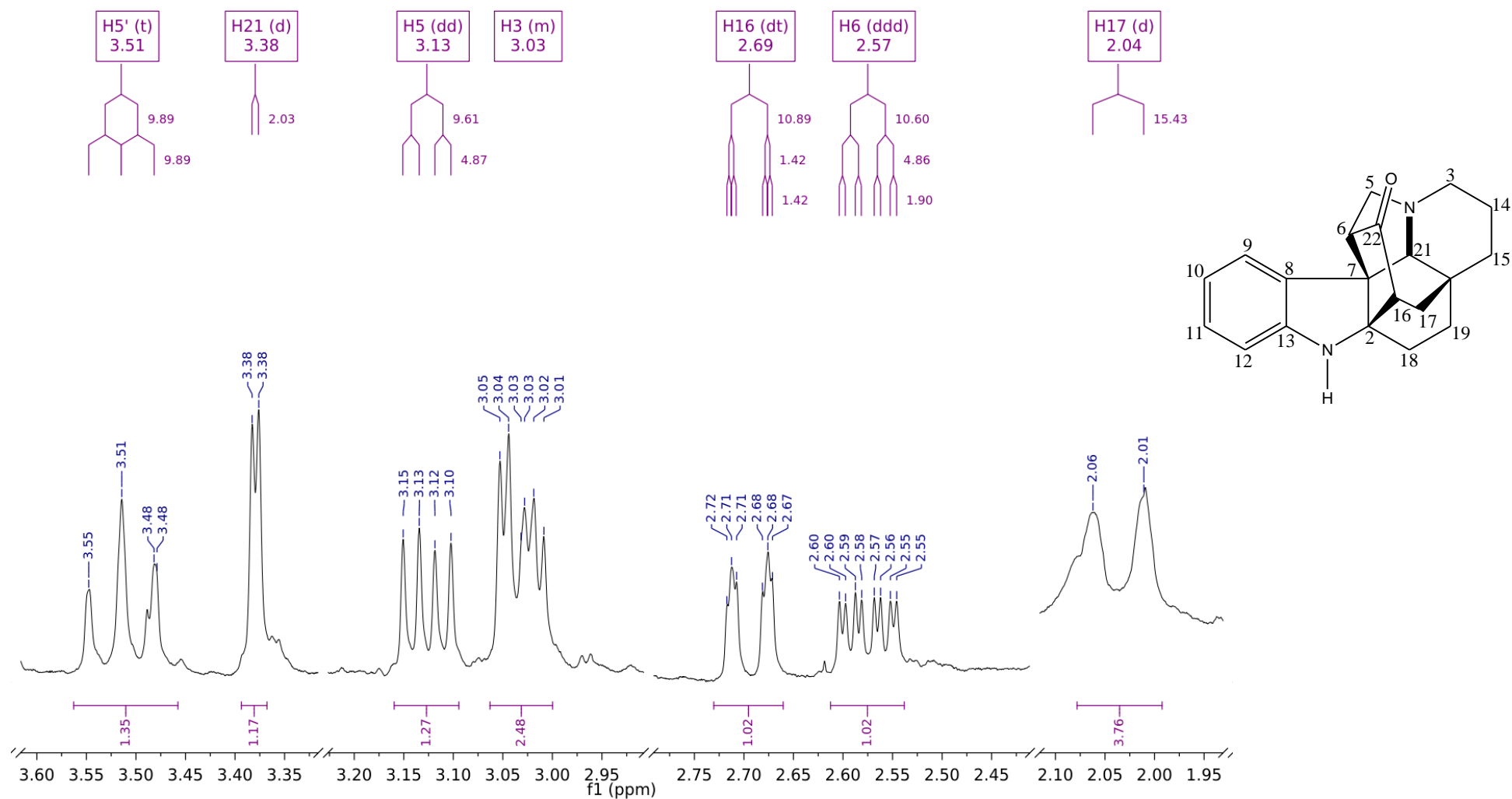
Fonte: a autora, 2015.

Figura 17 - Expansões do espectro de RMN de ^1H da fração F.153-172 (300 MHz, Clorofórmio-*d*) e estrutura química da copsanona.



Fonte: a autora, 2015.

Figura 18 - Expansões do espectro de RMN de ^1H da fração F.153-172 (300 MHz, Clorofórmio-*d*) e estrutura química da copsanona.



Fonte: a autora, 2015.

Os demais sinais de deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios metilênicos alifáticos (H14, H14', H15, H15', H17, H17', H18 e H19) não foram discriminados para a F.153-172, pois a região que estes foram descritos na literatura é também uma região típica de hidrogênios metilênicos (δ entre 1,2 e 1,8) de cadeia alquílica de hidrocarbonetos de graxa, que podem estar presentes na F.153-172 sobrepondo os sinais (Tabela 9 e Figuras 16, 17 e 18) (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Os sinais de hidrogênios com δ entre 1,96 e 1,30 (Tabela 9) representa a região supracitada e também foi descrita para a copsanona por Magnus et al. (1984) que relatou a presença de deslocamentos químicos referentes a 9 hidrogênios na região entre 1,90 e 1,20 ppm (m).

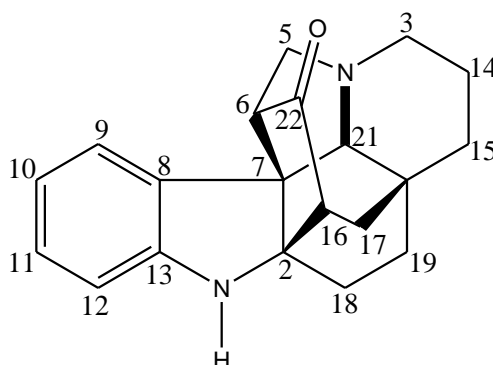
Os espectros de ^{13}C e DEPT 135 e 90 da F.153-172 (Tabelas 10 e Figuras 19 e 20) evidenciaram sinais relacionados aos carbonos aromáticos com δ de 123,1 (C9), 119,8 (C10), 127,9 (C11), 111,1 (C12) e os sinais dos carbonos aromáticos quaternário com δ em 133,8 (C8) e 150,9 (C13). Em δ de 218,3 foi verificado a presença do carbono da carbonila (C22).

Os carbonos metilênicos em posição α ao nitrogênio da cadeia cíclica alquílica apresentaram δ em 46,8 (C3), 54,4 (C5) e 70,5 (C21) mais desblindados quando comparados aos demais carbonos metilênicos da cadeia cíclica alquílica (C14, C15, C17, C18, C19 e C20) (Tabela 10 e Figuras 19 e 20). Os carbonos metínicos em posição α ao carbono da carbonila apresentaram deslocamentos químicos em 57,5 (C6) e 52,5 (C16) ppm, e o hidrogênio metínico C2 com δ de 69,7 devido a posição α ao nitrogênio da anel indólico (Tabela 10). Os sinais dos carbonos visualizados no DEPT 135 e 90 (Figura 20) auxiliaram nas atribuições da posição dos carbonos.

Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C apresentados para a F.153-172 (Tabelas 9 e 10) foram compatíveis com os relatados da literatura para a copsanona (MAGNUS et al., 1984; BANNWART, 2012). Pode-se sugerir que a F.153-172 é constituída majoritariamente pela substância (\pm) copsanona.

O alcaloide copsanona já foi descrito na literatura para a espécie *A. macrocarpon*, sendo isolado das cascas do caule e das folhas desta espécie (FERREIRA FILHO et al., 1966; PEREIRA et al., 2007; BANNWART, 2012). Além da copsanona foram isolados outros alcaloides indólicos com núcleo copsano da *A. macrocarpon* como a copsanona-*N*-óxido, copsanol, copsanol-*N*-óxido, 18-epicosanol, lactamaepicosanol, copsinina. Entre outros alcaloides, como a vicadiformina e a ervinceina (MITAINE et al., 1996; FERREIRA FILHO et al., 1966; PEREIRA et al., 2007; BANNWART, 2012).

Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C e DEPT 135 e 90 da fração F.153-172 (75 MHz, clorofórmio-*d*), comparados com valores de deslocamentos químicos descritos na literatura para copsanona, demonstrada abaixo.

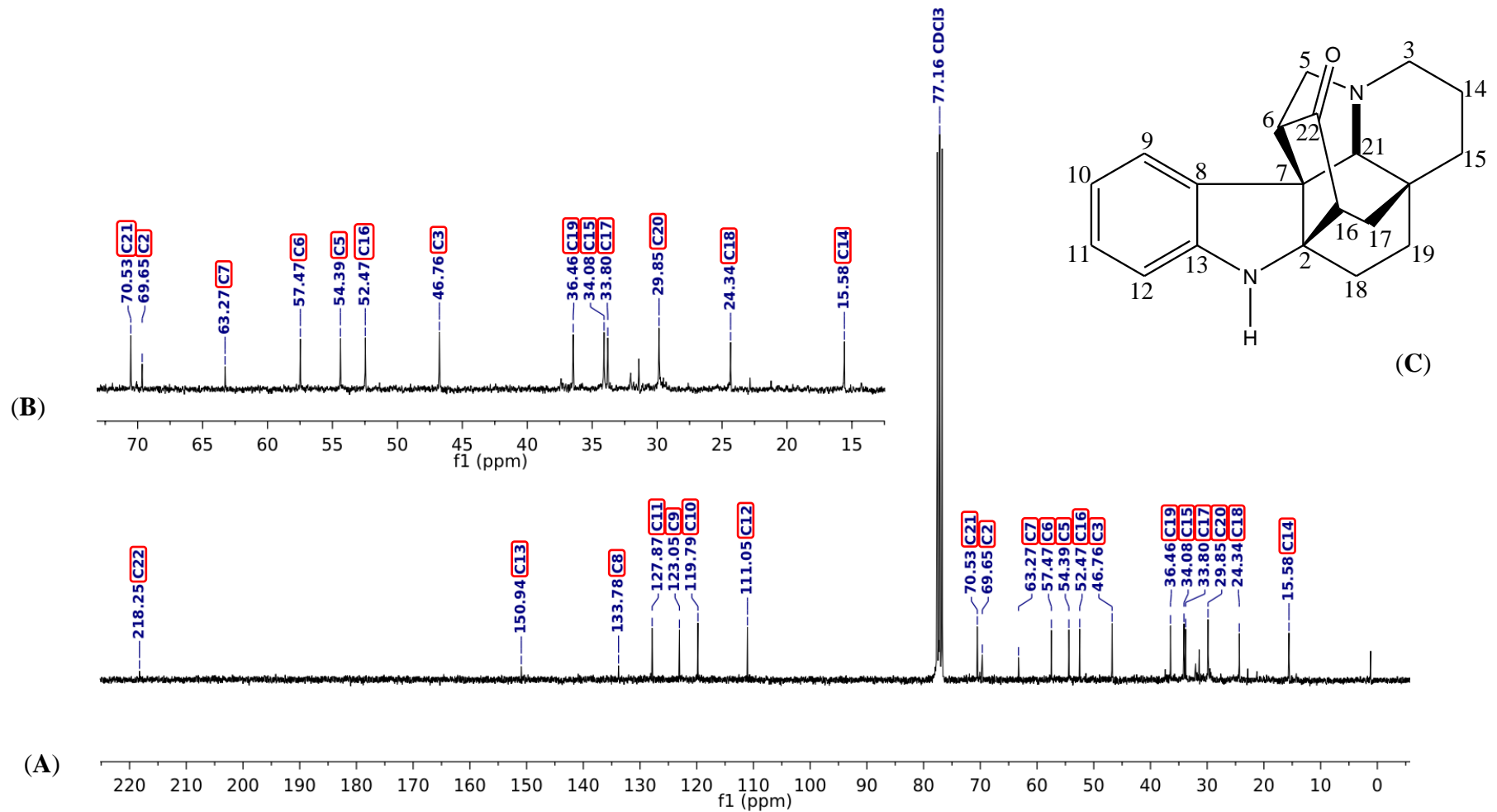


Carbono	F.153-172 δ_{C}^*	Copsanona ¹ $\delta_{\text{C}}^*(\text{CD}_3\text{OD})$
2	69,7	70,5
3	46,8	47,6
5	54,4	55,0
6	57,5	58,7
7	63,3	64,6
8	133,8	134,8
9	123,1	123,8
10	119,8	120,2
11	127,9	128,9
12	111,1	111,8
13	150,9	153,0
14	15,6	16,2
15	34,1	34,7
16	52,5	53,5
17	33,8	34,4
18	24,3	24,2
19	36,5	37,4
20	29,9	32,1
21	70,5	71,6
22	218,3	220,2

*Deslocamentos químicos em ppm (δ_{H}) com referência ao sinal residual do clorofórmio-*d*.

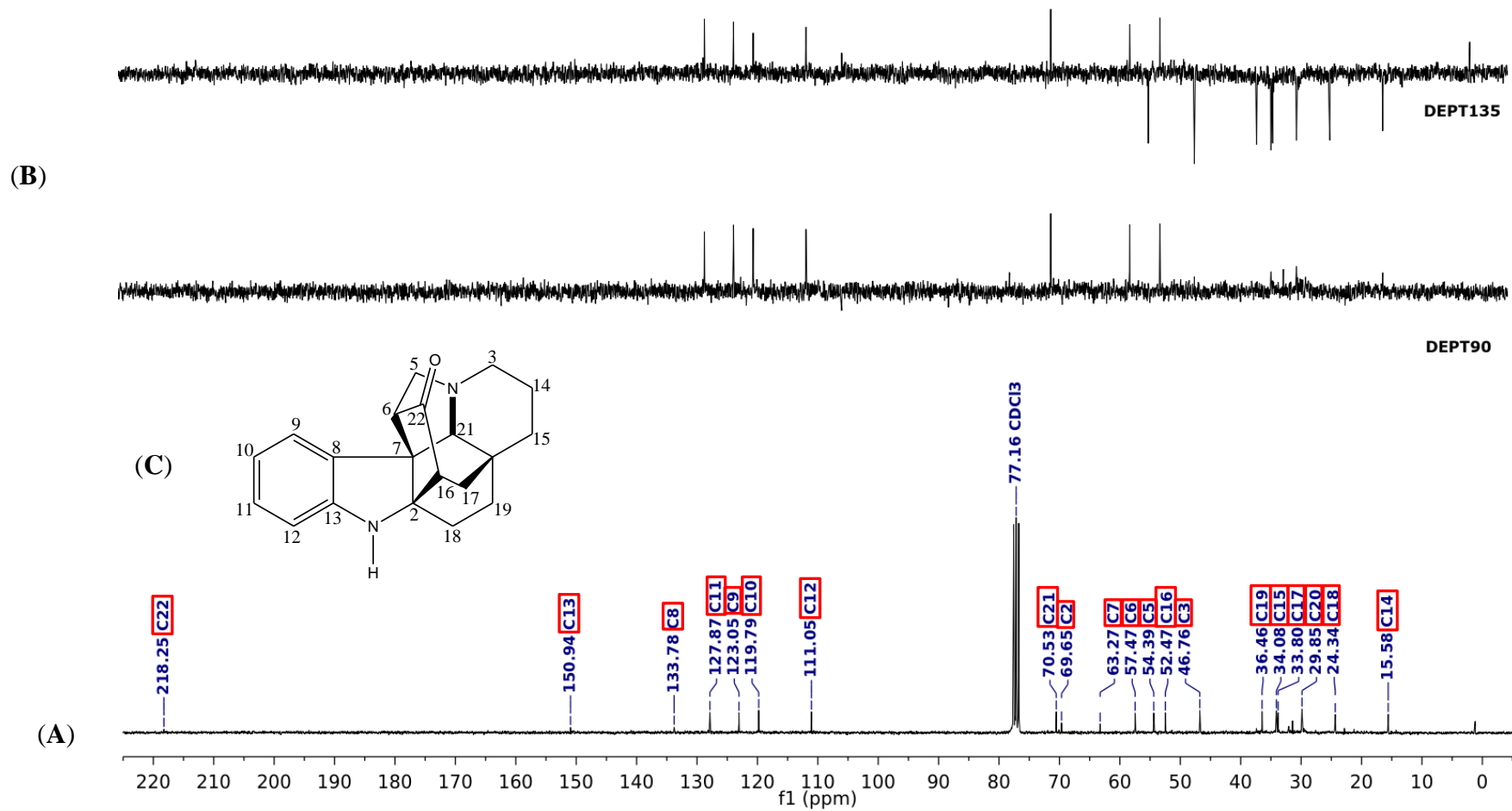
¹Bannwart (2012). **Fonte:** a autora, 2015.

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração F.153-172 (75 MHz, Clorofórmio-*d*), (A) espectro total (B) expansões, (C) copsanona.



Fonte: a autora, 2015.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C (A) e DEPT 135 e 90 (B) da fração F.153-172 (75 MHz, Clorofórmio-*d*), (C) copsanona.



Fonte: a autora, 2015.

5.4 - Avaliação da Atividade sobre Formas Promastigotas e Amastigotas Axênica de *L. amazonensis*, Efeito Citotóxico em Macrófagos J774-A1 e Índice de Seletividade do Extrato Bruto, Frações e Substâncias Isoladas da Casca do Caule de *A. macrocarpon*.

As frações hexano (F.H), clorofórmio (F.CHCl₃), acetato de etila (F.A) e metanólica (F.MeOH) obtidas do extrato bruto da casca do caule de *A. macrocarpon* (Fluxograma 6) foram avaliadas nos ensaios antiproliferativos sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

As frações mais ativas sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram à fração F.CHCl₃ e a F.A, com CI₅₀ de 29 µg/mL para ambas. A F.MeOH apresentou CI₅₀ de 173,5 µg/mL, enquanto, que a F.H foi inativa nas concentrações utilizadas neste estudo (CI₅₀ > 1000) (Tabela 11).

De acordo com o demonstrado no Fluxograma 7, das 38 frações isoladas da F.CHCl₃ algumas delas apresentaram positividade na presença do reagente de Dragendorff, indicando a possibilidade de ser substância alcaloídica. As frações foram selecionadas com base nas diferenças que demonstraram na CCD, para a avaliação da atividade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* nas concentrações de 100, 50 e 10 µg/mL, e se necessário foram utilizadas concentração menores. Este ensaio bioguiado foi realizado a fim de encontrar uma ou mais substâncias ativas presentes nas frações.

Contudo, nos resultados apresentados para as substâncias positivas ao reagente de Dragendorff (Fluxograma 7) selecionadas (F-153-157; F-163-172; F-310-315; F-316-320; F-321-325; F-326-328) para o ensaio antiproliferativo sobre promastigotas de *L. amazonensis* não apresentaram atividade significativa, quando comparadas a CI₅₀ de 29 µg/mL da F.CHCl₃, da qual foram isoladas (Tabela 11).

A copsanona (item 5.3.3.1) (CI₅₀: 31,77 ± 1,85 µg/mL) não demonstrou atividade significativa sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, quando comparado à atividade da fração de origem (Tabela 11). Quando avaliada frente à forma amastigota axênica de *L. amazonensis* a copsanona apresentou CI₅₀ de 94,24 ± 6,87 µg/mL, e sobre os macrófagos J774-A1 demonstrou CC₅₀ de 393,63 ± 3,39 µg/mL (IS de 12,39 para formas promastigotas, e um IS de 4,18 para amastigotas), caracterizando maior seletividade para o parasito do que para as células (Tabela 11).

Tabela 11 - Atividade antiproliferativa do extrato bruto, frações e substância isolada sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, ação citotóxica sobre macrófagos J774-A1 e IS.

Amostras	Macrófago J774-A1	Promastigotas	IS	Amastigotas Axênicas	IS
	CC ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ /CI ₅₀	CI ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ /CI ₅₀
EB-AM-cc	570,0 ± 5,56	151,5 ± 2,12	3,76	78,00 ± 8,48	7,31
F.H	NR	> 1000	NR	NR	NR
F.CHCl ₃	40 ± 1,5	29,00 ± 1,65	1,40	88,78 ± 5,93	0,50
F.A	63,37 ± 0,62	29,50 ± 0,95	2,15	23,80 ± 0,28	2,66
F.MeOH	NR	173,5 ± 3,23	NR	90,95 ± 5,72	NR
F-03	NR	> 100	NR	NR	NR
F-12-21	NR	> 100	NR	NR	NR
F-25-29	NR	> 100	NR	NR	NR
F-45-47	NR	> 100	NR	NR	NR
F-59-62	NR	> 100	NR	NR	NR
F-63	NR	91,31 ± 3,23	NR	NR	NR
F-82-87	NR	30,40 ± 1,25	NR	NR	NR
F-105-106	NR	> 100	NR	NR	NR
F-111-112	NR	> 100	NR	NR	NR
F-111 ptdo branco	NR	> 100	NR	NR	NR
F-128-132	NR	25,88 ± 2,22	NR	NR	NR
F-148-152	NR	34,25 ± 1,66	NR	NR	NR
F-153-157	NR	40,66 ± 1,98	NR	NR	NR
F-163-172	NR	105,75 ± 2,74	NR	NR	NR
F-163 ptdo branco	NR	> 100	NR	NR	NR
F-193-202	NR	57,37 ± 0,23	NR	NR	NR
F-203-222	98,07 ± 0,72	2,31 ± 0,08	42,45	4,32 ± 0,95	22,70
F- 223-232	NR	69,70 ± 3,17	NR	NR	NR
F-233-248	NR	> 100	NR	NR	NR
F-250-255	NR	> 100	NR	NR	NR

Continua

continuação Tabela 11

F-256-260	NR	88,52 ± 6,24	NR	NR	NR
F-261-268	NR	49,45 ± 2,57	NR	NR	NR
F-269-272	NR	63,92 ± 4,32	NR	NR	NR
F-281-300	NR	95,53 ± 5,73	NR	NR	NR
F-305-306	NR	113,04 ± 6,97	NR	NR	NR
F-307-309	NR	64,16 ± 2,53	NR	NR	NR
F-310-315	NR	98,28 ± 3,39	NR	NR	NR
F-316-320	NR	89,74 ± 7,40	NR	NR	NR
F-321-325	NR	> 100	NR	NR	NR
F-326-328	NR	51,59 ± 2,06	NR	NR	NR
F-331-335	NR	62,16 ± 4,28	NR	NR	NR
F-336-337	NR	54,38 ± 2,43	NR	NR	NR
F-346-349	NR	71,55 ± 8,79	NR	NR	NR
F-361-365	NR	99,70 ± 4,44	NR	NR	NR
F-371-375	NR	65,88 ± 7,98	NR	NR	NR
F-376-385	NR	58,42 ± 7,21	NR	NR	NR
F-406-410	NR	> 100	NR	NR	NR
F-421-426	NR	> 100	NR	NR	NR
Copsanona	393,63 ± 3,39	31,77 ± 1,85	12,39	94,24 ± 6,87	4,18
Anfotericina B	3,17 ± 0,74	0,1 ± 0,01	31,70	NR	NR

Légenda: Anfotericina B: controle positivo; **EB-AM-cc:** extrato bruto da casca do caule de *A. macrocarpon*; **F.H:** fração hexano; **F.CHCl₃:** fração clorofórmio; **F.A:** fração acetato de etila; **F.MeOH:** fração metanólica. **F-** são frações obtidas do fracionamento da F.CHCl₃ (Fluxograma 7). **NR:** não realizado. **Fonte:** a autora, 2015.

Embora, os IS para a copsanona, neste estudo foi maior que 1, a atividade desta não foi promissora. Bannwart et al. (2013b) testou este alcaloide para a atividade antiproliferativa em células de linhagens tumorais humanas, e apresentou a citotoxicidade da copsanona isolada do extrato metanólico das folhas de *A. macrocarpon*, com CI₅₀ de 8,7 µg/mL sobre células leucêmicas.

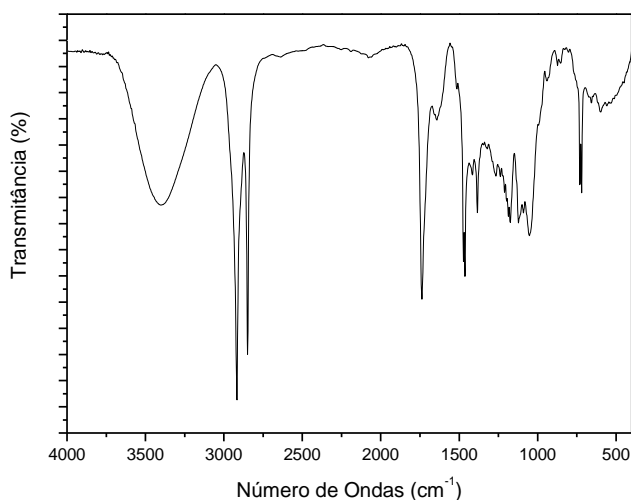
Kam et al. (1999) descreveram a atividade antileishmania dos alcaloides da *Kopsia griffithii*. Das folhas desta espécie foram extraídos os alcaloides indólicos copsamina, copsamina-*N*-(4)-óxido, copsinina, e da casca do caule foi isolado a copsinina *N*(4)-óxido. Para os alcaloides com núcleos indólicos tipo copsano, não foi verificado nenhuma atividade sobre as promastigotas de *L. donovani*.

5.5 - Caracterização Química da Fração F.203-222 Isolada da fração Clorofórmica (CHCl₃) da Casca do Caule de *A. macrocarpon*

A fração F.203-222, um sólido amorfo, de coloração amarelo/castanho (51 mg), foi selecionada para identificação dos constituintes químicos, por apresentar a melhor atividade contra as formas evolutivas de *L. amazonensis* (item 5.4) quando comparada com as outras frações testadas, e IS alto (Tabela 11). Devido ao baixo rendimento, a fração F.203-222 não foi submetida a um fracionamento, mas encaminhada para análises espectrais de IV e RMN.

A fração F.203-222 foi submetida à análise espectroscópica na região do infravermelho (IV) (Figura 21). O espectro no IV apresentou uma banda larga em 3360 cm⁻¹ característica de O–H em ligação de hidrogênio inter- ou intramolecular. O estiramento forte em 1746 cm⁻¹ sugere a presença da função éster. Ésteres alifáticos simples possuem uma banda muito forte do grupo C=O, que aparece entre 1750 e 1735 cm⁻¹, característico de deformação axial. Hidrogênios metilênicos (–CH₂–) originam duas bandas de estiramento C–H, são deformações axiais modo simétrico e outro assimétrico. O momento dipolar do modo assimétrico é maior, gerando uma banda de intensidade maior (2926 cm⁻¹) enquanto, que o modo simétrico tem menor intensidade (2853 cm⁻¹). Estiramentos bem intensos foram visualizados para F.203-222 em 2912 e 2862 cm⁻¹ (Figura 21) (LOPES; FASCIO, 2004; PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012; SAMMAIAH; PADMAJA; PRASAD, 2014).

Figura 21 - Espectro na região do infravermelho da fração F.203-222.



Fonte: a autora, 2015.

De acordo com Hernández-Galícia et al. (2007), uma mistura constituída por 1-monoacilglicerois isolada da raiz da espécie vegetal *Ibervillea sonora* apresentou bandas de absorção no IV em 3412, 2921, 2850, 1725, 1462, 1365, 1220, 1179 e 720 cm^{-1} . Assim como as visualizadas para a F.203-222, na região do IV (Figura 21).

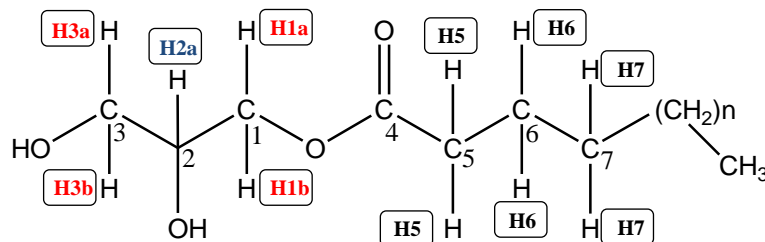
Segundo dados da literatura para ésteres alquílicos é comum ocorrer absorção intensa entre 1210 e 1163 cm^{-1} referente à deformação axial de C–O e bandas em 1465 e 720 cm^{-1} correlacionadas às vibrações de CH_2 . Enquanto, na região de 1372 cm^{-1} observa-se vibração simétrica de CH_3 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012; SAMMAIAH; PADMAJA; PRASAD, 2014).

A interpretação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Clorofórmio-*d*/Metanol-*d*₄) (Tabela 12; Figuras 22 e 23) da fração F.203-222 apresentou dois duplos dupletos em δ_{H1a} 4,10 (dd, $J=11,4$ e 4,8) e δ_{H1b} 4,06 (dd, $J=11,3$ e 6,1) e outros duplos dupletos em δ_{H3a} 3,58 (dd, $J=11,4$ e 4,5) e δ_{H3b} 3,53 (m). Estes conjuntos de duplos dupletos, de acordo com dados descritos na literatura, são característicos de ésteres de glicerol, especificamente do tipo 1-monoacilglicerois (KHARCHAFI et al., 2006; HERNÁNDEZ-GALICIA et al., 2007). Em função do carbono 2 (C2) do glicerol apresentar um centro esterogênico, cada hidrogênio metilênico vizinho a este apresentará um sinal diferente no espectro, ou seja, como não há elementos de simetria, os hidrogênios do grupo metileno são diastereotópicos (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012). O sinal do hidrogênio ligado ao carbono 2 (C2) do glicerol apresentou δ_{H2a} de 3,82 ppm (m).

Segundo Knothe e Kenar (2004) hidrogênios ligados a carbono acílico ($-\text{CH}_2-\text{CO}_2-$) apresentam δ entre 2,0 e 2,1 e hidrogênios de grupos metilas terminais possuem δ entre 0,8 e 0,9. Enquanto, que os hidrogênios metilênicos (CH_2) de cadeia alquílica saturada têm δ entre 1,2 e 1,4.

Estes dados corroboram com os visualizados na Tabela 12 e Figuras 22 e 23, para os deslocamentos de hidrogênios da F.203-222, onde se observou um δ em 2,31 (t, $J=7,5$) referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono α a carbonila. Deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos posicionados em β e γ à carbonila apresentaram δ em 1,58 (m) e δ 1,50 (m), os demais sinais de hidrogênios metilênicos apresentaram um singlete largo (sl) em δ 1,22.

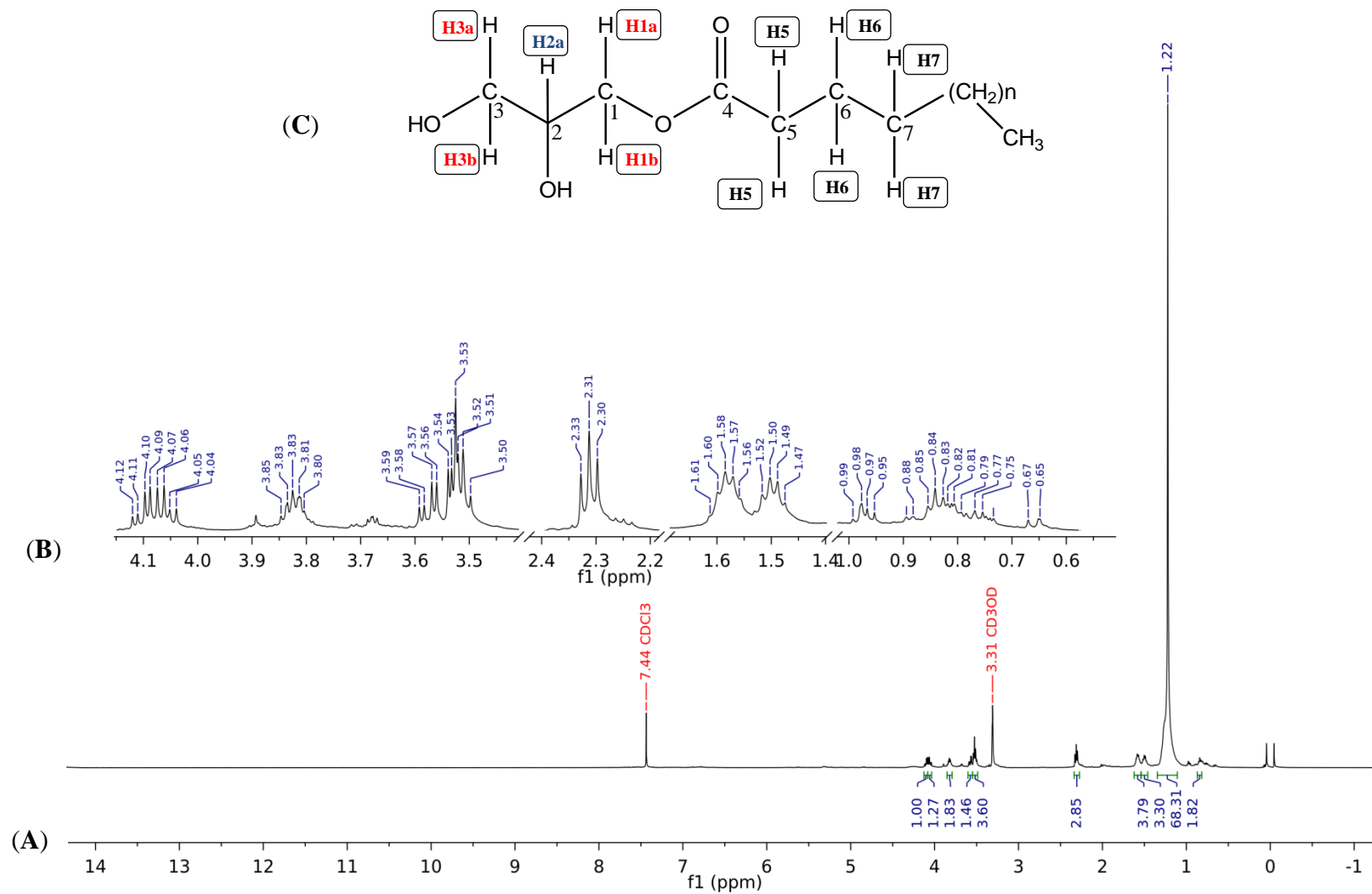
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio- d /Metanol- d_4), comparados com valores de deslocamento químico descritos na literatura para a estrutura 2,3-dihidroxipropil alcanoato (1-monoacilglicerol), demonstrada abaixo (com exceção da substância 4).



H	F.203-222 δ_{H}^*	Mistura de 1- monoacilgliceróis δ_{H}^*	Substância 1 δ_{H}^*	Substância 2 δ_{H}^*	Substância 3 δ_{H}^*	Substância 4 δ_{H}^*
H1a , OCH ₂	4,10 (dd, $J=11,4$ e 4,8)	4,19 (dd, $J=11,4$ e 4,9)	4,19 (m)	4,18 (dd, $J=11,6$ e 5,3)	4,15 (m)	4,13 (m – 4H, CH ₂ O)
H1b , OCH ₂	4,06 (dd, $J=11,3$ e 6,1)	4,14 (dd, $J=11,5$ e 6)	–	4,13 (dd, $J=11,6$ e 5,8)	–	4,01 (m- 2H, CHOH)
H2a , CH	3,82 (m)	3,93 (m)	3,93 (m)	3,92 (m)	3,91(m)	–
H3a , OCH ₂	3,58 (dd, $J=11,4$ e 4,5)	3,70 (dd, $J=11,5$ e 4)	3,69 (dd, $J=12$ e 6)	3,69 (dd, $J=11,5$ e 6,4)	3,58 (dd, $J=12$ e 6)	3,58 (m, 4H, CH ₂ O)
H3b , OCH ₂	3,53 (m)	3,59 (dd, $J=11,5$ e 6)	3,60 (dd, $J=9$ e 6)	3,58 (dd, $J=11,5$ e 6)	–	–
H5 , CH ₂ –CO ₂	2,31 (t, $J=7,5$)	2,33 ($J=7,5$)	2,36 (t, $J=7,5$)	2,34 (t; $J=7,5$)	2,35 (t, $J= 7,5$)	2,34 (t, $J=7,5$, 4H, CH ₂)
CH ₂	–	–	–	–	–	1,72 (m)
H6 , CH ₂	1,58 (m)	–	1,62 (m)	1,62 (m)	1,60 (m)	1,62 (m)
H7 , CH ₂	1,50 (m)	–	–	–	–	–
(CH ₂) _n	1,22 (sl)	1,25 (sl)	1,26 (m – 28H)	1,26 (m – 16H)	1,26 (m – 20H)	1,25 (m – 52H)
CH ₃ (terminal)	0,84 (t, $J=6,9$)	0,88 (t, $J=7,2$)	0,87 (t)	0,88 (t, $J=6,5$)	0,88 (t, $J=6,5$)	0,88 (t, $J= 6,6$)
OH	–	–	2,61 (s)	3,13 (s)	2,88 (s)	2,99 (s)

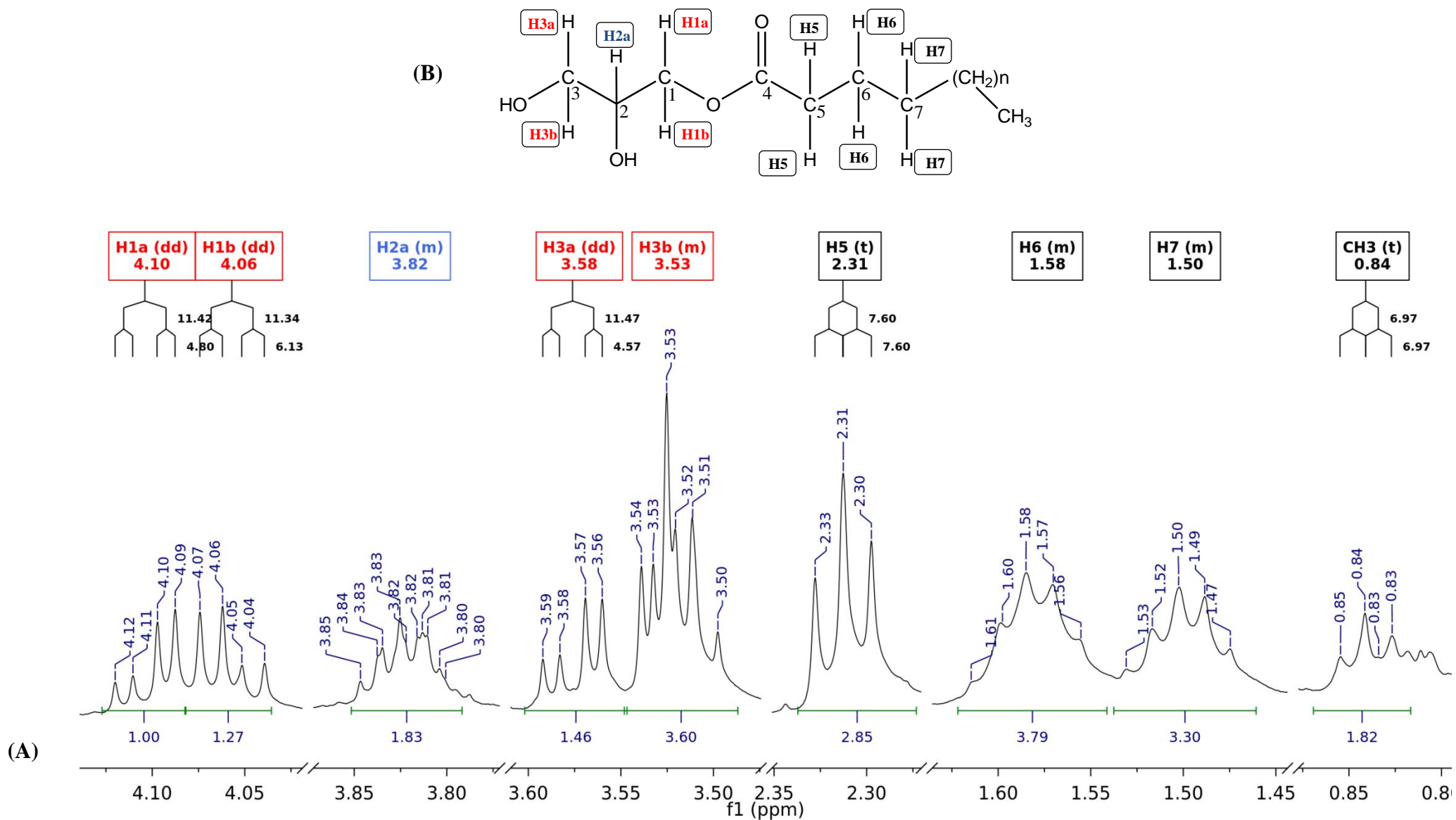
*Deslocamentos químicos em ppm (δ_{H}) com referência ao sinal residual do metanol- d_4 e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz. **Mistura de 1-monoacilgliceróis** (HERNÁNDEZ-GALICIA et al., 2007); **Substância 1**: 1-monooctadecanoil-rac-glicerol; **Substância 2**: 1-monododecanoil-rac-glicerol; **Substância 3**: 1-monotetradecanoil-rac-glicerol; **Substância 4**: 1,7-dioctadecanoil-rac-diglicerol (KHARCHAFI et al., 2006). **Fonte**: a autora, 2015.

Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio- d /Metanol- d_4) (A) espectro total, (B) expansões e (C) estrutura do 2,3-dihidroxi-propil alcanato.



Fonte: a autora, 2015.

Figura 23 - Expansões do espectro de RMN de ^1H da fração F.203-222 (A) (500 MHz, Clorofórmio-*d*/Metanol-*d*₄) e estrutura do 2,3-dihidroxipropil alcanoato (B).



Fonte: a autora, 2015.

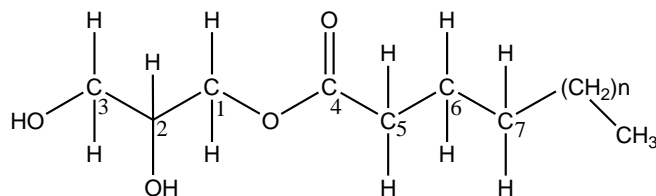
Os hidrogênios das hidroxilas, presentes no C2 e C3 do glicerol, não foram visualizados no espectro, provavelmente em função da utilização do metanol- d_4 com δ 3,31 e do clorofórmio- d com δ 7,44. Em condições usuais, a exposição ao ar, à luz e vapor de água, que podem estar presentes nestes solventes deuterados, e então, catalisar a troca rápida do hidrogênio da hidroxila com o deutério (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

O espectro de RMN de ^{13}C para a F.203-222 apresentou sinais de deslocamentos químicos em 65,5 (C1), 70,24 (C2) e 63,4 (C3) ppm (Tabela 13), referentes aos carbonos do glicerol, de acordo com os dados descritos na literatura para 1-monoacilglicerois assimétricos (GUNSTONE, 1994; KHARCHAFI et al., 2006; HERNÁNDEZ-GALICIA et al., 2007).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou ainda δ de 174,9 característico do carbono da carbonila, pertencente à função éster, além de sinal com δ de 34,4 referente ao carbono metilênico α à carbonila, nomeado de carbono 5 da cadeia alquílica e outros dois sinais de carbonos metilênicos da cadeia alquílica, designados de C6 com $\delta = 32,8$ e C7 com $\delta = 32,2$, referentes às posições β e γ à carbonila, respectivamente. Demais carbonos metilênicos da cadeia alquílica apresentaram δ entre 29,46 e 22,98. O carbono da metila terminal apresentou δ de 14,2 (Tabela 13 e Figura 24). Os sinais de carbonos metínicos, metilênicos e metílicos foram confirmados pelo DEPT 135 (Figura 24).

Em resumo, os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da fração F.203-222 (Tabelas 12 e 13, Figuras 22, 23 e 24) que propõe a presença dos ésteres de glicerol do tipo 1-monoacilglicerois, foram um sinal de δ em 174,98 (C=O) no espectro de RMN de ^{13}C , sugerindo a presença do grupamento éster. Em adição, os sinais dos hidrogênios da porção glicerol, duplos dupletos em δ_{H1a} 4,10; δ_{H1b} 4,06; δ_{H3a} 3,58 e δ_{H3b} 3,53. E os sinais de carbonos com δ em 65,58 (C1), 70,24 (C2) e 63,48 (C3) que são característicos do esqueleto dos 1-monoacilglicerois. Enquanto, os sinais de hidrogênios metilênicos da cadeia alquílica com δ entre 1,58 e 1,22 e dos hidrogênios metilênicos α à carbonila ($\text{CH}_2\text{-CO}_2$) com δ em 2,35. Assim como, o sinal da metila terminal com δ em 0,84, juntamente com os sinais de carbono metilênicos com δ entre 22,9 e 34,4 confirmam a presença da cadeia alquílica saturada destes 1-monoacilglicerois na F.203-222 (KHARCHAFI et al., 2006; HERNÁNDEZ-GALICIA et al., 2007; PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012; SAMMAIAH; PADMAJA; PRASAD, 2014).

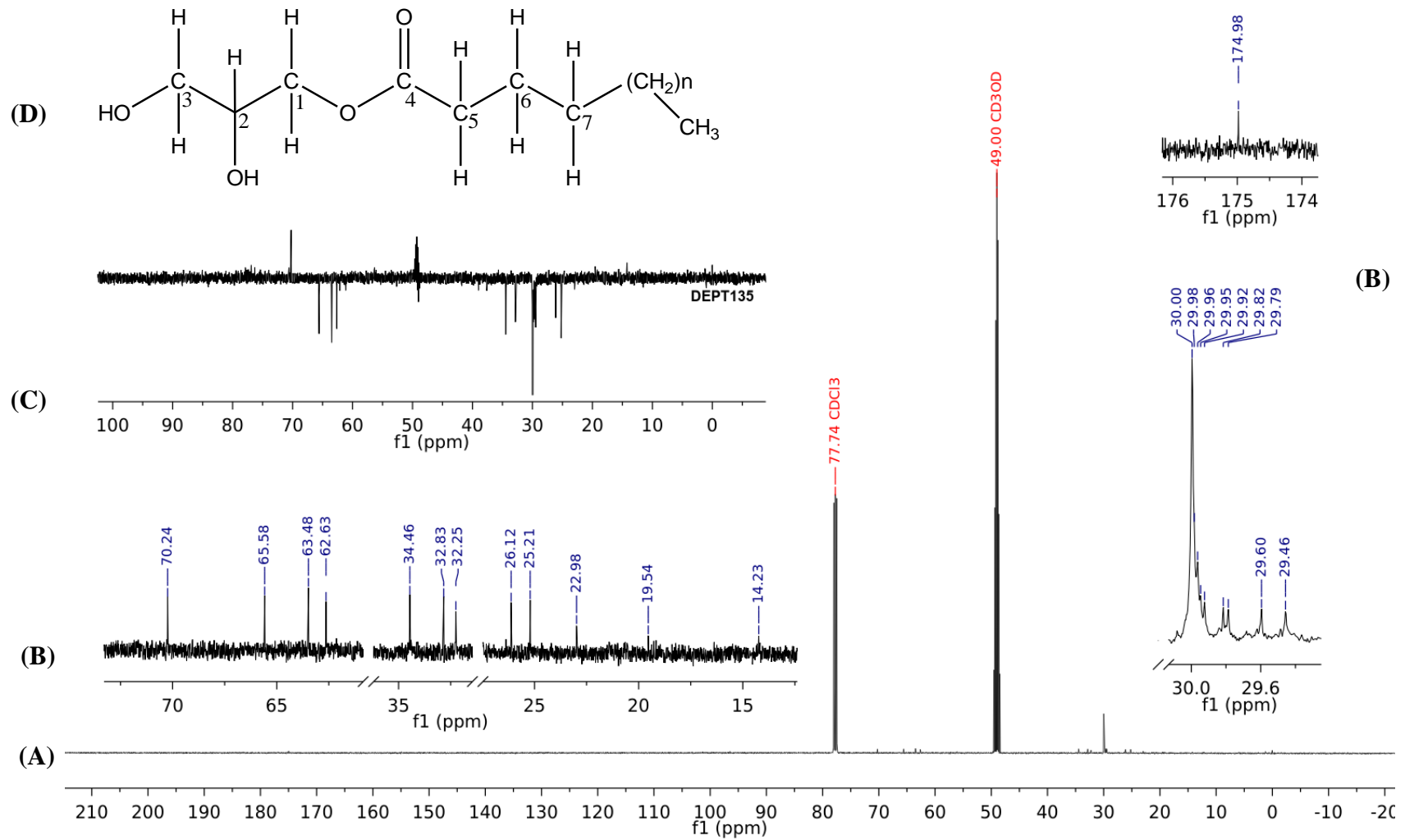
Tabela 13 - Dados de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da fração F.203-222 (125 MHz, Clorofórmio- d /Metanol- d_4), comparados com valores de deslocamentos químicos descritos na literatura para a estrutura 2,3-dihidroxipropil alcanoato (1-monoacilglicerol), demonstrada abaixo (com exceção da substância 4).



Carbono	F.203-222 δ_{C}^*	Mistura de 1-monoglicerois δ_{C}^*	Substância 1 δ_{H}^*	Substância 2 δ_{H}^*	Substância 3 δ_{H}^*	Substância 4 δ_{H}^*
$\text{CH}_2\text{-O}$, (C-1)	65,58	65,10	65,20	65,10	65,10	72,50 ($\text{CH}_2\text{-O}$, C1)
CH-OH , (C2)	70,24	70,20	70,30	70,30	70,30	68,90 (CH-OH , C2)
$\text{CH}_2\text{-OH}$, (C3)	63,48	63,30	63,40	63,40	63,40	65,20 ($\text{CH}_2\text{-O}$, C3)
CH_2	62,63	–	–	–	–	–
CH_2	–	–	–	–	–	40,90
$\text{CH}_2\text{-CO}_2$, (C5)	34,46	34,10	34,20	34,20	34,20	34,20
CH_2 , (C6)	32,83	–	–	–	–	–
CH_2 , (C7)	32,25	31,80	31,90	31,90	31,90	31,90
$(\text{CH}_2)_n^{**}$	29,46 – 30,00	29,60	29,1-29,7 (12 CH_2)	29,2-29,6 (6 CH_2)	29,1-29,7 (8 CH_2)	29,1-29,7 (11 CH_2)
CH_2^{**}	26,12	–	–	–	–	–
CH_2^{**}	25,21	24,80	24,90	24,90	24,90	24,90
CH_2^{**}	22,98	22,60	22,70	22,70	22,70	22,70
CH_3	19,54	–	–	–	–	–
CH_3 , terminal	14,23	14,10	14,10	14,10	14,10	14,10
C=O (C4)	174,98	175,30	174,40	174,40	174,40	174,00

*Deslocamentos químicos em ppm (δ_{C}) com referência ao sinal residual do metanol- d_4 . **Mistura de 1-monoglicerois** (HERNÁNDEZ-GALICIA et al., 2007). **Substância 1**: 1-monooctadecanoil-rac-glicerol; **Substância 2**: 1-monododecanoil-rac-glicerol; **Substância 3**: 1-monotetradecanoil-rac-glicerol; **Substância 4**: 1,7-dioctadecanoil-rac-diglicerol (KHARCHAFI et al., 2006). **Carbono metileno da cadeia alquílica. **Fonte**: a autora, 2015.

Figura 24 - Espectro total de RMN de ^{13}C (A), expansões (B) e DEPT 135 (C) da fração F.203-222 (125 MHz, Clorofórmio-*d*/Metanol-*d*₄) correlacionado com a 2,3-dihidropropil alcanato (D).



Fonte: a autora, 2015.

Segundo Hernández-Galicia et al. (2007) foram estabelecidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) a presença de 11 ésteres graxos de glicerol, na mistura de 1-monoacilglicerois (Tabelas 12 e 13) isolada da raiz da espécie vegetal *Ibervillea sonora*, entre as substâncias foram identificados: o 1-monopalmitino, 1-monomargarato, 1-monoestearina, 1-monononadecilato de glicerol, 1-monoaraquidato, 1-monobehenato de glicerol, 1-monotricosanato de glicerol, 1-monotetracosanato de glicerol, 1-monopentacosanato de glicerol, 1-monohexacosanato de glicerol e 1-monooctacosanato de glicerol. Todas as substâncias identificadas pelos autores apresentam estruturas químicas com cadeia de carbonos saturados.

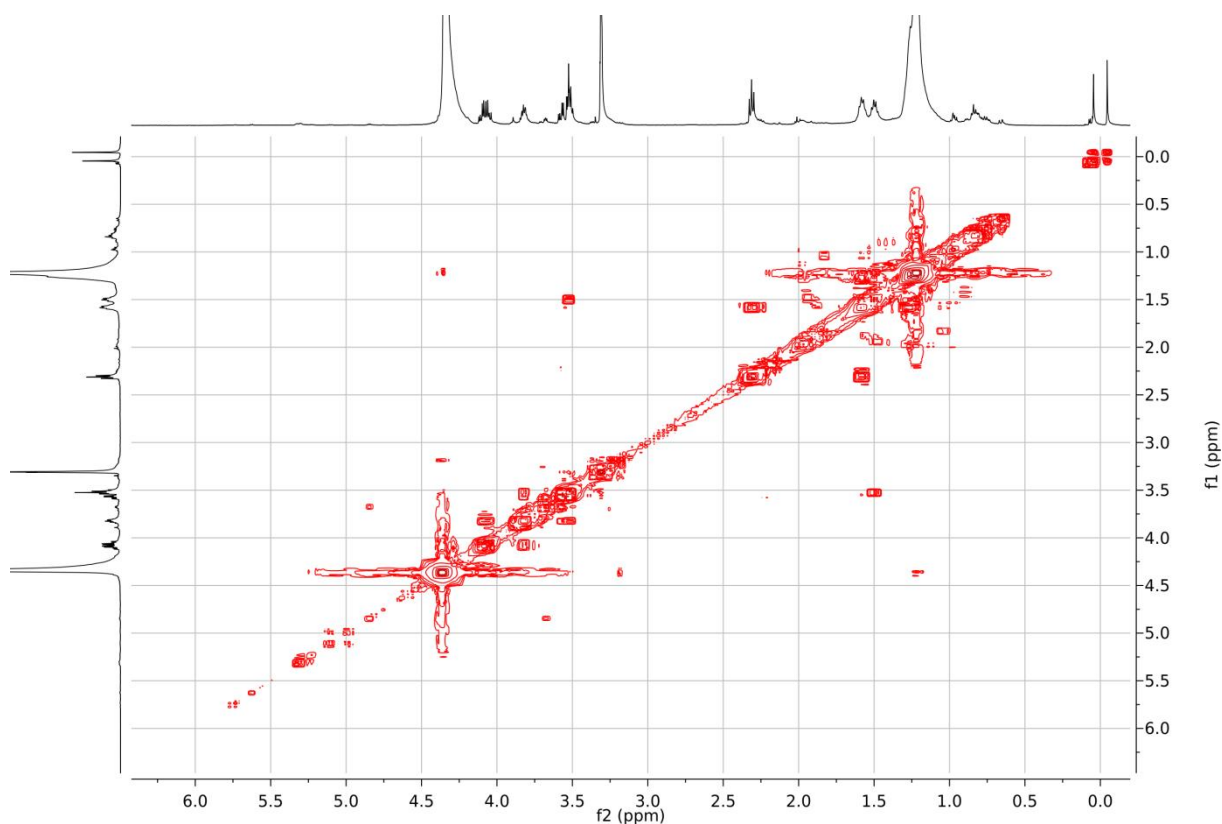
A substância 4 (1,7-dioctadecanoil-rac-diglicerol) (Tabelas 12 e 13) é um éster de glicerol do tipo diacildiglicerol, foi utilizada para comparação com os sinais de ^1H e ^{13}C da F.203-222, pois os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbono são semelhantes. Porém, diacildiglicerois tem padrão de constantes de acoplamento diferenciadas para os hidrogênios da cadeia do glicerol, os diacildiglicerois não apresentam o conjunto de duplos dupletos visualizados para os hidrogênios metilênicos (H1 e H3) vizinhos ao carbono quiral (C2) do glicerol em 1-monoacilglicerois, como observados nas Tabelas 12 e 13, para as substâncias 1, 2 e 3.

Os espectros bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC, foram úteis para confirmação da presença dos 1-monoacilglicerois na fração F.203-222, pelas correlações homo ($^1\text{H}-^1\text{H}$) e heteronucleares ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$).

O mapa de contornos COSY (Figura 25) contribuiu para as atribuições das posições dos hidrogênios na estrutura química da F.203-222, correspondente ao 1-monoacilglicerol (2,3-dihidroxipropil alcanoato), como se pode observar as correlações dos hidrogênios metilênicos da cadeia alquílica, além da correlação dos hidrogênios metilênicos α à carbonila (CH_2-CO_2) entre si, e com os hidrogênios metilênicos do carbono 6 da cadeia alquílica.

Outras correlações observadas no mapa de contornos COSY (Figura 25) que contribuíram para as atribuições dos hidrogênios da molécula do 1-monoacilglicerol foi a correlação entre os hidrogênios metilênicos presentes nos carbonos 1 e 3, onde cada hidrogênio (H1a, H1b, H3a, H3b) correlaciona de forma diferente com o hidrogênio do carbono metínico (C2) do glicerol.

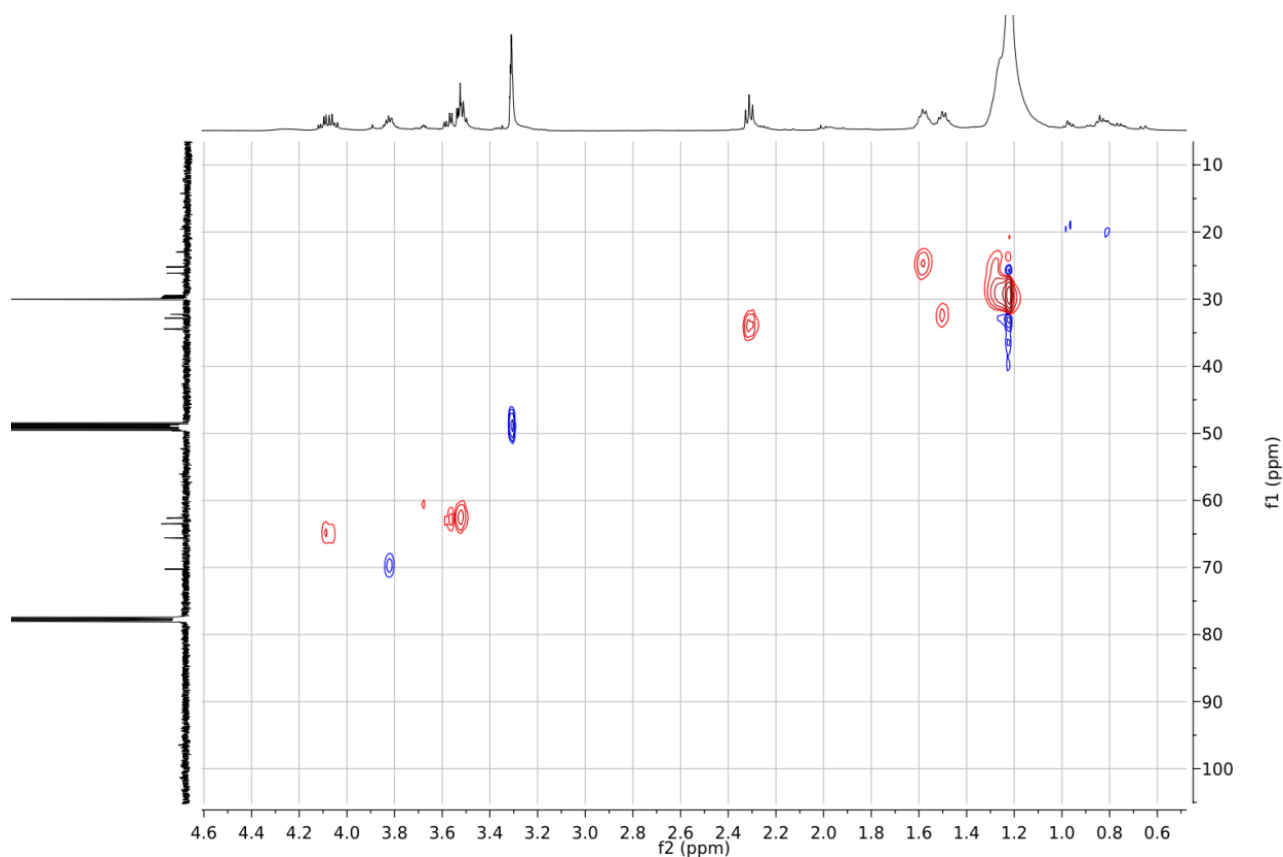
Figura 25 - Mapa de contornos COSY para a fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio-*d*/Metanol-*d*₄).



Fonte: a autora, 2015.

O mapa de contorno HSQC (Figura 26) também contribuiu para as atribuições das posições dos átomos na estrutura química da F.203-222, como a correlação observada entre o carbono metínico (C2) com δ em 70,2 e o hidrogênio com δ em 3,82. Assim como, a correlação dos carbonos metilênicos de C1 e C3 com δ 65,5 e 63,4, respectivamente, com os seus respectivos hidrogênios com δ em 4,10 (H1a), 4,06 (H1b), 3,82 (H2a), 3,58 (H3a) e 3,53 (H3b). Sendo que, todos estes sinais correlacionados acima são característicos da estrutura química do 1-monoacilglicerol (2,3-dihidroxipropil alcanato) proposta para as substâncias da F.203-222.

Figura 26 - Mapa de contornos HSQC da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio-*d*/Metanol-*d*₄).

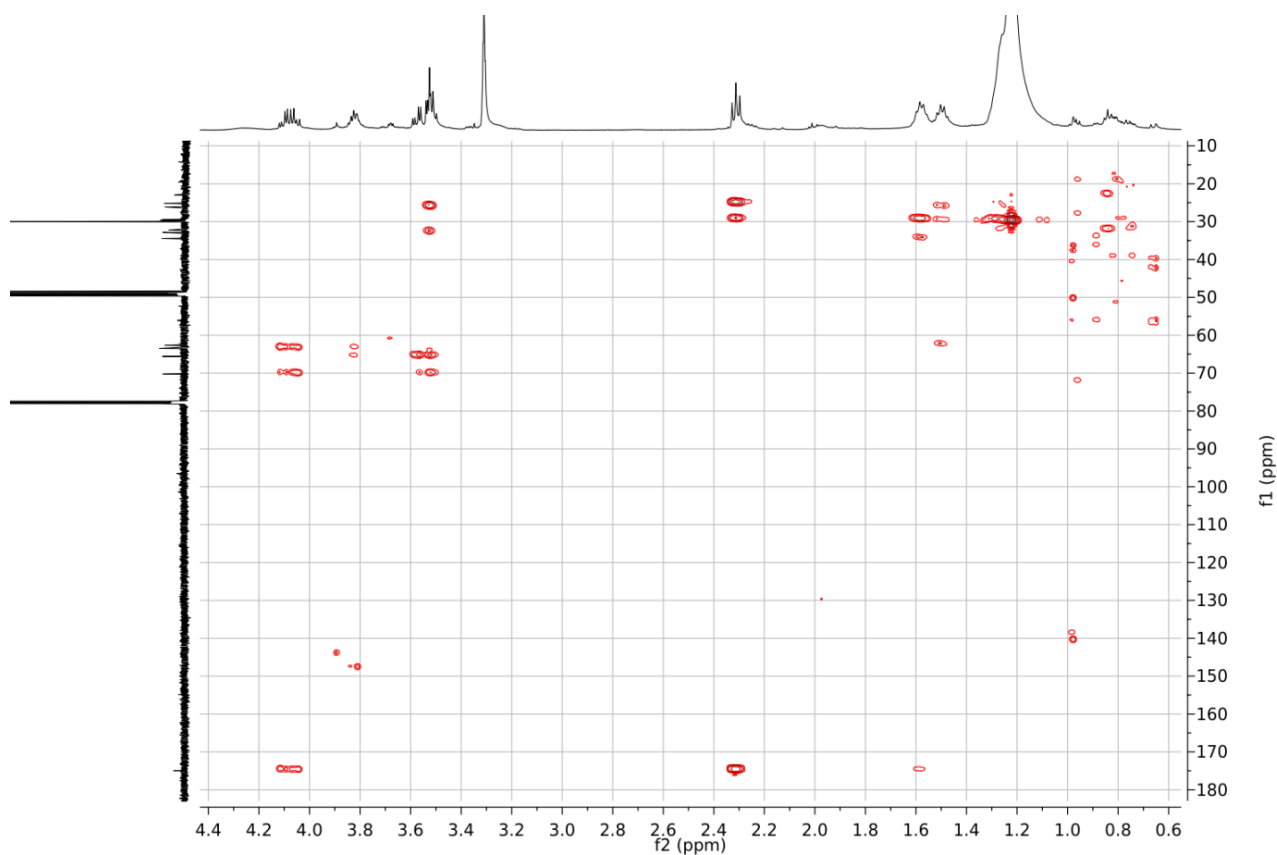


Fonte: a autora, 2015.

As correlações citadas anteriormente, também foram constatadas no mapa de contornos HMBC (Figura 27), onde o carbono da carbonila ($\delta = 174,9$ - C4) da função éster foi observado correlacionando com os hidrogênios metilênicos com δ em 2,31 (CH₂-CO₂, H5) do carbono em posição α a carbonila (C5). Além, da correlação entre a carbonila ($\delta_C = 174,9$ - C4) com os hidrogênios metilênicos (H1a, $\delta = 4,10$ e H1b, $\delta = 4,06$) do carbono 1 do glicerol.

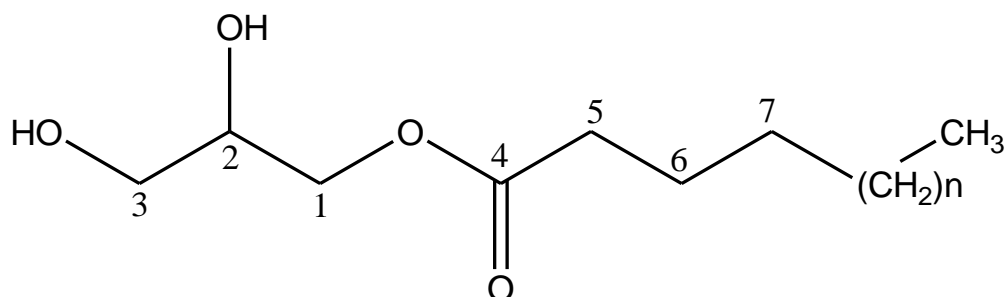
Baseado na interpretação dos espectros de IV, RMN de ¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC e HMBC, em comparação com os dados obtidos na literatura (Tabelas 12 e 13), pode-se sugerir para a fração F.203-222 a presença de substâncias da classe dos ésteres de glicerol (alcanoatos de glicerila), sendo as substâncias majoritárias na fração com estrutura química correspondente ao 1-monoacilglicerois (MAG), em específico do tipo 2,3-dihidroxipropil alcanoato. A partir de agora no texto, a F.203-222 será denominada de fração MAG, ou seja, fração com 1-monoacilglicerois (Figura 28).

Figura 27 - Mapa de contornos HMBC da fração F.203-222 (500 MHz, Clorofórmio-*d*/*Metanol-d*₄).



Fonte: a autora, 2015.

Figura 28 - Estrutura química geral do éster de glicerol do tipo 1-monoacilglicerol (2,3-dihidroxipropil alcenoato), demonstrada anteriormente.



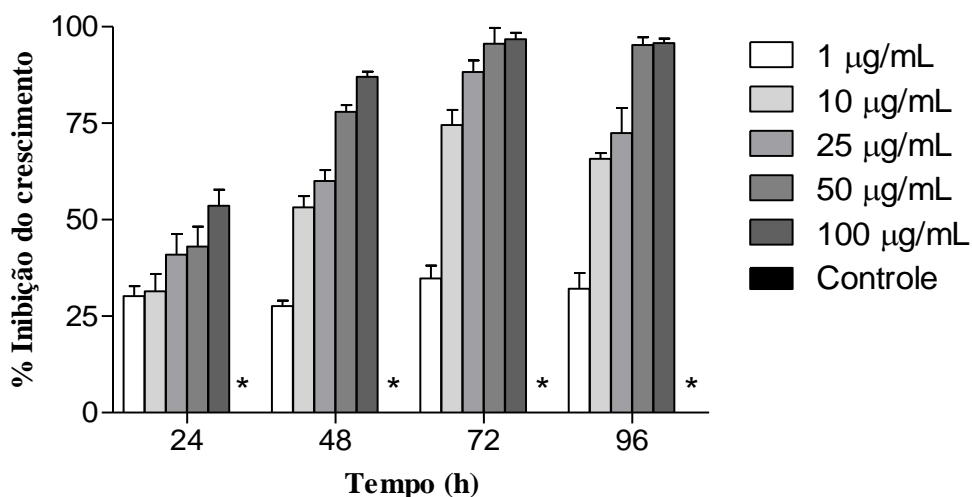
Fonte: a autora, 2015.

5.6 - Avaliação da Atividade Antiproliferativa em Formas Promastigotas e Amastigotas Intracelulares de *L. amazonensis*, Efeito Citotóxico em Macrófagos J774-A1 e Índice de Seletividade da Fração MAG.

A fração mais ativa foi à fração MAG (Tabela 11, referenciada antes como F.203-222) isolada da F.CHCl₃, da casca do caule de *A. macrocarpon*, que apresentou CI₅₀ de 2,31 ± 0,08 µg/mL sobre as formas promastigotas, CI₅₀ de 4,32 ± 0,95 µg/mL em amastigotas axênicas e CI₅₀ de 2,29 ± 0,14 µg/mL sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Foi encontrado um CC₅₀ de 98,07 ± 0,72 µg/mL sobre macrófagos J774-A1. Os IS sobre as promastigotas e amastigotas intracelulares foi de 42, para ambas as formas evolutivas, demonstrando que a fração teve maior seletividade para o parasito do que sobre o macrófago.

A Figura 29 apresentou a atividade da fração MAG contra promastigota, porém esta foi avaliada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h. O tratamento das formas promastigotas por 48 h demonstrou CI₅₀ de 8,32 ± 0,68 µg/mL esta concentração foi maior quando comparada com a CI₅₀ de 72 h (2,31 ± 0,08 µg/mL). Em 96 h de tratamento a CI₅₀ (2,57 ± 0,57 µg/mL) não alterou, quando comparada a de 72 h. Contudo, pode-se inferir com base nestes resultados, que o tempo de tratamento foi determinante para o resultado da CI₅₀ destas substâncias, considerando que em 24 h a CI₅₀ foi de 81,05 ± 6,80 µg/mL.

Figura 29 - Avaliação da atividade antiproliferativa da fração MAG sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* por um período de 24, 48, 72 e 96 h de tratamento.



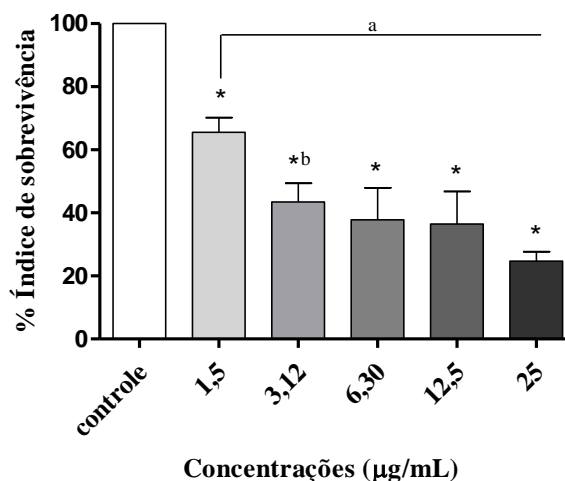
Legenda: Foram utilizadas sobre as formas promastigotas diferentes concentrações da fração MAG (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) no período de tratamento de 24, 48, 72 e 96 h. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado two-way Anova, seguido pelo *post test* de Bonferroni. Os asteriscos indicaram diferença significativa em relação ao controle (parasitos não tratados, porcentagem de inibição do crescimento foi igual à zero) ($*p \leq 0,05$). **Fonte:** a autora, 2015.

Em relação atividade contra as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, a Figura 30 demonstrou a porcentagem do índice de sobrevivência (Is) dessas formas tratadas com a fração MAG, por 48 h, nas concentrações de 1,5, 3,12, 6,30, 12,5 e 25 µg/mL. Os Is das concentrações foram calculados conforme descrito no item 4.2.2.7 e comparado ao Is do controle (células não tratadas) que apresentou Is de 830,15.

Os Is encontrados foram decrescentes conforme se aumentou a concentração da substância testada.

Enquanto para a concentração de 1,5 µg/mL da fração MAG o Is foi de 428,86, para 3,12 µg/mL o Is foi igual a 221,76, em 6,25 µg/mL o Is encontrado foi de 122,25, com 12,5 µg/mL o Is foi de 112,87 e para 25 µg/mL o Is diminuiu para 92,07. Os resultados foram expressos em porcentagens dos Is que corresponderam a 11%, 14%, 13%, 27% e 52% de sobrevivência das amastigotas tratadas com 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,5 µg/mL da fração MAG, respectivamente (Figura 30).

Figura 30 - Avaliação do índice de sobrevivência das formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em macrófagos murinos, após tratamento com diferentes concentrações da fração MAG.

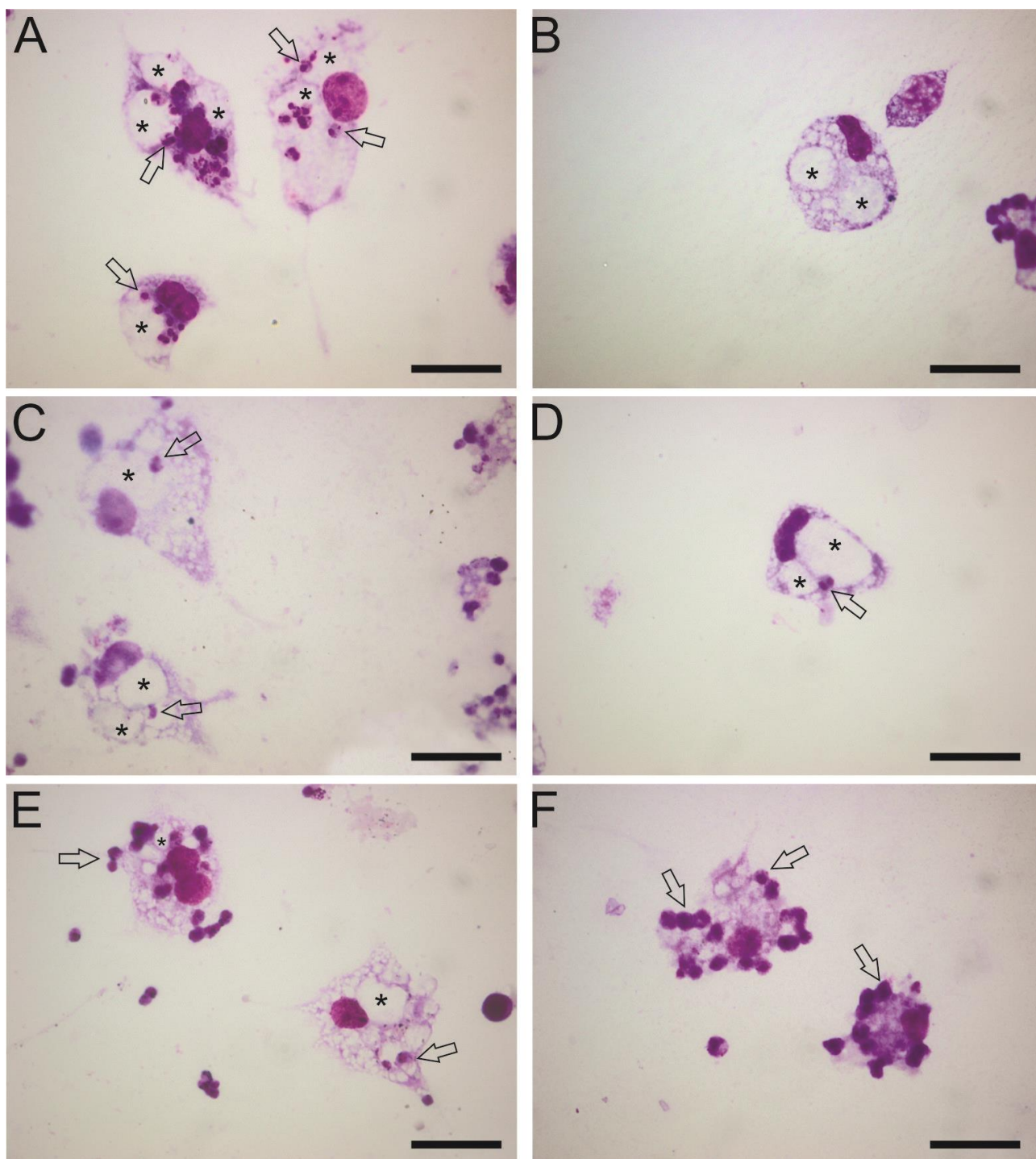


Legenda: Foram utilizadas sobre as formas amastigotas intracelulares concentrações da fração MAG de 1,5, 3,12, 6,25, 12,5 e 25 µg/mL. **Controle:** parasitos não tratados. Todas as concentrações foram significativamente diferentes quando comparadas ao controle ($*p \leq 0,05$) e a concentração de 1,5 µg/mL apresentou diferença significativa comparada com as demais concentrações ($^a p \leq 0,05$). A concentração de 3,2 µg/mL apresentou diferença significativa em relação à concentração de 25 µg/mL ($^b p \leq 0,05$). Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado one-way Anova, seguido pelo *post test* de Tukey. **Fonte:** a autora, 2015.

Todas as concentrações testadas apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($*p \leq 0,05$). Entre as concentrações, as diferenças na porcentagem dos Is foram significativas na concentração mais baixa testada 1,5 µg/mL em relação às demais concentrações ($^a p \leq 0,05$). E entre a concentração de 3,2 µg/mL, em relação a maior concentração testada 25 µg/mL ($^b p \leq 0,05$). As demais concentrações, não apresentaram diferença significativa entre si. Considerando estes resultados, pode-se inferir que a taxa de sobrevivência das formas amastigotas de *L. amazonensis* sofreram influência dose-dependente com o tratamento (Figura 30).

Estes dados corroboraram com os visualizados na Figura 31, onde foram apresentados imagens de microscopia óptica da interação das amastigotas intracelulares com macrófagos murinos. A imagem A foi representada pelo controle (células não tratadas), onde foi possível visualizar no interior do vacúolo parasitóforo, um número de amastigotas superior ao observado nas imagens B, C e D tratados com 25, 12,5 e 6,25 µg/mL da fração MAG.

Figura 31 - Microscopia óptica de amastigotas intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos, tratados ou não com a fração MAG isolada da casca do caule de *A. macrocarpon*.



Legenda: (A) Células não tratadas (controle), (B) células tratadas com 25 µg/mL; (C) células tratadas com 12,5 µg/mL; (D) células tratadas com 6,25 µg/mL; (E) células tratadas com 3,12 µg/mL; (F) células tratadas com 1,56 µg/mL. Setas: amastigotas intracelulares; Asterisco: vacúolos parasitóforo. Barras: 20 µm. **Fonte:** a autora, 2015.

5.6.1 - Avaliação da Citotoxicidade sobre Eritrócitos Humanos

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada para a fração F.CHCl₃ e a fração MAG isoladas da casca do caule de *A. macrocarpon*. O triton X-100 é um tensoativo não iônico e foi utilizado como controle positivo, este apresentou 100% de hemólise, ou seja, danificou a integridade da membrana das hemácias em 100% dos experimentos realizados (Tabela 14).

As amostras testadas foram comparadas ao controle de células não tratadas e ao controle positivo (Triton X – 100), com base no cálculo utilizado para obtenção das porcentagens de hemólise. Segundo Hou et al. (2008) o limite admissível de hemólise não pode ultrapassar 5,0%. As porcentagens de hemólise encontradas neste estudo foram descritas na Tabela 14.

A fração F.CHCl₃ apresentou hemólise na concentração acima de 500 µg/mL, sendo a fração MAG menos hemolítica que a F.CHCl₃. Até a concentração de 100 µg/mL as amostras testadas não foram consideradas hemolíticas (Tabela 14).

Destes resultados, pode-se concluir que o processo de fracionamento levou a obtenção de substâncias com menor ação hemolítica em concentrações altas, quando comparada com sua fração de origem (Tabela 14).

Tabela 14 - Atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos da fração F.CHCl₃, fração MAG isoladas da casca do caule de *A. macrocarpon*, resultados expressos em porcentagem de hemólise (%).

Amostra	Concentração (µg/mL)				
	1000	500	100	50	10
	Porcentagem de hemólise (%)				
F.CHCl ₃	26,6±1,92	6,82±0,14	0,63±0,06	0,61±0,21	0,11±0,06
Fração MAG	10,38±2,19	1,94±0,54	0,39±0,27	0,56±0,28	0,10±0,15

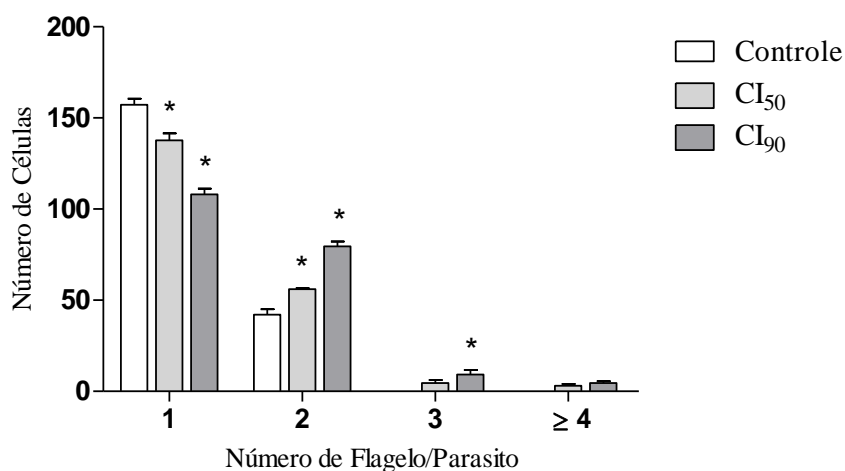
Legenda: F.CHCl₃: fração clorofórmio. **Fonte:** a autora, 2015.

5.6.2 - Avaliação Flagelar das Formas Promastigotas de *L. amazonensis*.

Na avaliação da atividade realizada com a fração MAG sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, observou-se durante as contagens em câmara de Neubauer a presença de células com mais de um flagelo. Diante desta observação, estas formas evolutivas foram tratadas com a CI_{50} e CI_{90} da fração MAG, segundo o método descrito anteriormente (item 4.2.2.5). E após 72h foram realizados esfregaços em lâminas, e estas foram coradas e visualizadas em microscópio óptico em objetiva de 100 (item 4.2.2.11).

A Figura 32 apresenta a contagem em microscópio óptico do número de flagelos por promastigotas, o maior número de células contadas ($157,33 \pm 4,49$) com apenas um flagelo por parasito, foi representado pelo controle (células não tratadas), num total de 200 células contadas por experimento.

Figura 32 - Número de flagelos em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG.



Legenda: **Controle:** parasitos não tratadas; **CI_{50} :** células tratadas com $2,31 \mu\text{g/mL}$ da fração MAG; **CI_{90} :** células tratadas com $32,28 \mu\text{g/mL}$ da fração MAG. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado two-way ANOVA, seguido pelo *post test* de Bonferroni. Os asteriscos indicaram a diferença significativa em relação ao controle (parasitos não tratados, $*p \leq 0,05$). **Fonte:** a autora, 2015.

Uma parte das células tratadas também apresentaram um único flagelo (número de células contadas para a CI_{50} : $137,66 \pm 5,43$; e para a CI_{90} : $108,00 \pm 4,55$), sendo este número significativamente diferente quando comparado ao controle (células não tratadas) ($p \leq 0,05$). Os parasitos tratados apresentaram um número maior de células com 2 flagelos (Figura 32). Apenas, em células tratadas com a CI_{90} da amostra testada é que foi encontrada diferença significativa em relação ao controle, como a presença de três flagelos por parasito. Embora, tenha sido identificada a presença de promastigotas com quatro (4) ou mais flagelos nos parasitos tratados, estes não foram significativos quando comparados ao grupo controle (células não tratadas) (Figura 32 e 33).

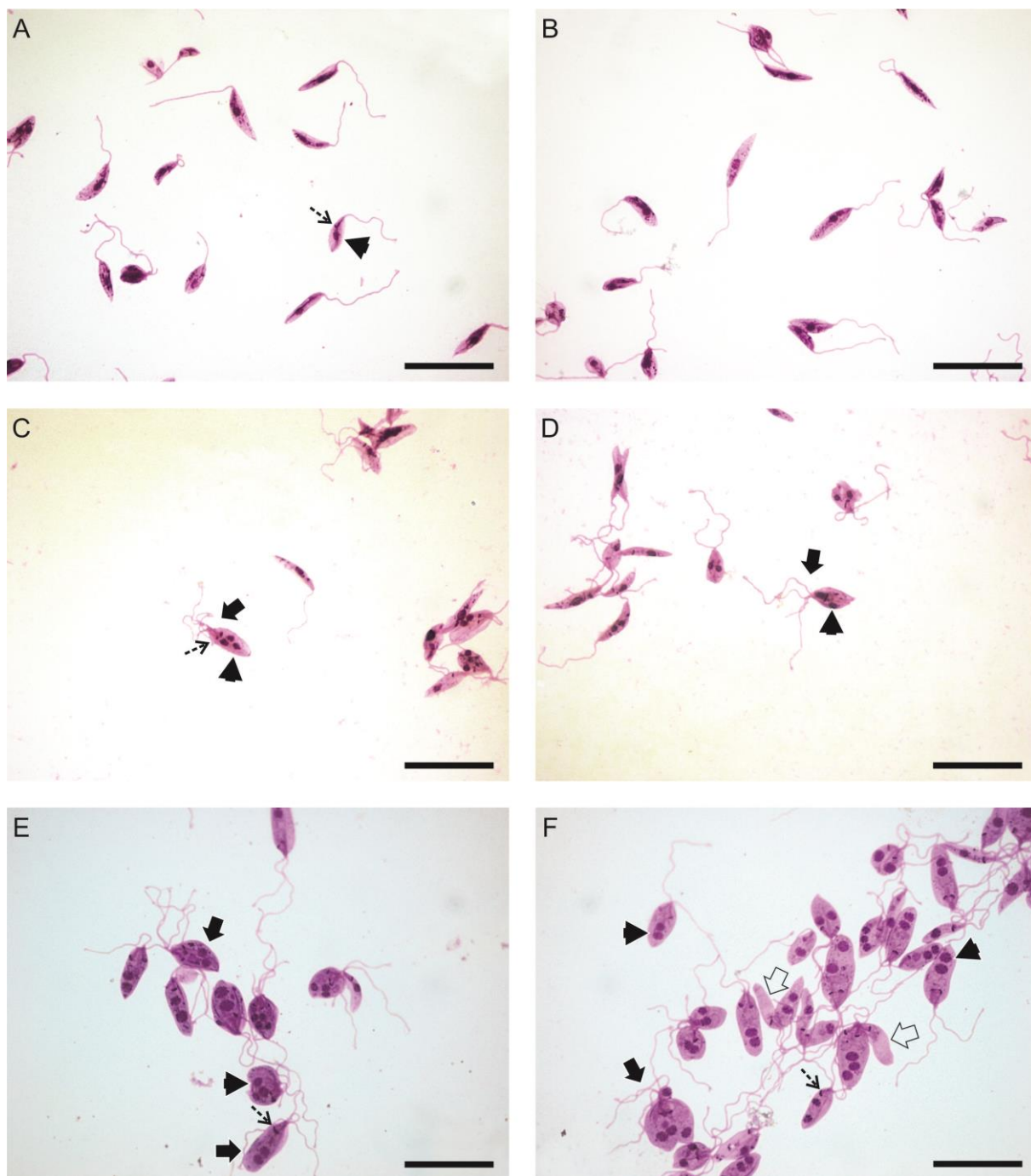
As imagens da Figura 33 mostram além das variações do número de flagelo, por parasitos observados nos tratamentos com CI_{50} e CI_{90} da fração MAG, alterações no número de núcleo e cinetoplasto, para ambos os tratamentos. Estas alterações sugerem que as células tratadas apresentaram divisão flagelar, nuclear e do cinetoplasto sem ocorrência da fissão binária, para geração da célula filha, indicando alguma alteração no ciclo celular deste parasito em função do tratamento. Contudo, como visualizado na imagem F (Figura 33), as células que parecem ter gerado células filhas, apresentaram alteração nas mesmas como, por exemplo, ausência de núcleo. Estes dados foram observados qualitativamente durante a contagem dos flagelos. Diante destas observações foi realizada a avaliação quantitativa do ciclo celular das formas promastigotas de *L. amazonensis*, por citometria de fluxo apresentada no item 5.6.7.

Segundo Ambit et al. (2011), a geração de células filhas viáveis depende de um controle preciso da duplicação e segregação das organelas como núcleo, complexo de Golgi, mitocôndrias (que contém o cinetoplasto) e flagelo que se projeta da bolsa flagelar.

A primeira indicação de que uma nova rodada de divisão celular iniciou, é a presença de um flagelo filho, como foi descrito para promastigota de *L. mexicana* (WHEELER; GLUENZ e GULL, 2011), sendo indicativo de que a replicação do DNA ocorreu (AMBIT et al., 2011).

Em células não tratadas, em uma população assíncrona quando ocorre a separação completa do DNA dos pais e filhas, observa-se um aumento da distância entre as bolsas flagelares e o sulco da clivagem entre as células, para o início da fissão binária que inicia na porção anterior do parasito. No processo de divisão celular em células não tratadas, os núcleos encontram-se dispostos lateralmente no interior das células em divisão, quando observada a promastigota em posição longitudinal (AMBIT et al., 2011).

Figura 33 - Microscopia óptica de formas promastigotas de *L. amazonensis*, tratados ou não com a fração MAG isoladas da casca do caule da *A. macrocarpon*.



Legenda: (A-B) Células não tratadas (controle); (C-D) células tratadas com IC₅₀ da fração MAG ($2,31 \pm 0,079 \mu\text{g/mL}$); (E-F) células tratadas com IC₉₀ da fração MAG ($32,28 \pm 1,63 \mu\text{g/mL}$). Seta preta: indicou a presença de parasito com dois ou mais flagelos. Cabeça de seta preta: indicou o núcleo; Contorno de seta preta: indicou presença de célula anucleada; Seta tracejada preta: indicou o cinetoplasto. Barras: 20 μm . **Fonte:** a autora, 2015.

Nas imagens C, D, E e F da Figura 33, os núcleos de várias células em processo de divisão estavam dispostos em fileira, ou seja, um atrás do outro quando observados os parasitos longitudinalmente. Assim como, não foi evidenciado aumento na distância entre a bolsa flagelar dos parasitos pais para as células filhas.

Outra característica observada, foi em relação ao tamanho das formas promastigotas na imagem E e F (Figura 33), estas demonstraram aumento do tamanho celular quando comparada qualitativamente com as imagens A e B (controle de células não tratadas) (Figura 33), sugerindo a necessidade da determinação do volume celular por meio da citometria de fluxo.

5.6.3 - Avaliação das Alterações Morfológicas e Ultraestruturais das Formas Promastigotas de *L. amazonensis* por Microscopia Eletrônica

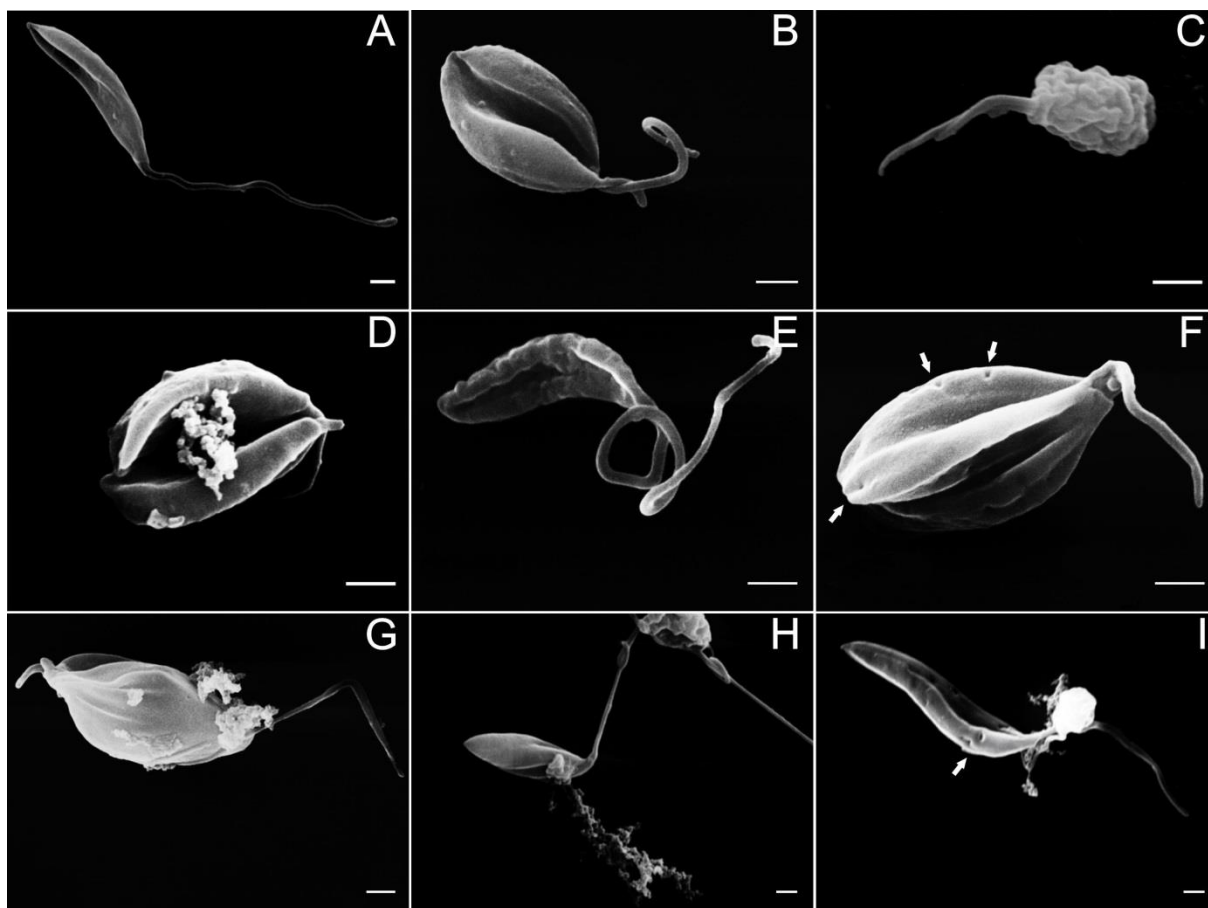
As alterações morfológicas e ultraestruturais das formas promastigotas de *L. amazonensis* foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), respectivamente, após serem tratadas com CI_{50} ($2,31 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) e CI_{90} ($32,28 \pm 1,63 \mu\text{g/mL}$) da fração MAG isolados da fração clorofórmio da casca do caule de *A. macrocarpon*.

A micrografia do controle visualizada por MEV apresenta as formas promastigotas não tratadas, com corpo celular alongado, com aspecto liso, e flagelo longo, característico de células normais (Figura 34 - A). Já as micrografias das células tratadas com a CI_{50} mostraram corpo celular com formato ovoide apresentando reentrância ou sulco profundo, aspecto rugoso da superfície celular, duplicidade e encurtamento do flagelo (Figura 34 - B, C e D). As células demonstradas nas micrografias B e D (Figura 34) sugerem células em fissão binária que não se separaram. Na imagem D foi possível visualizar extravasamento do conteúdo citoplasmático, embora não foi possível identificar o ponto de ruptura na membrana (Figura 34 - B, C, D). A imagem E (Figura 34) demonstrou o corpo celular alongado, porém com sinais de protuberâncias e depressões espalhadas pela superfície do parasito.

Nas micrografias das células tratadas com a CI_{90} , foram observadas um número maior de células com presença de extravasamento citoplasmático, e o corpo celular também apresentou característica ovoide com reentrâncias ou sulcos proeminentes e diminuição do comprimento do flagelo (Figura 34 - F e G). Na imagem F e I (Figura 34) o corpo celular

apresentou aspecto liso, mas com presença de pontuações semelhantes a pequenos furos ou perfurações (Figura 34 - F, G, H, I).

Figura 34 - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* observadas em microscópio eletrônico de varredura, após tratamento com a fração MAG isolada da fração clorofórmio da casca do caule de *A. macrocarpon*.



Legenda: (A) controle (células não tratadas); (B, C, D, E) CI₅₀ da fração MAG; (F, G, H, I) CI₉₀ da fração MAG. **Setas brancas:** indicam a presença de pontuações no corpo celular com aspecto de perfurações/furos. Barra = 1 μ m **Fonte:** a autora, 2015.

As características da morfologia externa do parasito apresentadas na Figura 34, demonstraram alterações que justificaram o estudo da ultraestrutura celular das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG e visualizadas por MET.

Na imagem B visualizada por MET (Figura 35) foi observado alterações citoplasmáticas, porém com preservação do arcabouço celular (microtúbulos subpeliculares), ou seja, a estrutura de membrana celular externa continuou íntegra, mas a mitocôndria apresentou um aumento significativo de tamanho com presença de membrana concêntrica no seu interior, semelhantes à figura de mielina.

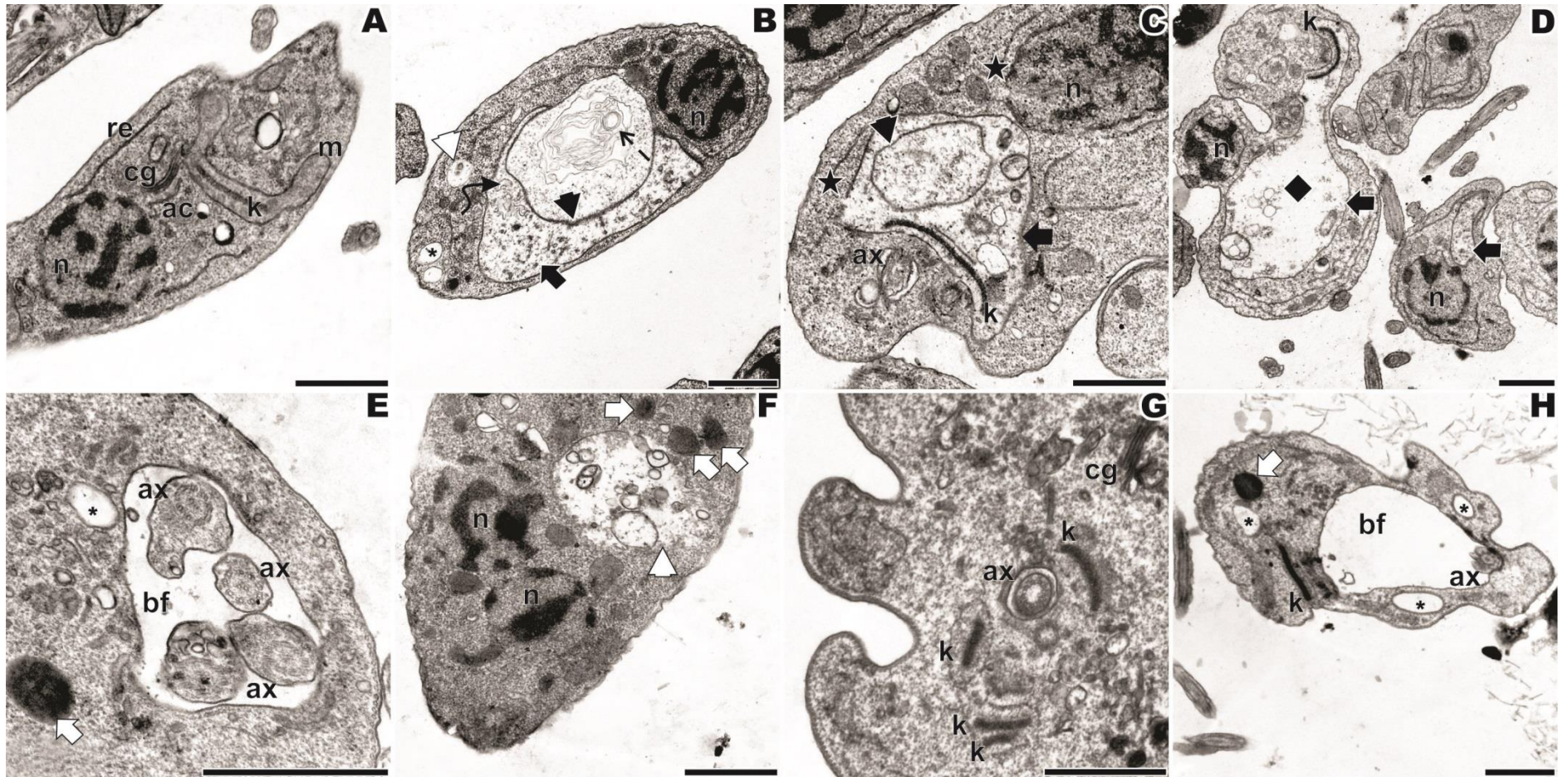
Entre as alterações ultraestruturais foram observadas desorganização das cristas mitocondriais (Figura 35 - B e C), presença de corpos com aparência de conteúdo lipídico (Figura 35 - E, F) e ruptura na membrana nuclear (Figura 35 - C).

Outras alterações celulares visualizadas nas micrografias por MET envolveram a presença de quatro axonemas na mesma bolsa flagelar (Figura 35 - E). Também foi evidenciada, a presença de células com dois núcleos e um vacúolo grande com aspecto autofágico (Figura 35 - F). Na micrografia G foi identificada a presença de quatro cinetoplasto ao redor de uma única inserção flagelar (axonema) (Figura 35).

Estas características contribuem com os achados descritos no item 5.6.2 (Figura 33), para as formas promastigotas avaliadas por microscopia óptica quanto ao número de flagelos, presença de mais de um núcleo e cinetoplasto por célula, em especial nas promastigotas tratadas com a CI₉₀ da fração MAG.

Estas características morfológicas e ultraestruturais visualizadas por MEV e MET, respectivamente, instigaram a análise mais detalhada das alterações ocasionada pela fração MAG. Na tentativa de elucidar o provável mecanismo de morte celular destas formas promastigotas, sendo realizadas algumas análises por citometria de fluxo.

Figura 35 - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* visualizadas por microscópio eletrônico de transmissão, após tratamento com a fração MAG isolada da fração clorofórmio da casca do caule de *A. macrocarpon*.



Legenda: (A) controle (parasitos não tratados); (B, C, D) CI₅₀ da fração MAG; (E, F, G, H) CI₉₀ da fração MAG. Alterações ultraestruturais foram indicadas como: setas pretas: mitocôndria inchada; setas brancas: aparência de corpos lipídicos; cabeça de seta preta: membranas concêntricas dentro da mitocôndria; cabeça de seta branca: vacúolos autofágicos; asterisco preto: vacúolos citoplasmáticos, seta curva preta: desorganização da crista mitocondrial; seta tracejada preta: lamelas concêntricas, semelhantes à figura de mielina; estrela preta: região de ruptura da membrana nuclear; losango preto: mitocôndria inchada com conteúdo extraído. Outras designações: (n) núcleo; (m) mitocôndria; (k) cinetoplasto; (ax) axonema; (bf) bolsa flagelar; (re) retículo endoplasmático; (cg) complexo de Golgi, (ac) acidocalciossomos. Barra = 1 μm. **Fonte:** a autora, 2015.

5.6.4 - Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*.

Esta avaliação foi realizada com base nas alterações visualizadas nas micrografias por MET, onde foi possível identificar dano à mitocôndria (Figura 35) das formas promastigotas de *L. amazonensis*, tratadas tanto com a CI_{50} quanto com a CI_{90} da fração MAG.

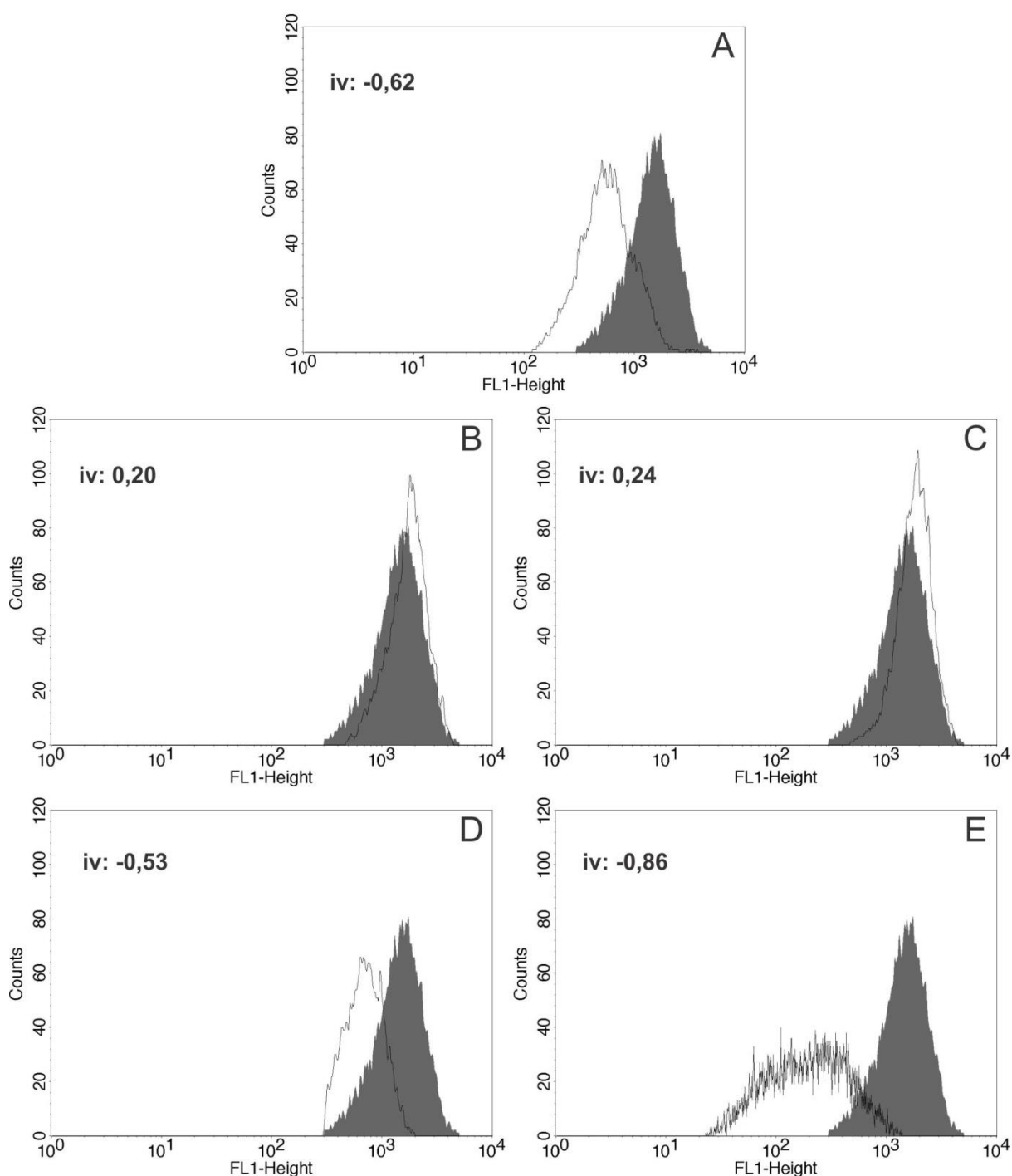
O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliado utilizando o marcador fluorescente rodamina 123, que emite fluorescência ao se acumular no interior da mitocôndria. A despolarização da membrana mitocondrial foi indicada por uma diminuição da intensidade de fluorescência do marcador, como foi observado para as concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$ da fração MAG que apresentaram redução da intensidade de fluorescência de 53,0% e 86,5%, respectivamente, quando comparada com o controle negativo (células não tratadas - histograma cinza – Figura 36). O controle positivo (CCCP) apresentou 62,5% de despolarização do $\Delta\Psi_m$, na concentração de 100 μM (Figura 36).

Embora, as concentrações estejam acima da encontrada para a CI_{50} ($2,31 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) e a CI_{90} ($32,28 \pm 1,63 \mu\text{g/mL}$) da fração MAG sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, em 72 h de tratamento, a análise do potencial de membrana mitocondrial foi realizada em 24 h, neste tempo não foi possível estabelecer a CI_{50} desta amostra teste (Figura 29), por isto foram necessários concentrações maiores para comprovar se ocorreria tal injúria no $\Delta\Psi_m$, como as alterações visualizadas por MET sugeriram.

Britta et al. (2014) também avaliaram o potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo, após 24 h de tratamento das formas promastigotas de *L. amazonensis* com a 4-nitrobenzaldeído-tiosemicarbazona e utilizaram concentrações acima da CI_{50} (3,8 μM) e CI_{90} (13,9 μM) desta substância, a despolarização mitocondrial ocorreu em concentrações acima de 55 μM .

A partir, dos dados recuperados da análise do $\Delta\Psi_m$, foi possível calcular a relação entre a mediana e a fluorescência emitida pelas células tratadas com o marcador (Mt), assim como foi adquirido para as células não tratadas (controle negativo) (Mc), estes dados resultaram na obtenção do índice de variação (iv), permitindo a comparação entre os diferentes tratamentos e o controle negativo (células não tratadas) a respeito do $\Delta\Psi_m$, sendo iv com valores negativos relacionados à despolarização da mitocôndria, como descrito no item 4.2.2.15.1.

Figura 36 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG.



Legenda: (A) Controle positivo – CCCP (100 μM). As formas promastigotas foram tratadas com a fração MAG nas concentrações de: (B) 25 $\mu\text{g/mL}$; (C) 50 $\mu\text{g/mL}$; (D) 100 $\mu\text{g/mL}$; (E) 200 $\mu\text{g/mL}$. A área em cinza corresponde ao controle com células não tratadas. **iv:** índice de variação. **Fonte:** a autora, 2015.

Os valores de iv para as promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 25, 50, 100 e 200 µg da fração MAG foram: 0,20; 0,24; - 0,53 e - 0,86, respectivamente. O CCCP (100 µM) apresentou iv de - 0,62, potencial de despolarização das mitocôndrias. Os valores positivos, embora discretos para as concentrações de 25 e 50 µg da amostra teste indicaram aumento na intensidade de fluorescência, como consequência de hiperpolarização da membrana mitocondrial (Figura 36).

Berghe et al. (2010) concluíram que pode ocorrer hiperpolarização da mitocôndria em morte celular por necrose (aumento do potencial transmembrana mitocondrial), sendo que este tipo de morte pode ocorrer por vias de transdução de sinais e execução de mecanismos complexos. Enquanto, a redução do potencial transmembrana da mitocôndria normalmente está relacionada com morte celular via apoptose.

Estes valores corroboraram com os observados na MET para a mitocôndria de formas promastigotas de *L. amazonensis*, considerando que esta organela é única e caracteriza-se por apresentar um cinetoplasto, que contém material genético condensado (kDNA), sendo um importante alvo terapêutico no estudo de novas substâncias antiprotozoário.

5.6.5 - Avaliação da Integridade da Membrana Celular em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*.

A integridade de membrana foi avaliada, considerando as alterações morfológicas visualizadas por MEV (Figura 34), posto à presença de sinais na superfície do corpo celular do parasito de extravasamento celular e de perfurações.

No gráfico biparamétrico (*dot plot*) obtido por citometria de fluxo, a intensidade de fluorescência detectada no quadrante superior esquerdo é referente às células marcadas com um tipo de fluorocromo, e no quadrante superior direito as células são marcadas com o mesmo fluorocromo e mais outro fluorocromo, dependendo do ensaio quando se utiliza dois marcadores. No quadrante inferior esquerdo, permanecem as células não marcadas com os fluorocromos utilizados, neste caso o controle negativo (FERRAZ, 2013).

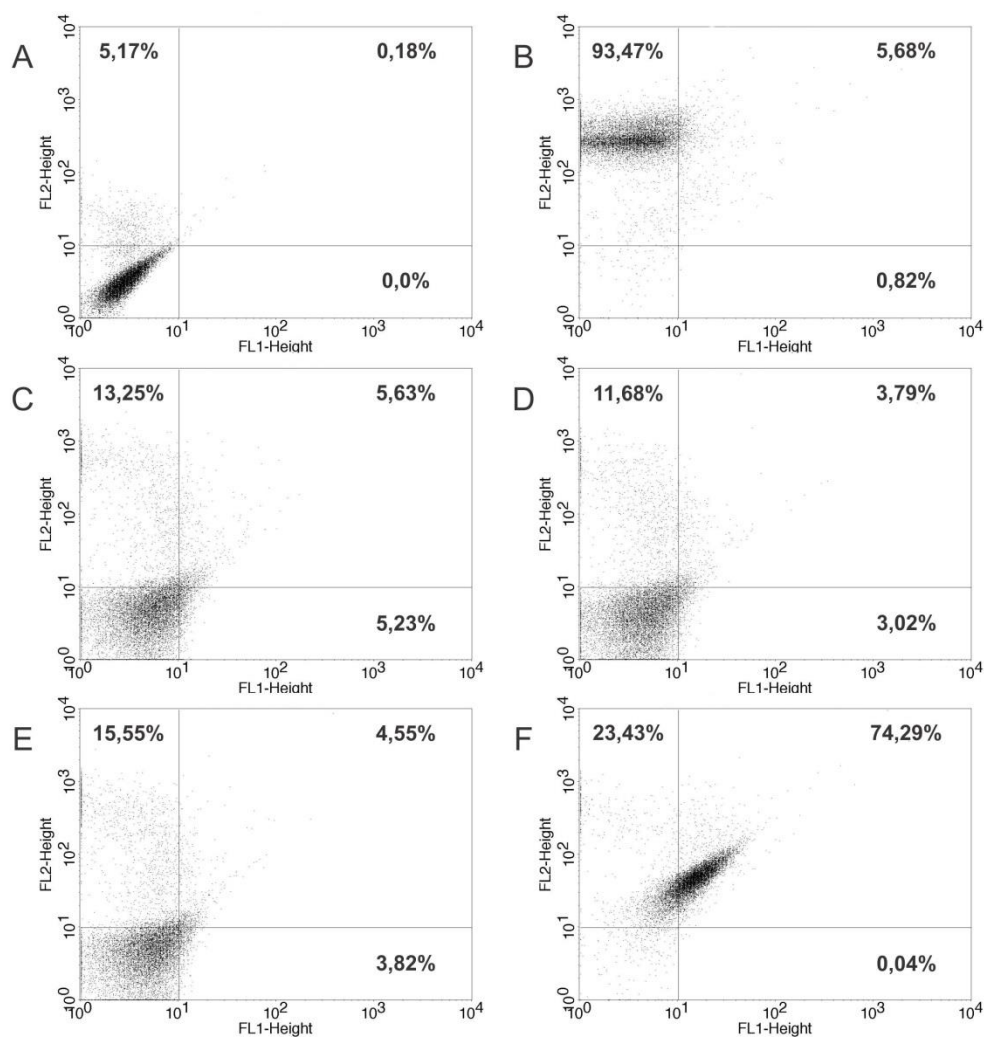
A análise da integridade de membrana celular foi realizada com promastigotas tratadas com a fração MAG, nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL. O marcador fluorescente utilizado foi o iodeto de propídeo (IP) que é capaz de penetrar apenas nas células que perderam a integridade da membrana celular e se ligar aos ácidos nucleicos. A digitonina (controle positivo – 40 µm) alterou 93,47% de células do parasito, quando comparado ao controle negativo (Figura 37).

Na Figura 37 verificou-se que os parasitos tratados nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram pouca diferença em relação ao controle negativo, ou seja, não ocorreu aumento significativo na população de células marcadas com IP.

Enquanto que, para os parasitos tratados na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, houve um deslocamento da população celular para o quadrante superior esquerdo e direito (23,43 e 74,29%, respectivamente), quando comparado ao controle negativo.

Considerando que neste ensaio para a integridade de membrana foi utilizado apenas um fluorocromo, o IP, as alterações expressas no quadrante superior direito também equivalem às células marcadas com IP.

Figura 37 - Avaliação da integridade de membrana celular em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG.



Legenda: (A) controle (células não tratadas), (B) Controle positivo – Digitonina (40 μM). As formas promastigotas foram tratadas com a fração MAG nas concentrações de: (C) 25 $\mu\text{g/mL}$; (D) 50 $\mu\text{g/mL}$; (E) 100 $\mu\text{g/mL}$; (F) 200 $\mu\text{g/mL}$. **Fonte:** a autora, 2015.

5.6.6 - Avaliação da Exposição da Fosfatidilserina em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*.

A avaliação da externalização da fosfatidilserina foi realizada com o marcador anexina V marcada com FITC (isotiocianato de fluoresceína) em células tratadas ou não (controle negativo) com a fração MAG nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL. A fosfatidilserina é um fosfolípídio localizado na face interna da membrana plasmática que em estágio inicial de apoptose, quando há integridade da membrana celular, mas desorganização da mesma, a fosfatidilserina é externalizada na membrana celular (STURM et al., 2006). Neste ensaio as células são marcadas com anexina V – FITC e iodeto de propídeo (IP).

A anexina V é uma fosfolipoproteína cálcio-dependente, que preferencialmente liga-se à fosfatidilserina. Células que apresentam positividade para os dois marcadores IP e Anexina V – FITC normalmente estão em estágio tardio de apoptose ou necrose (STURM et al., 2006).

A exposição precoce da fosfatidilserina, a fragmentação do DNA, diminuição do volume celular entre outras alterações bioquímicas, são descritas como indicativo de morte celular via apoptose (KROEMER et al., 2009).

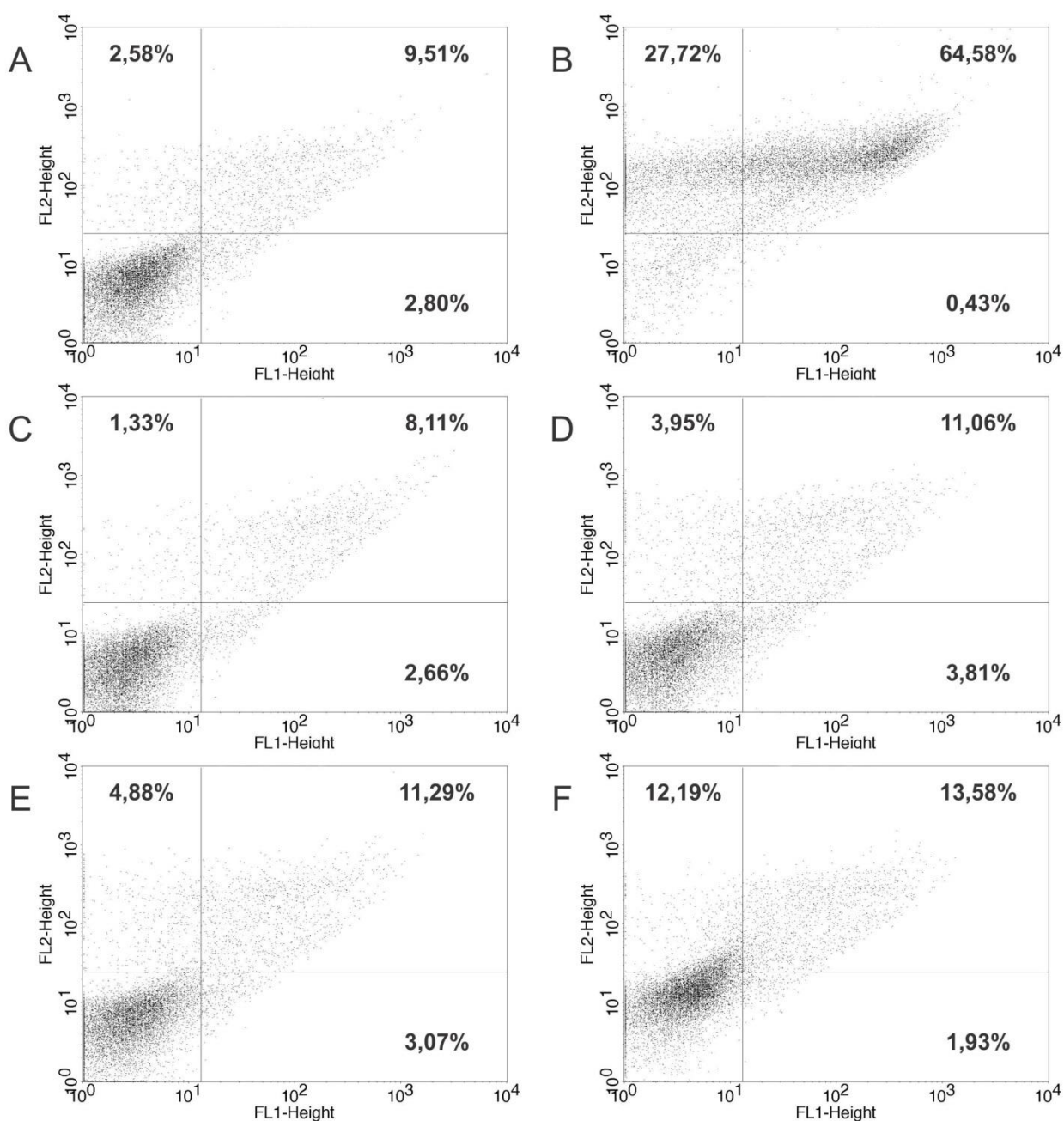
Os resultados foram expressos em gráfico biparamétrico (*dot plot*), sendo que o controle negativo (células não tratadas) apresentou maior porcentagem populacional de células no quadrante inferior esquerdo (85,11%) indicando a não marcação dessas células (Figura 38). Já o controle positivo (CCCP - 100 µM) para a anexina V – FITC demonstrou deslocamento de grande parte populacional das células para o quadrante superior esquerdo (64,58%), indicando que houve exposição da fosfatidilserina, e fluorescência pela presença do marcador anexina V – FITC (Figura 38).

As promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL, não demonstraram positividade para a marcação com a anexina V – FITC, sugerindo que não houve exposição da fosfatidilserina.

Na concentração de 200 µg/mL foi observado um discreto aumento da população para o quadrante superior esquerdo de 12,19%, quando comparado ao controle negativo (2,58%). O deslocamento de células para este quadrante indica fluorescência emitida pela marcação com o iodeto de propídeo (IP), que não atravessa a membrana íntegra da célula, indicando certa permeabilidade ou obstrução da membrana celular do parasito a este marcador. Considerando o aspecto íntegro da membrana celular do parasito, apenas com a presença de alguns pontos

semelhantes a perfurações observadas na MEV (Figura 34), pode se sugerir que houve pouca penetração do IP.

Figura 38 - Avaliação da exposição da fosfatidilserina em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG.



Legenda: (A) controle (células não tratadas), (B) Controle positivo – CCCP (100 μ M). As formas promastigotas foram tratadas com a fração MAG nas concentrações de: (C) 25 μ g/mL; (D) 50 μ g/mL; (E) 100 μ g/mL; (F) 200 μ g/mL. **Fonte:** a autora, 2015.

5.6.7 - Avaliação do Ciclo Celular em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

A avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo indicou que, os parasitos tratados com a fração MAG na maior concentração testada (200 µg/mL) promoveu um aumento da porcentagem de células na fase subG0/G1, indicando fragmentação de DNA e isso pode ser confirmado por uma diminuição da porcentagem de células em S, evidenciando que as células não prosseguiram no ciclo celular (Tabela 15).

Para as outras concentrações (50 e 100 µg/mL) testadas a maioria da população celular foi observada na fase S do ciclo do celular, assim como, o observado para o controle positivo (taxol 20 µg/ml) (Tabela 15).

Na fase subG0/G1 do ciclo celular as células apresentam fragmentação da cromatina nuclear por DNases, uma característica normalmente encontrada em células com morte celular por apoptose. A fase subG0/G1 é o oposto da fase S do ciclo celular. Na fase S ocorre à replicação do DNA, e este processo deve ocorrer com extrema precisão para evitar mutações na próxima geração de células (KACZANOWSKI; SAJID e REECE, 2011).

Segundo Ambit et al. (2011), a geração de células filhas viáveis de um protozoário, depende de um controle preciso da duplicação e segregação das organelas como mitocôndria, complexo de Golgi, núcleo e flagelo.

Tabela 15 - Avaliação do ciclo celular de promastigotas ($5,0 \times 10^6$ células/mL) de *L. amazonensis* tratados com 50, 100 e 200 µg/mL da fração MAG, por 24 horas.

Grupo	Sub-G0/G1 (M1) (%)	G0/G1 (M2) (%)	S (M3) (%)	G2/M (M4) (%)
CN	4,24	36,02	58,32	0,20
20 µg/mL CP (Taxol)	0,95	18,48	77,31	2,25
50 µg/mL F.CHCl3-203	6,44	3,52	82,22	6,78
100 µg/mL F.CHCl3-203	6,00	21,99	68,78	1,88
200 µg/mL F.CHCl3-203	36,03	7,39	52,23	4,15

Fonte: a autora, 2015.

5.6.8 - Avaliação do Volume Celular em Formas Promastigotas de *L. amazonensis*

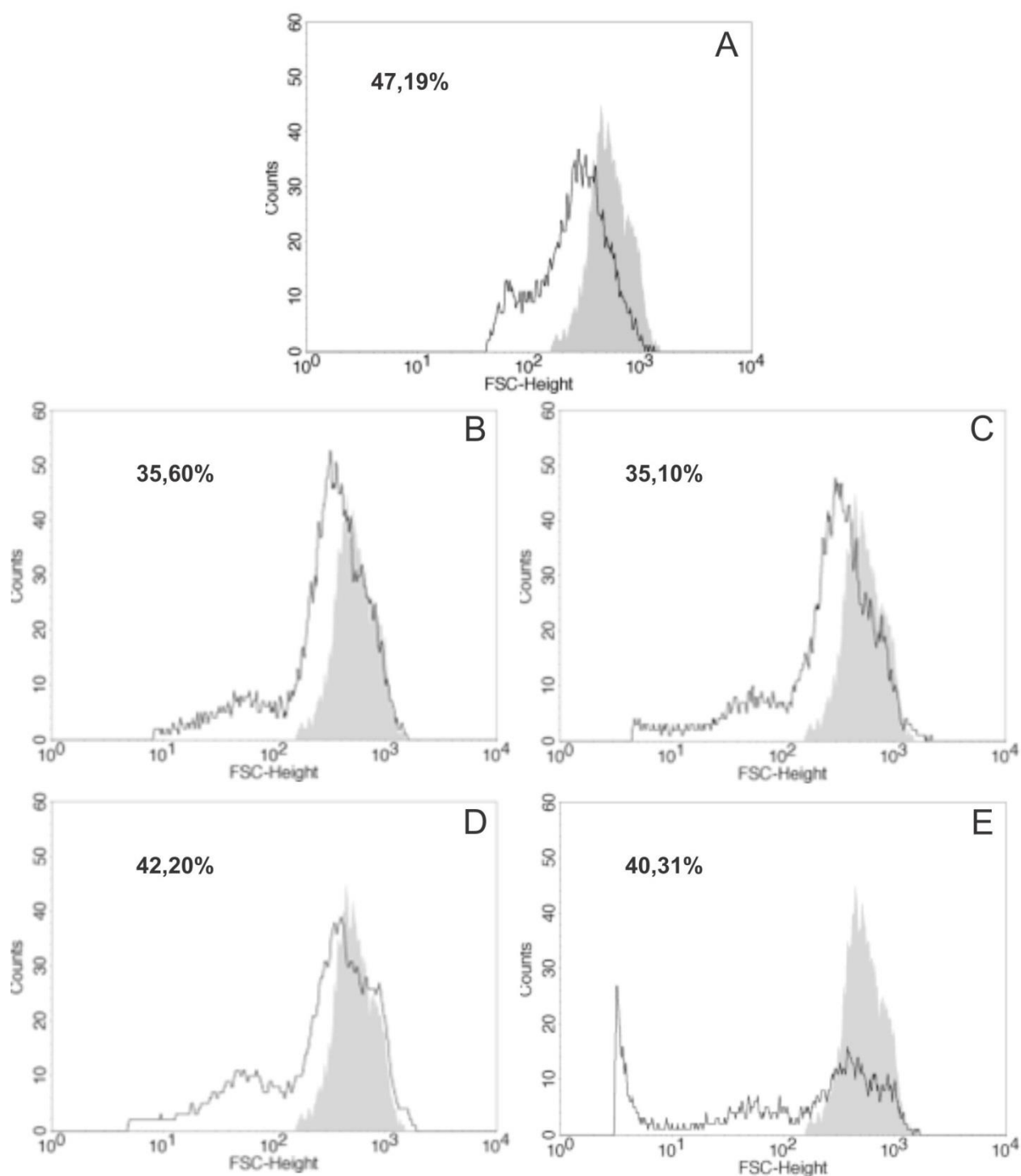
Considerando as alterações observadas nas micrografias por MEV e MET, e as visualizadas por microscopia óptica, descritas anteriormente foi realizado a avaliação do volume celular das promastigotas por citometria de fluxo.

O controle negativo foi apresentado na Figura 39 como histograma em cinza, enquanto as células tratadas foram demonstradas em forma de linha contínua. O controle positivo foi representado pela actinomicina D (50 μ M), que induziu diminuição de 47,19% do volume celular dos parasitos, quando comparado ao controle negativo (células não tratadas).

As porcentagens de diminuição do volume celular encontradas para as células tratadas com a fração MAG foram: 35,6; 35,1; 42,2 e 40,31%, para as concentrações de 25, 50, 100 e 200 μ g/mL, respectivamente. Estes dados sugerem que a alteração não foi dose-dependente.

A diminuição do volume celular quantificada por citometria de fluxo (Figura 39), após 24 h de tratamento das formas promastigotas com concentrações abaixo (25 μ g/mL) e acima (50, 100 e 200 μ g/mL) da CI_{90} (32,28 μ g/mL) da fração MAG, contradiz o observado qualitativamente na Figura 33, onde as células tratadas com a CI_{90} demonstrou aparente aumento do volume celular, quando comparado às imagens do grupo controle. Contudo, as alterações visualizadas por MEV (Figura 34) sugeriram diminuição do volume celular.

Figura 39 - Avaliação do volume celular em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG.



Legenda: (A) controle positivo (Actinomicina D - 50 μ M). As formas promastigotas foram tratadas com a fração MAG nas concentrações de: (B) 25 μ g/mL; (C) 50 μ g/mL; (D) 100 μ g/mL; (E) 200 μ g/mL. A área em cinza corresponde ao controle com células não tratadas. FSC-Height: detector de dispersão para o tamanho da célula analisada. **Fonte:** a autora, 2015.

5.6.9 – Discussão dos Resultados Relacionados à Atividade Antileishmania da Fração MAG e o seu Provável Mecanismo de Ação

A discussão a seguir refere-se à compilação dos resultados (item 5.6 a 5.6.8) demonstrados para a fração MAG, com o intuito de correlacionar os dados obtidos para estas substâncias e os relatos da literatura, a fim de prever o provável mecanismo de ação destes 1-monoacilgliceróis (MAG) sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, agente causador da leishmaniose cutânea.

Neste estudo, a fração MAG foi testada sobre formas evolutivas de *L. amazonensis* como fitocomplexo e demonstrou atividade promissora.

Sabe-se que ésteres acílicos graxos são derivados de ácidos graxos que pertencem à classe dos lipídios, são solúveis em solventes orgânicos e as estruturas mais simples derivam biosinteticamente do complexo enzimático ácido graxo sintetase (MOYNA e HEINZEN, 2007). Os ésteres de glicerol fazem parte dos ésteres acílicos graxos e podem ser classificados como glicerolipídios, estes podem ser do tipo neutro como os 1- monoacilgliceróis (GUNSTONE, 1994; FUCHS et al., 2011). Este grupo de substâncias, pertence ao grupo de metabólitos primários nas plantas e funciona como reserva energética, função estrutural ou de recobrimento, além, de atuar como mensageiros em diversos processos metabólicos nas plantas (CASTRO et al., 2004; MOYNA e HEINZEN, 2007).

Os tripanosomatídeos, incluindo o *T. cruzi*, *T. brucei* e espécies de *Leishmania*, possuem altas taxas de ácidos graxos insaturados como componentes das membranas, que são essenciais para manutenção da viscosidade da bicamada lipídica. Além, de serem responsáveis pela mobilidade e pelas proteínas integradas na membrana, fornece flexibilidade e permeabilidade seletiva para a membrana citoplasmática, indicando que a via biossintética dos ácidos graxos é crucial para sobrevivência destes micro-organismos. Duas rotas biossintéticas de ácidos graxos são conhecidas, a mitocondrial do parasito e uma via associada à membrana plasmática destes tripanosomas. As características da biossíntese dos ácidos graxos nos tripanosomatídeos são diferentes da presente em células de mamíferos, revelando esta via como potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos (ALLOATTI e UTTARO, 2011; UTTARO, 2014; LIVORE e UTTARO, 2015).

Felício et al. (2010) detectaram o potencial antileishmania do extrato da alga vermelha *Bostrychia tenella* J. Agardh, as subfrações hexânica e diclorometano apresentaram atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* com CI_{50} de 1,5 e 4,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os autores identificaram a presença de várias classes de substâncias nas

frações ativas, como alcanos, alquenos, ácidos carboxílicos de cadeia longa, amidas, imidas, aromáticos, ésteres, lactonas, derivados do colesterol e ácidos graxos livres, e sugeriram com base na literatura que, estes últimos podem agir provocando ruptura na membrana plasmática.

Os valores encontrados por Felício et al. (2010), assemelham-se aos achados neste estudo, para as formas promastigotas de *L. amazonensis* com $CI_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ da fração MAG (Tabela 11) indicando boa atividade antileishmania.

Carballeira et al. (2012) sintetizaram o ácido 2-octadecínico (ácido graxo 2-alquinóico) que inibiu a enzima topoisomerase IB de amastigotas axênicas de *L. donovani* (CE_{50} : $5,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$). Contra amastigotas de *L. donovani* este ácido graxo apresentou CI_{50} de $11 \mu\text{M}$, com $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ sobre macrófagos murinos. Após, a avaliação da exposição da fosfatidilserina sobre promastigotas de *L. donovani* tratados com este ácido 2-alquinóico, foi descartada a morte celular via apoptose. Os autores também avaliaram que, a potência de inibição dos ácidos graxos é dependente do tamanho da cadeia de carbono.

Assim como, o resultado supracitado sobre a avaliação da exposição da fosfatidilserina, a fração MAG foi considerada negativa neste estudo para este ensaio (Figura 38).

Ações biológicas diferenciadas, já foram estabelecidas para os ácidos graxos 2-alquinóico, como atividade antineoplásica contra linhagem celular de neuroblasma humano, onde o ácido 2-octadecínico induziu morte celular via necrose. O ácido graxo 6-nonadecínico foi relatado como potente antifúngico, com provável mecanismo de ruptura da homeostase dos ácidos graxos destes micro-organismos. Ácidos graxos poli-insaturados exibiram atividade antimalária sobre o *P. falciparum*. Além, do tamanho da cadeia do *n*-alquil, o grau de insaturação também influenciou positivamente nas atividades antimicrobianas dos ácidos graxos (CARBALLEIRA, 2013).

Jiménez-Coello et al. (2013 e 2014) avaliaram a atividade *in vivo* do extrato clorofórmio das sementes de *Carica papaya*, que apresentaram três ácidos graxos majoritários (ácido oleico, palmítico e esteárico), esta mistura reduziu o número de tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em camundongos BALB/c.

Recentemente, a atividade antitripanosoma foi descrita para o ácido 12,14-octadecadínico (ácido macrocárpico), um derivado acetileno de ácido graxo isolado do extrato hexano das sementes de *Porcelia macrocarpa*, a fração com ácido macrocárpico apresentou uma CI_{50} de $5,32 \mu\text{g/mL}$, sobre as tripomastigotas de *T. cruzi*, e a $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ sobre fibroblasto, indicando maior seletividade sobre o parasito. A substância isolada

(ácido macrocárpico) exibiu CI_{50} de 10,70 μM e CC_{50} de 44,27 μM , quando avaliada sobre as mesmas células que a fração (SANTOS et al., 2015).

O resultado descrito acima, para a fração contendo o ácido macrocárpico assemelha-se com os resultados deste estudo, sobre as formas evolutivas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG (Figuras 29 e 30).

Na literatura há relatos de estudos com ácidos graxos isolados de plantas, algas, microorganismos e sintetizados em laboratório. Porém, para a espécie *A. macrocarpon* não foi encontrado até o momento estudos com a classe de substâncias presente na fração MAG (ésteres de glicerol), isolada desta espécie e descrita para a atividade frente a formas evolutivas de *L. amazonensis*.

As micrografias visualizadas por MEV, das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o CI_{50} (2,31 $\mu\text{g/mL}$) e CI_{90} (32,28 $\mu\text{g/mL}$) da fração MAG apresentaram sinais sugestivos de pequenas perfurações na superfície da membrana celular, e locais com extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 34), aparente diminuição do volume do corpo celular também foi evidenciada (Figura 34 - C). Quanto ao flagelo, as alterações mais evidentes foram encurtamento e duplicidade (Figura 34).

A presença de multiplicidade flagelar nos parasitos tratados com a fração MAG foi demonstrada na Figura 32 e 33, onde foi evidenciado um maior número de células com dois e três flagelos, quando comparado ao controle de células não tratadas. A presença de mais de um núcleo e cinetoplasto por células, também foram observados na Figura 33. Além de, um aumento aparente do volume do corpo celular do parasito (Figura 33 - E e F), este pode ser justificado pela alteração do ciclo celular quantificada por citometria de fluxo, que indicou maior porcentagem de células na Fase S do ciclo celular, onde ocorre a replicação do DNA, indicando indução do processo replicativo de forma anormal. Isso corrobora com as evidências microscópicas de injúria celular durante o processo de replicação, na qual ficaram retidas na Fase S do ciclo celular grande parte da população celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG (Tabela 15).

O controle positivo utilizado no ensaio do ciclo celular foi o taxol, que apresentou valores próximos aos observados pelos parasitos tratados com a fração MAG (Tabela 15), onde grande parte da população celular também permaneceu na Fase S. De acordo com dados da literatura para o taxol, este promove alteração do ciclo celular por induzir despolimerização dos microtúbulos durante a fase mitótica da divisão celular, e não promove a fragmentação do DNA ou RNA (SURAPANENI; DAS e DAS, 2012).

Estas alterações relacionadas com ciclo celular também foram visualizadas na MEV (Figura 34 - B e D) e na MET (Figura 35 - E, F e G) após, tratamento com a fração MAG. Nesta última figura as micrografias demonstraram células com presença de quatro (4) axonemas na mesma bolsa flagelar. Em outra célula, observou quatro cinetoplastos ao redor de um axonema, e presença de dois núcleos na mesma célula, e um vacúolo autofágico.

A MEV e a MET são ferramentas úteis frequentemente utilizadas em estudos de parasitos tratados com diferentes substâncias, a fim de contribuir para descoberta dos possíveis sítios de ação no parasito (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010).

De acordo com Macedo-Silva et al. (2013), alterações intensas foram visualizadas na MEV de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com itraconazol e posaconazol, como arredondamento e mudança na superfície celular. Alterações observadas por MET para esta associação evidenciaram a presença de autofagossomas e mitocôndrias inchadas com membranas concêntricas. Enquanto, Veiga-Santos et al. (2010) evidenciaram perda do conteúdo citoplasmático e retração do corpo do parasito, após o tratamento das formas tripomastigotas de *T. cruzi* com piperovatina (amida), visualizadas por MEV. Estas características também evidenciadas neste estudo, como já descrito anteriormente para formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG.

Kathuria et al. (2014) identificaram por MEV, a presença de células com aspecto arredondado e diminuição do corpo celular de promastigotas de *L. donovani* tratadas com um diterpenoide (16 α -hidrocleroda-3,13(14) Z-dien-15,16-olida). E por MET, este mesmo tratamento, evidenciou mitocôndrias inchadas, presença de acúmulo anormal de lipídeos, aumento de vacúolos citoplasmáticos e picnose, que é a condensação da cromatina do núcleo devido a processo patológico, indicativo de necrose.

A avaliação quantitativa do volume celular por citometria de fluxo indicou diminuição do volume celular (Figura 39). Essa alteração foi praticamente à mesma nas concentrações de 25 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com uma diminuição do volume celular de 35%, quando comparado ao controle de células não tratadas, e diminuição de cerca de 40% para as células tratadas com 50 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Estas porcentagens (35 – 40%) sugerem que a diminuição do volume celular ocorreu independente da concentração da fração MAG usada, insinuando que a diminuição do volume celular possa ser a causa, e não a consequência, ou seja, pode-se deduzir que a presença destes 1-monoacilglicerois (MAG) possa ter permeado a superfície celular do parasito como visualizado na MEV, nos pontos de obstrução/perfurações (Figura 34 - F, I, G e

H) e levado ao extravasamento do conteúdo citoplasmático, bem como uma sequência de danos no interior do parasito.

Contudo, na concentração de 200 µg/mL observa-se também, uma diminuição no número de células contadas (Figura 39 – E), sugerindo um maior número de *drebis* celulares, ao invés de formas promastigotas. A concentração de 200 µg/mL da fração MAG avaliada nos experimentos por citometria de fluxo, demonstrou alterações significativas, quando comparada ao controle de células não tratadas, mas também foi evidenciado diminuição na população de células contadas, inferindo que nesta concentração há presença de um número maior de células danificadas (*drebis* celulares).

Embora, os resultados apresentados pela análise da integridade de membrana celular em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG, apresentaram pouca diferença quando comparada ao controle negativo (Figura 37), estes dados corroboram com os visualizados no ensaio da exposição da fosfatidilserina (Figura 38) que não demonstrou positividade para anexina V – FITC.

Segundo Felício et al. (2010) há muitos dados a serem explorados para compreensão do mecanismo de ação dos ácidos graxos, como por exemplo, pode-se sugerir que estes atuem nos fungos promovendo ruptura na membrana plasmática destes micro-organismos.

De acordo com relatos da literatura, o processo de autofagia é um mecanismo importante para sobrevivência dos protozoários, e também está associado ao tratamento com diferentes classes de substâncias (RODRIGUES; SOUZA, 2008).

O papel da autofagia na célula em resposta a presença de EROs pode ocorrer naturalmente, por exemplo, na presença de proteínas oxidadas de células velhas, sendo uma via essencial na diferenciação e desenvolvimento celular em resposta ao estresse. Contudo, se os mecanismos de sobrevivência falham, a morte programa é ativada em resposta ao estresse oxidativo, e neste caso a autofagia (morte celular programada tipo II) pode levar a morte celular do parasito (ALZATE et al., 2007; SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR, 2007; BRENNAND et al., 2011).

No processo de autofagia além, da presença de vacúolos autofágicos (autofagossomos), ocorre aumento no número de corpos lipídicos anormais, que provavelmente são sobras não incorporadas na membrana plasmática ou de membranas que revestem várias organelas no citoplasma (RODRIGUES et al., 2002; BRITTA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

Como já descrito, neste estudo foi observado na Figura 35, à presença de vacúolos autofágico e aparente aumento de corpos lipídicos no citoplasma.

Danos na mitocôndria são sinais característicos de injúria celular em protozoários da família Kinetoplastidae, pois estes apresentam uma mitocôndria única com um cinetoplasto que contém DNA, tornando neste aspecto esta mitocôndria diferenciada da de mamíferos e com interesse particular nesta organela como alvo terapêutico. As alterações na mitocôndria quantificada neste estudo, pelo ensaio com o marcador rodamina 123 e observadas por MET, evidenciou inchaço, danos nas cristas mitocondriais, perda da matriz mitocondrial, além da presença de múltiplos vacúolos no interior da mesma e membranas concêntricas semelhantes à bainha de mielina (Figura 37 - B, C, D).

Portanto, alterações mitocondriais nos parasitos levam a uma sequência de mudanças celulares, como danos oxidativos em moléculas de lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas, desestruturando de maneira geral toda a integridade celular. A não incorporação dos lipídeos para a formação de membranas leva o acúmulo destes, formando à disposição de corpos com conteúdo lipídios pelo citoplasma de forma desordenada (RODRIGUES et al., 2002; GODINHO et al., 2013).

Alterações relacionadas ao potencial de membrana mitocondrial podem envolver muitos processos celulares, como estresse oxidativo, apoptose e autofagia (IZUMI et al., 2012; SCHERZ-SHOVAL; ELAZAR, 2007).

Uttaro (2014) relatou que 10% da síntese de ácidos graxos nos tripanosomatídeos acontecem na mitocôndria, e a inibição desta via resulta em alterações mitocondriais e perda da viabilidade da célula do parasito.

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG demonstrou discreta hiperpolarização, em relação ao controle de células não tratadas, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e despolarização a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 36).

De acordo com dados da literatura, no processo de morte celular por necrose pode ocorrer hiperpolarização mitocondrial, embora menos comum que a despolarização, este evento pode ser atribuído ao aumento do consumo de oxigênio e aumento do fluxo de elétrons (BROOKES, 2005; ALZATE et al., 2007; BERGHE et al., 2010).

Características de morte celular por necrose normalmente estão relacionadas a edema de organelas, ruptura de membrana plasmática com subsequente perda de conteúdo intracelular, incluindo permeabilização da membrana mitocondrial, condensação da cromatina ao redor do núcleo e clivagem do DNA, além de ganho do volume celular, este último não foi detectado neste estudo (KROEMER et al., 2009; BERGHE et al., 2010; CARBALLEIRA, 2013; RODRIGUES et al., 2014). Contudo, a ruptura e perda do conteúdo citoplasmático foram

evidenciadas tanto por MET, MEV, quanto na avaliação da integridade de membrana, e na avaliação da exposição da fosfatidilserina. Embora, estes dados tenham se mostrado discretos foram identificados neste estudo.

As alterações visualizadas pelas análises microscópicas (microscópio óptico, MEV e MET) foram justificadas pela quantificação do ciclo celular, do volume celular, análise da integridade de membrana, exposição da fosfatidilserina e avaliação do potencial de membrana das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG.

Os dados demonstrados neste estudo indicam que o tratamento das formas promastigotas de *L. amazonensis* com a fração MAG provocou danos celulares característicos tanto de morte celular por autofagia, quanto por necrose. Indícios do processo de morte celular por necrose podem ser evidenciado pela presença de alterações na integridade da membrana celular do parasito, onde a superfície celular apresentou perfurações, e extravasamento do conteúdo citoplasmático visualizado por MEV e MET. Alterações na mitocôndria do parasito indicaram discreta hiperpolarização também característica de morte celular por necrose. Seguida da despolarização da membrana mitocondrial, sinal de morte por via autofágica ou apoptótica. Porém, a presença de estruturas de mielina no interior desta organela, juntamente com a alteração do potencial de membrana mitocondrial, aumento no número de corpos lipídicos e vacúolos autofágicos evidenciou processo de morte celular por autofagia para as promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a fração MAG (RODRIGUES et al., 2002; IZUMI et al., 2012; VEIGA-SANTOS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014).

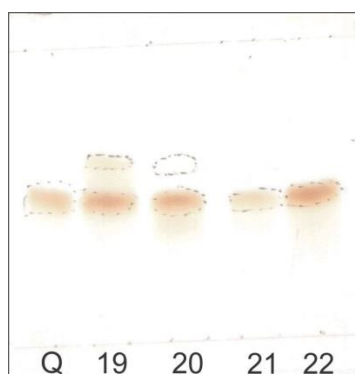
A ausência de alguns sinais celulares e resultados negativos em experimentos contribuíram para a exclusão da morte celular por apoptose, como a ausência de *blebs* de membrana e da externalização da fosfatidilserina na membrana celular do parasito, permitiu descartar a hipótese desta forma de morte celular. Entretanto, um ensaio relacionado à fragmentação do DNA (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013) possa ser realizado para confirmação da ausência desta via de morte celular.

Considerando as explanações dos dados experimentais e a discussão relacionada com os estudos da literatura, pode-se inferir sobre o potencial da fração com 1-monoacilglicerois (MAG) para obtenção de novas entidades químicas contra *L. amazonensis*.

5.7 – Caracterização Química da Amostra F.A.21-22 Isolada da Fração Acetato de Etila (F.A) da Casca do Caule de *A. macrocarpon*.

A Figura 40 apresenta a CCD da fração F.A-21 e F.A-22 eluídas junto com o padrão de quercetina, ambas apresentaram R_f de 0,5 igual à quercetina. A fração F.A-19 e F.A-20 também foram eluídas na mesma CCD. Entretanto, na visualização da CCD na câmara de luz ultravioleta curto (254 nm) a F.A-19 e F.A-20 apresentaram mais de uma mancha. Por isto, a F.A-21 e F.A-22 que demonstraram na CCD a presença de mancha única, foram reunidas (195,30 mg) e submetidas às análises biológicas e espectrais. A amostra foi codificada como F.A-21-22. A CCD da Figura 40 não foi revelada e a foto foi retirada sob luz branca.

Figura 40 - Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações F.A-19, F.A-20, F.A-21 e F.A-22 isoladas da fração F.A da casca do caule de *A. macrocarpon*.

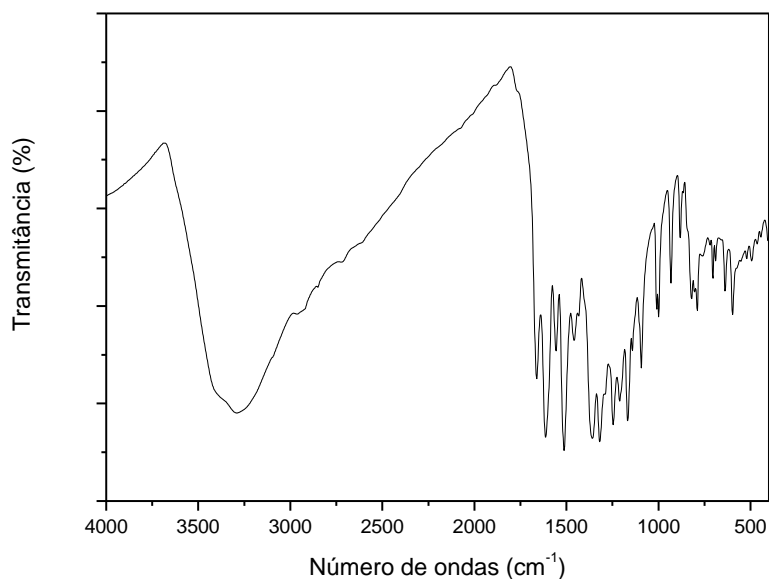


Legenda: Q – padrão de quercetina; 19, 20, 21 e 22 são frações isoladas da fração acetato de etila. Fase móvel utilizada para a CCD: Clorofórmio:Metanol (9:1). **Fonte:** a autora, 2015.

A fração F.A-21-22, um sólido amorfo, de coloração amarelo, foi selecionada para caracterização química por espectroscopia no IV e de RMN, para identificação da substância.

O espectro de IV (Figura 40) da fração F.A-21-22 apresentou banda larga e intensa em 3294 cm^{-1} característica de estiramento de O–H em ligação de hidrogênio inter- ou intramolecular. Na região de 1700 e 1630 cm^{-1} encontra-se também estiramento relacionado a C=O de aril-cetona (LOPES; FASCIO, 2004). Estes dados corroboram com os visualizados para a F.A.21-22, que também apresentou bandas em 1676 e 1641 cm^{-1} .

Figura 41 – Espectro na região do infravermelho da fração F.A.21-22.



Fonte: a autora, 2015.

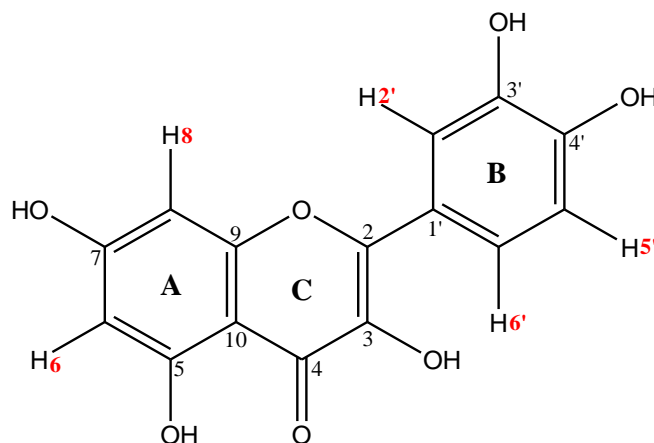
Na região do IV entre 3100 e 3000 cm^{-1} é característica de deformação axial de C–H aromático, porém estas podem estar sobrepostas com a banda larga da hidroxila, por isto não foram definidas para a fração F.A-21-22 (Figura 40) (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

No espectro de IV para a fração F.A-21-22 foram observadas várias bandas intensas na região entre 1500 e 1000 cm^{-1} (Figura 40), entretanto nesta região ocorrem absorções fortes de muitas deformações, como por exemplo, vibrações no plano de dobramento C–H de aromáticos. Assim como, vibrações do dobramento de C–O–H de fenóis, que aparece como pico largo e fraco em 1440 e 1220 cm^{-1} , por isto estas regiões de sobreposição dos sinais, são pouco úteis para interpretação do espectro (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

O espectro de RMN ^1H da F.A-21-22 (Tabela 16 e Figura 41) foi comparado com dados da literatura (BILIA et al., 1996) para o flavonoide quercetina [2-(3',4'-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicromen-4-ona] (CZEPAS; GWOZDINSKI, 2014), e apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos: δ_{H8} 6,39 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H) e δ_{H6} 6,18 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H) localizados no anel A, que encontram-se mais desblindados quando comparados aos localizados nos anel B, em função do padrão de substituição do anel A.

Os sinais de hidrogênios localizados no anel B foram observados em $\delta_{H2'}$ de 7,74 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H); $\delta_{H5'}$ 6,89 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H) e $\delta_{H6'}$ 7,64 (dd, $J = 8,5; 2,1$ Hz, 1H). Todos são hidrogênios metínicos aromáticos (Tabela 16 e Figura 41).

Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz, Metanol- d_4) para a fração F.A-21-22, comparados com valores descritos na literatura para quercetina, demonstrada abaixo.

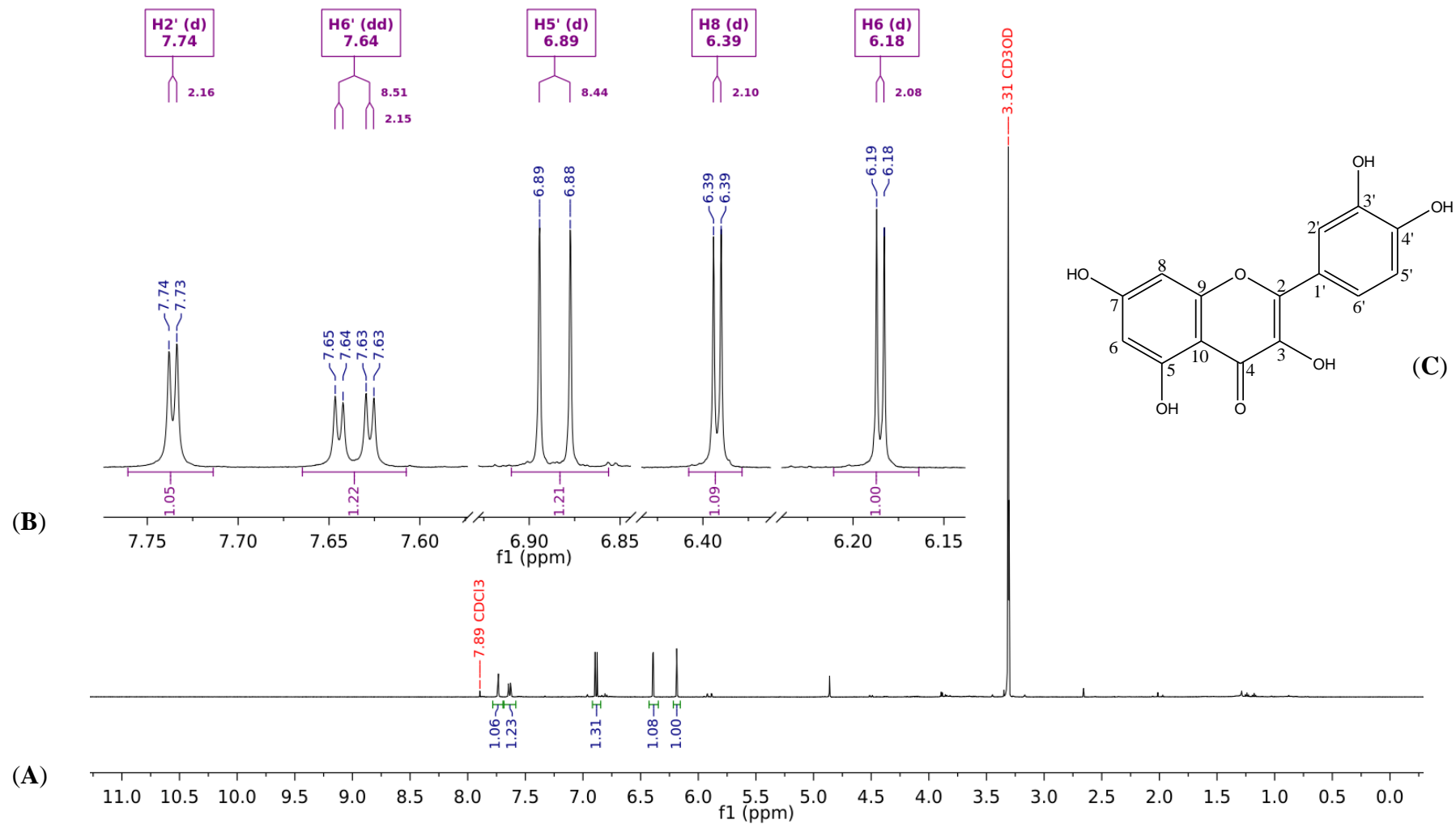


Hidrogênio	F.A-21-22 δ_{H}^*	Quercetina ¹ δ_{H}^*
8	6,39 (d, $J = 2,1$; 1H)	6,45 (d, $J = 2,2$; 1H)
2'	7,74 (d, $J = 2,1$; 1H)	7,40 (m)**
5'	6,89 (d, $J = 8,5$; 1H)	6,90 (d, $J = 9,0$; 1H)
6'	7,64 (dd, $J = 8,5; 2,1$; 1H)	7,40 (m)**
6	6,18 (d, $J = 2,1$; 1H)	6,21 (d, $J = 2,2$; 1H)

*Deslocamentos químicos em ppm (δ_{H}) com referência ao sinal residual do metanol- d_4 e constantes de acoplamento (J , entre parênteses) em Hz. ¹Bilia et al. (1996). **Nos dados de Bilia et al. (1996), os sinais dos hidrogênios 2' e 6' se sobrepõem em um multiplete em 7,40 ppm com integração para dois hidrogênios. **Fonte:** a autora, 2015.

O espectro de RMN ^1H da F.A-21-22 (Tabela 16 e Figura 41) apresentou cinco sinais de hidrogênio que coincidem com os deslocamentos químicos dos hidrogênios descritos na literatura para a quercetina. No espectro de RMN ^1H da F.A-21-22 não foi visualizado sinais para deslocamentos relacionados a hidrogênios das hidroxilas, como o observado por Kurkin e Pravdivtseva (2007) para a quercetina, onde o hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono cabinólico 5 apresentou δ_{H} em 12,20 (s, 1H) (espectro total de RMN ^1H da F.A-21-22 até 14 ppm apresentado no anexo C).

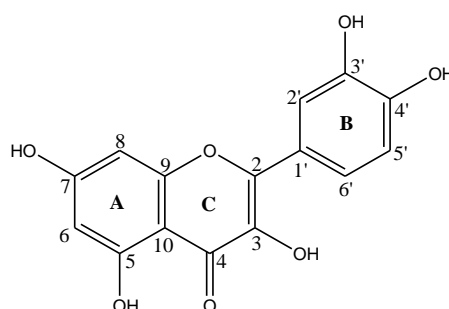
Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H da fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4) (A) espectro total, (B) expansões e (C) quercetina.



Fonte: a autora, 2015.

O espectro de RMN ^{13}C da FA.21-22 apresentou 15 sinais de carbonos (Tabela 17 e Figuras 42 e 43), correspondentes ao número de carbono presentes na forma molecular da quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) segundo dados da literatura (BILIA et al., 1996; KURKIN; PRAVDIVTSEVA, 2007).

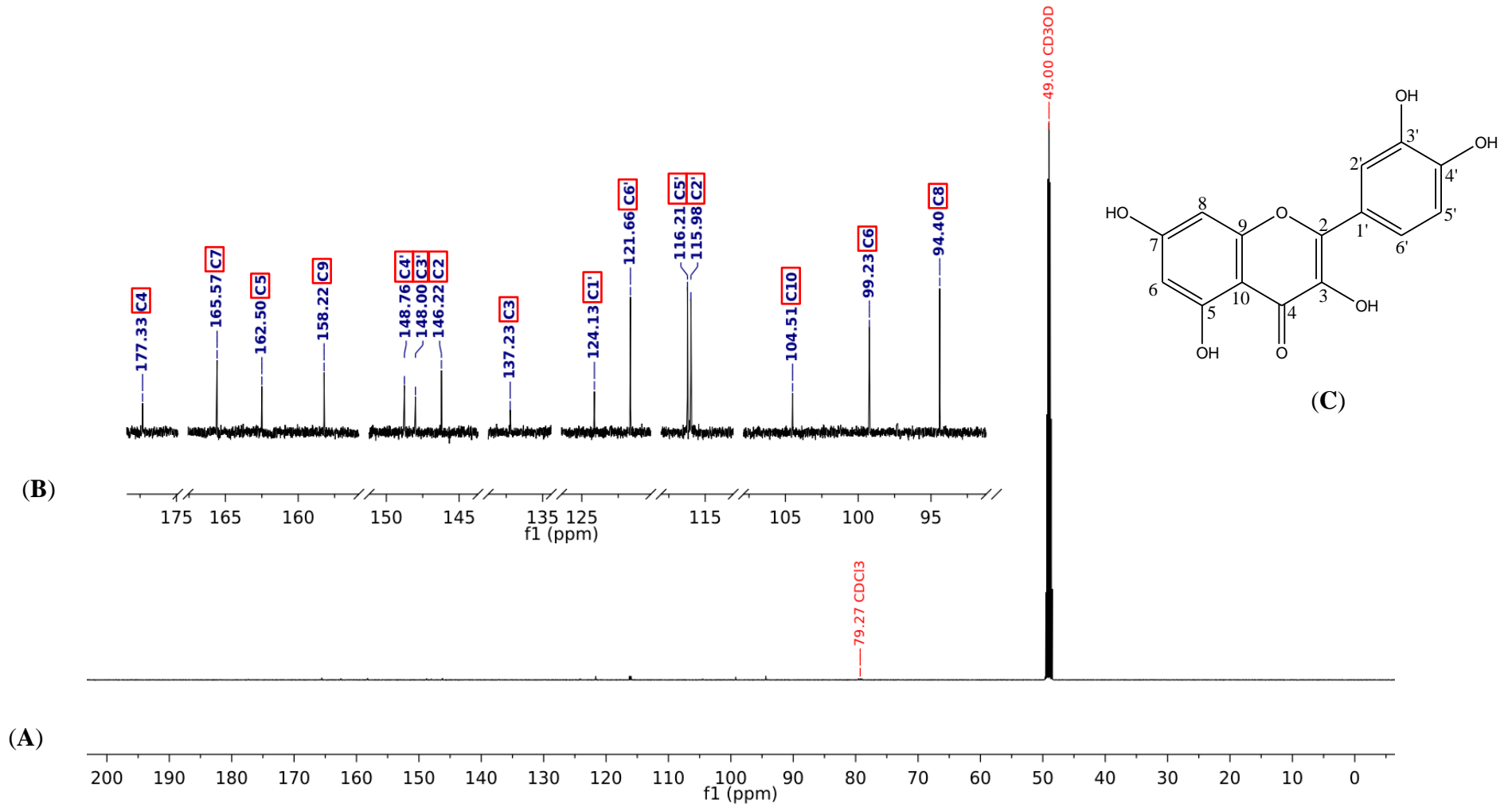
Tabela 17 - Dados de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da fração F.A-21-22 (125 MHz, Metanol- d_4), comparados com valores de deslocamentos químicos descritos na literatura para quercetina, demonstrada abaixo.



Carbono	F.A-21-22 δ_{C}^*	Quercetina ¹ δ_{C}^*
2	146,2	146,4
3	137,2	135,4
4	177,3	175,7
5	162,5	160,0
6	99,2	98,1
7	165,6	164,0
8	94,4	93,2
9	158,2	156,2
10	104,5	103,2
1'	124,1	122,3
2'	116,0	115,3
3'	148,0	145,1
4'	148,8	148,0
5'	116,2	115,7
6'	121,7	120,0

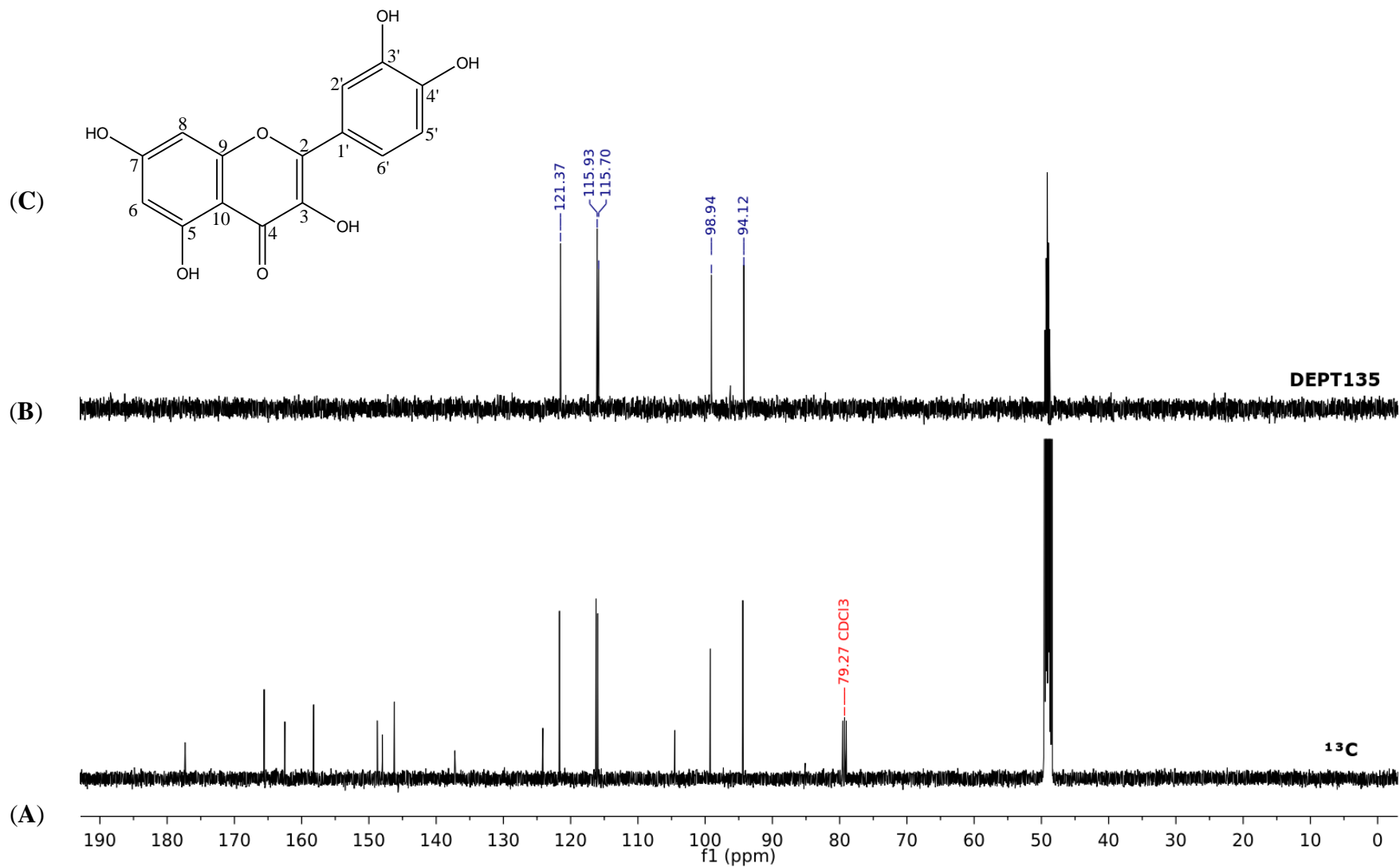
*Deslocamentos químicos em ppm (δ_{C}) com referência ao sinal residual do metanol- d_4 . ¹Bilia et al (1996). **Fonte:** a autora, 2015.

Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração F.A-21-22 (125 MHz, Metanol- d_4), (A) espectro total (B) expansões, (C) quercetina.



Fonte: a autora, 2015.

Figura 44 - Espectro de RMN de DEPT 135 da fração F.A-21-22 (125 MHz, Metanol- d_4), espectro total (A), expansões (B), quercetina (C).



Fonte: a autora, 2015.

Os carbonos 6 e 8 do anel aromático A apresentaram δ_C em 99,2 e 94,4 respectivamente, estes deslocamentos estão em região mais blindada do espectro quando comparada com os deslocamentos químicos dos demais carbonos (Tabela 17 e Figuras 42 e 43), este efeito ocorre em função da posição dos carbonos carbinólicos (C5 e C7) do anel aromático A. Posto que, a presença de hidroxilas em posição *orto* aumentam a blindagem do núcleo de carbono, diminuindo o deslocamento químico do mesmo. O padrão de substituição de substâncias aromáticas influencia diretamente nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono no espectro (SILVA; CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009; PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

O efeito de blindagem supracitado também foi observado, para o carbono quaternário C10 do anel aromático A, com δ de 104,5 devido à presença da carbonila em C-4, e o carbono carbinólico C5 em *orto*, assim como o carbono C9 ligado à função éter. Estas características relacionadas à blindagem pela presença da hidroxila em *orto*, também foi observada para o carbono C5' ($\delta_C = 116,2$) e C2' ($\delta_C = 116,0$) quando comparada ao carbono C6' ($\delta_C = 121,7$), no anel aromático B (Tabela 17).

Os espectros bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC, foram úteis para confirmação da estrutura da substância presente na fração F.A-21-22.

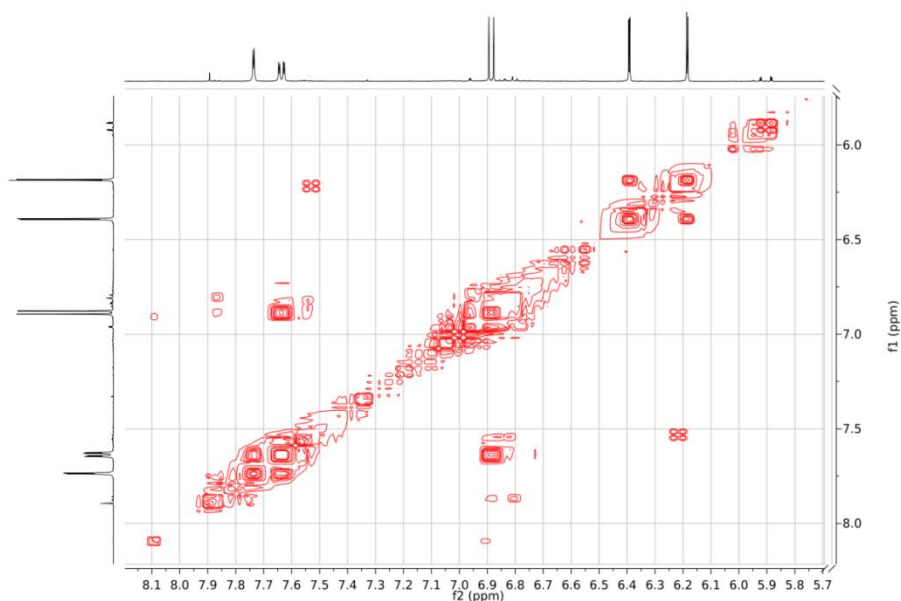
No mapa de contornos COSY (Figura 44) foi observado correlações dos hidrogênios metínicos do anel aromático B, onde o hidrogênio H_{5'} ($\delta_H = 6,89$) correlaciona com o hidrogênio H_{6'} ($\delta_H = 7,64$), este por sua vez correlaciona com o H_{2'} ($\delta_H = 7,74$). No anel aromático A observou-se correlação entre os hidrogênios metínicos H₆ ($\delta_H = 6,18$) e H₈ ($\delta_H = 6,39$).

O mapa de contornos HMBC (Figura 45), apresentou a correlação do hidrogênio 8 ($\delta = 6,39$) com o carbono metínico (C6) em δ de 99,2 e deste hidrogênio (H8) com o carbono quaternário C10 ($\delta_C = 104,5$) e C9 ($\delta_C = 158,2$), além da correlação com o carbono carbinólico C7 ($\delta_C = 165,6$). O hidrogênio 6 ($\delta = 6,18$) mostrou correlação com o carbono metínico C8 ($\delta_C = 94,4$), com o carbono quaternário C10 ($\delta_C = 104,5$) e com os carbonos carbinólicos C5 ($\delta_C = 162,5$) e C7 ($\delta_C = 165,6$). Confirmando as atribuições sugeridas para os átomos de hidrogênios e carbonos do anel aromático A para a estrutura da quercetina (Tabelas 16 e 17). Da mesma maneira as correlações dos carbonos e hidrogênios atribuídas para o anel aromático B (Tabelas 16 e 17) foram confirmadas pelo HMBC.

As correlações descritas acima também foram constatadas no mapa de contorno HSQC (Figura 46) que apresentou correlação entre o carbono metínico (C2') com δ em 116,0 e o

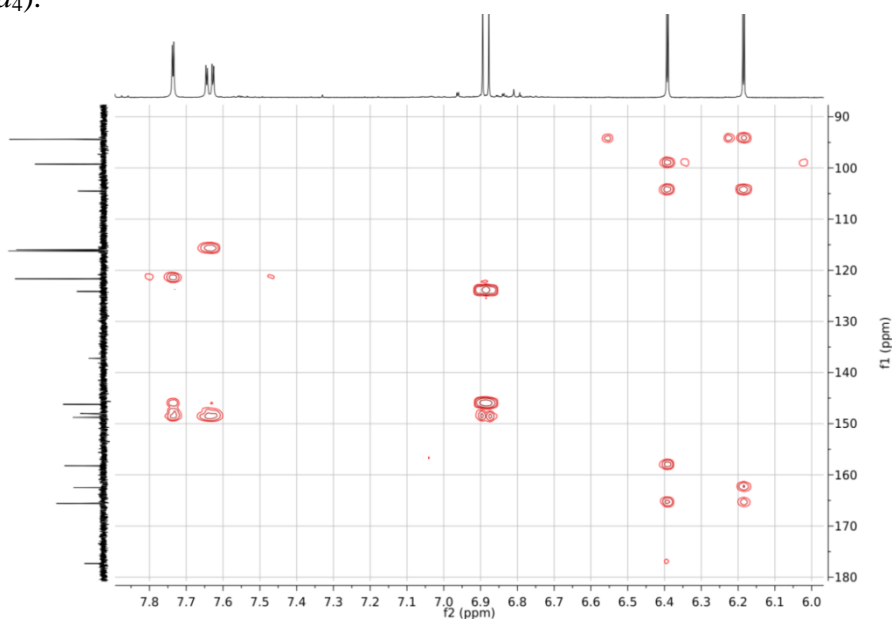
hidrogênio com δ em 7,74. Assim como, os carbonos metínicos C5' e C6' com δ de 116,2 e 121,2 respectivamente, correlacionando com os hidrogênios de δ em 6,89 e 7,64 respectivamente, justificando a posição destes no anel aromático B da quercetina (Tabelas 16 e 17). Os carbonos metínicos C6 e C8 também apresentaram correlações que confirmaram suas posições no anel aromático A da quercetina (Tabelas 16 e 17).

Figura 45 - Mapa de contornos COSY expandido* para a fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4).



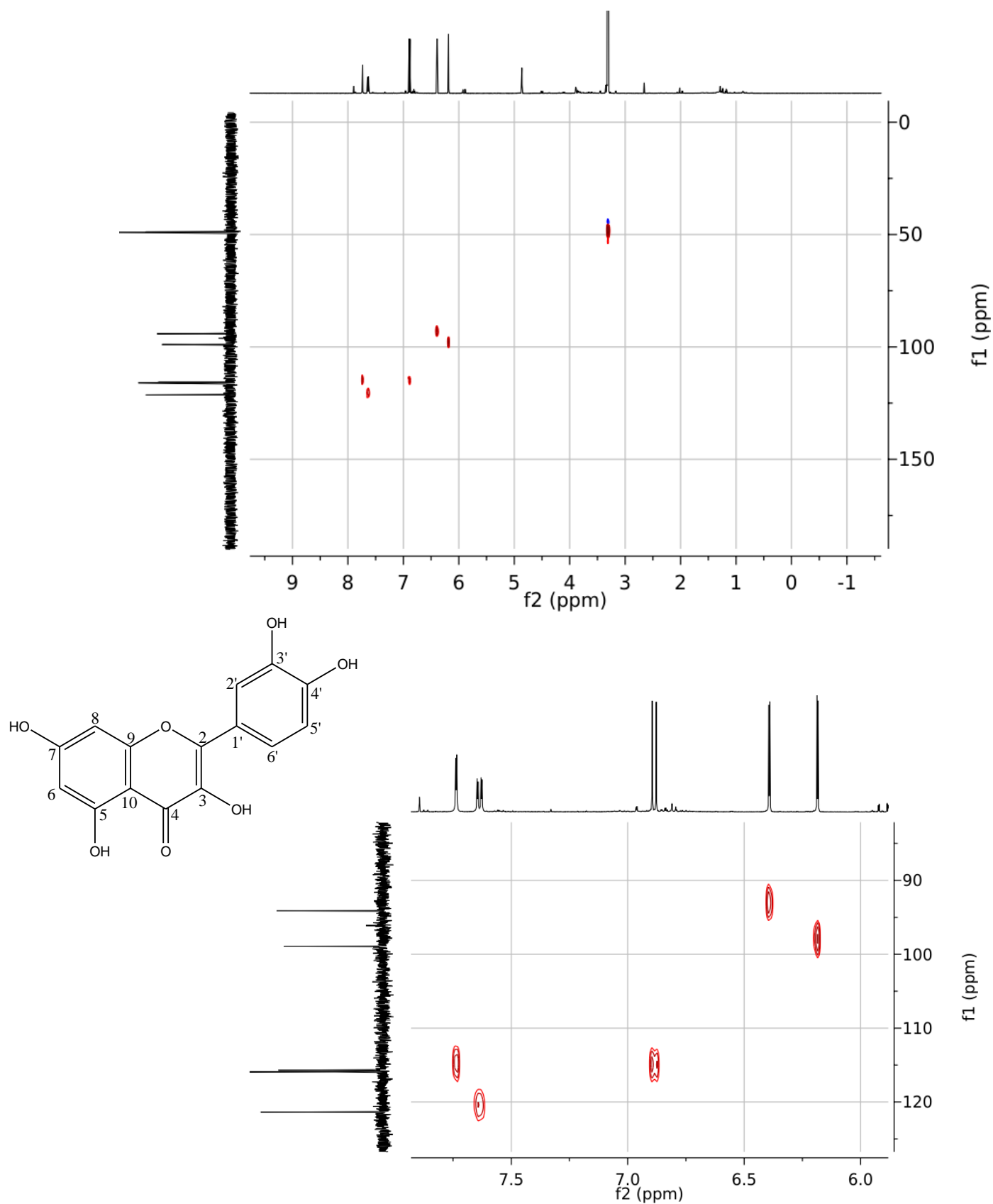
* Mapa de contorno COSY total apresentado no Anexo C. **Fonte:** a autora, 2015.

Figura 46 - Mapa de contornos HMBC expandido* da fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4).



* Mapa de contorno HMBC total no Anexo C. **Fonte:** a autora, 2015.

Figura 47 - Mapa de contornos HSQC da fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4) (A) mapa total (B) expansão (C) quercetina.



Fonte: a autora, 2015.

Baseado na interpretação dos espectros de IV, RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC, em comparação com os dados obtidos na literatura (Tabelas 16 e 17), pode-se sugerir para a fração F.A-21-22 a presença da substância quercetina, um metabólito secundário da classe dos flavonoides. A partir de agora no texto, a F.A21-22 será denominada de quercetina.

De acordo com dados da literatura para a espécie *A. macrocarpon*, o flavonoide rutina (quercetina-3-rutinosídeo) foi isolado das folhas desta planta por Bannwart et al. (2013a; 2013b) e a atividade antioxidante do extrato seco atomizado da casca do caule de *A. macrocarpon* avaliada por Azevedo (2013), esta ação pode estar relacionada com a presença da quercetina.

5.8 - Avaliação do Efeito Antileishmania *in vitro* da Quercetina em Combinação com Anfotericina B (Q+A) e Miltefosina (Q+M).

A quercetina (item 5.7), substância presente na fração FA.21-22, foi isolada da fração acetato de etila, fracionada do extrato bruto da casca do caule de *A. macrocarpon* e submetida a avaliação da atividade antileishmania neste estudo.

Esta substância é um flavonoide de ampla distribuição na natureza, encontrada em várias famílias de plantas superiores e presente em muitos vegetais e frutas. Possui ação antioxidante e um vasto espectro de atividade biológica, como por exemplo, ação anticancerígena, imunomoduladora e na prevenção de doenças cardiovasculares (MANJOLIN et al., 2013). Por isto, a quercetina, juntamente com os seus análogos estruturais, vem sendo amplamente estudada sob o ponto de vista químico e biológico, seja isoladamente ou no fitocomplexo.

A ação antileishmania da quercetina já foi relatada previamente por Fonseca-Silva et al. (2011 e 2013) que demonstraram a atividade da quercetina sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

Outros trabalhos sobre plantas medicinais que avaliam a atividade antileishmania também concluíram a efetividade da quercetina sobre as formas evolutivas de *L. amazonensis*, seja a quercetina aglicona ou ligada a heterosídeos.

Recentemente, Lima et al. (2015) avaliaram a atividade antileishmania e antitripanosoma de substâncias fenólicas isoladas da espécie *Calea uniflora* Less., e descreveram a presença da quercetina 3-*O*-glicopiranosil como ativa, entre outros flavonoides. Além disso, o mecanismo de ação da quercetina tem sido vastamente investigado em especial sobre as formas evolutivas de *Leishmania* spp. Nesse sentido, alguns estudos descrevem o

mecanismo de ação da quercetina envolvendo a arginase, uma enzima essencial para proliferação celular em *L. amazonensis* como o descrito por Silva, Maquiaveli e Magalhães (2012).

Portanto, este estudo visou à exploração do efeito da combinação desse flavonoide com fármacos utilizados para o tratamento de leishmanioses, como a anfotericina B e a miltefosina.

5.8.1 - Atividade Antiproliferativa Frente às Formas Promastigotas e Amastigotas Intracelulares de *L. amazonensis* e Efeito Citotóxico da Quercetina, Anfotericina B e Miltefosina Isoladamente.

De acordo com a Tabela 18, é possível verificar a atividade da quercetina presente na F.A21-22, assim como da anfotericina B e miltefosina isoladamente sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, e sobre macrófagos da linhagem J774-A1. Foram demonstrados os índices de seletividades (IS) destes fármacos, em relação aos valores de CI_{50} com os valores de CC_{50} de cada substância (Tabela 18).

Tabela 18 - Atividade antiproliferativa sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, efeito citotóxico sobre macrófagos J774-A1 e índice de seletividade (IS) da Quercetina, Anfotericina B e Miltefosina.

Amostras	Macrófago J774-A1 CC_{50} (μ M)	Promastigota CI_{50} e CI_{90} (μ M)	IS $CC_{50}/$ CI_{50}	Amastigota Intracelular CI_{50} e CI_{90} (μ M)	IS $CC_{50}/$ CI_{50}
Quercetina	$287,98 \pm 5,13$	$CI_{50}: 61,93 \pm 1,36$ $CI_{90}: 175,16 \pm 2,06$	4,65	$CI_{50}: 63,86 \pm 3,25$ $CI_{90}: NR$	4,51
Anfotericina B	$3,43 \pm 0,74$	$CI_{50}: 0,096 \pm 0,01$ $CI_{90}: 0,486 \pm 0,08$	35,70	$CI_{50}: 0,61 \pm 0,01$ $CI_{90}: NR$	5,62
Miltefosina	$41,35 \pm 0,44$	$CI_{50}: 21,63 \pm 0,14$ $CI_{90}: 39,41 \pm 1,73$	1,91	$CI_{50}: 2,45 \pm 0,38$ $CI_{90}: NR$	27,02

NR: não realizado. **Fonte:** a autora, 2015.

A partir da análise da Tabela 18, é possível concluir que a quercetina apresentou um perfil intermediário em relação à seletividade contra o parasito quando, comparada às outras substâncias testadas. Muitos estudos relatam a atividade contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de espécies de *Leishmania* spp., após tratamento com a quercetina, demonstrando seu potencial antileishmania (MITTRA et al., 2000; CAMACHO et al., 2002; TALEB-CONTINI et al., 2004; TASDEMIR et al., 2006; VILA-NOVA et al., 2012; DAS et al., 2013; LAGE et al., 2013; MONTRIEUX et al., 2014; LIMA et al., 2015).

Além da quercetina, outros polifenóis, como o resveratrol apresentam atividade antileishmania interessante, demonstrando a importância desse grupo de metabólitos secundários na investigação de agentes antiparasitários (FERREIRA et al., 2014).

Os resultados da anfotericina B demonstraram melhor atividade sobre promastigotas, quando comparada às amastigotas intracelulares. Valores semelhantes em relação à atividade antileishmania e citotoxicidade sobre macrófagos J774-A1 foram encontrados por Kaplum (2014), com CI_{50} de $0,06 \pm 0,0 \mu M$ e $0,42 \pm 0,08 \mu M$ e IS de 61,6 e 8,8 sobre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, respectivamente.

Vários outros estudos relataram valores semelhantes para CI_{50} e CC_{50} da anfotericina B, contra formas evolutivas de *Leishmania* spp., corroborando sobre a potência de ação deste fármaco sobre estes parasitos (SAHA; MUKHERJEE e BHADURI, 1986; CORRAL et al., 2014; PAAPE, et al., 2014; TRICONI et al., 2014).

De acordo com a Tabela 18, é possível observar que o IS da miltefosina foi mais apropriado para as formas amastigotas, quando comparado ao obtido para promastigota.

Assim como ocorre para anfotericina B, a miltefosina também apresenta muitos estudos contra as formas evolutivas de *Leishmania* spp., com resultados semelhantes ao apresentado na Tabela 18. Estudos recentes descreveram sobre a atividade da miltefosina contra *Leishmania* sp. e relataram a eficácia desta substância em especial sobre as formas amastigotas (COELHO et al. 2014; PAAPE et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; KAUR et al., 2015).

5.8.2 - Atividade Antiproliferativa Frente às Formas Promastigotas e Amastigotas Intracelulares de *L. amazonensis* e Efeito Citotóxico da Combinação de Quercetina com Anfotericina B e Miltefosina.

Os resultados descritos na Tabela 19 demonstraram a atividade sobre formas promastigotas, amastigotas intracelulares, macrófagos J774-A1 e eritrócitos humanos da combinação da quercetina com a anfotericina B (Q+A) e da quercetina com a miltefosina (Q+M). Os valores foram expressos com base no cálculo do índice de combinação (Ic) (item 4.2.2.12). De maneira geral, os dados obtidos para as combinações Q+A e Q+M demonstraram vantagens na associação destas substâncias (Tabela 19).

Tabela 19 - Atividade da combinação Q+A e Q+M sobre promastigotas, amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, macrófagos J774-A1 e eritrócitos humanos.

Atividade realizada	Combinação Q+A		Combinação Q+M	
	Índice Combinação (Ic)	*Perfil de Ação	Índice Combinação (Ic)	*Perfil de Ação
Promastigotas	0,36	Sinérgico	0,58	Sinérgico
Amastigotas Intracelulares	0,20	Sinérgico	0,48	Sinérgico
Macrófagos J774-A1	1,6	Antagônico	3,12	Antagônico
Eritrócitos Humanos	> 1,00	Antagônico	> 1,00	Antagônico

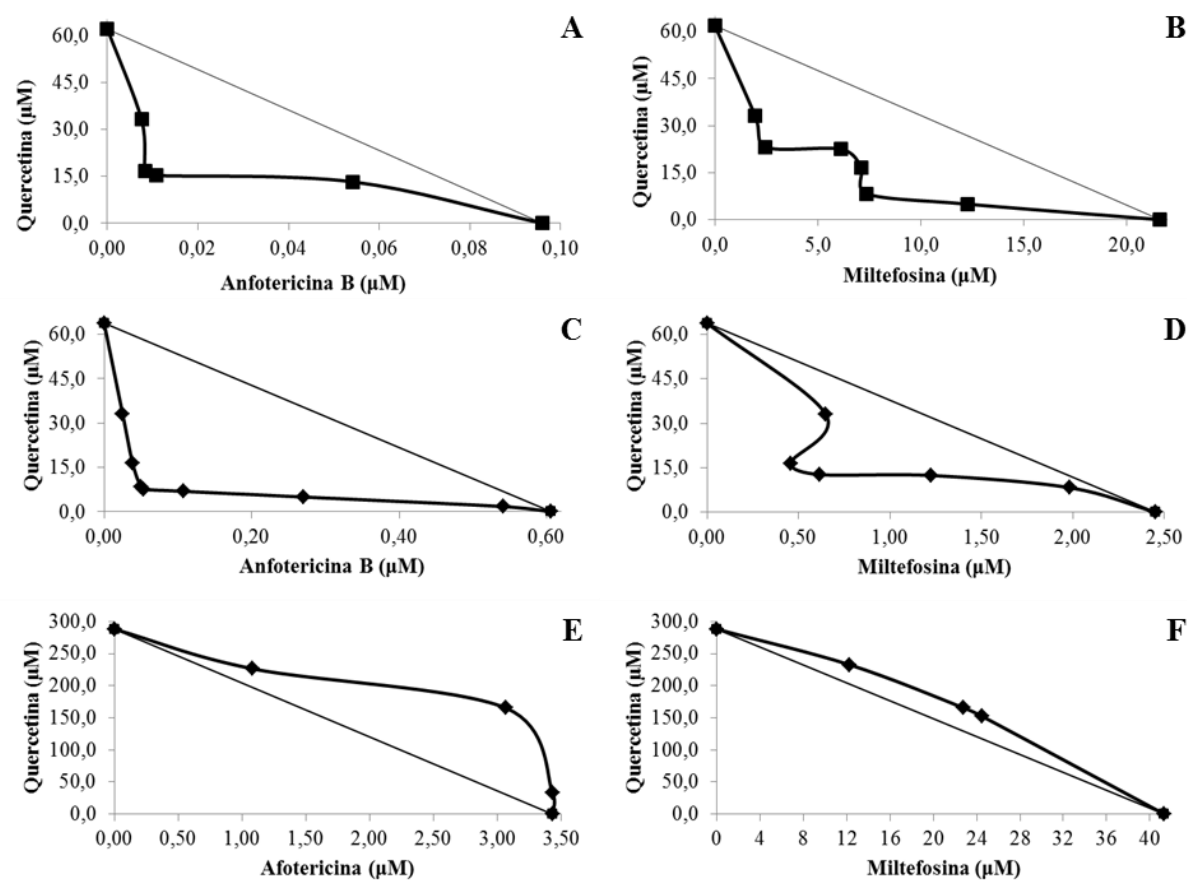
* O perfil de ação foi designado como sinérgico se $Ic < 1$, aditivo se $Ic = 1$ e antagônico se $Ic > 1$ (CHOU e TALALAY, 1984; CHOU, 2010; ZHAO; AU e WIENTJES, 2010; TALLARIDA, 2012). Q+A = combinação de quercetina e anfotericina B. Q+M = combinação de quercetina e miltefosina. **Fonte:** a autora, 2015.

A associação entre Q+A apresentou um Ic de 0,36 e 0,20 sobre promastigotas e amastigotas, respectivamente, sendo este um perfil de ação sinérgico maior, daquele obtido na combinação Q+M, onde o Ic foi de 0,58 e 0,48 para promastigotas e amastigotas, respectivamente (Tabela 19).

Os valores descritos na Tabela 19, para os índices de combinação (Ic), por si só são suficientes para expressar a natureza do perfil combinatório. Contudo, para corroborar com estes resultados foram montados isobogramas (Figura 47), em que os pontos localizados abaixo da linha de tendência confirmaram o perfil sinérgico ($Ic < 1$) para as combinações Q+A e Q+M sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, assim como o perfil antagônico ($Ic > 1,00$) para as combinações Q+A e Q+M sobre a citotoxicidade em macrófagos J774-A1, evidenciado pelos pontos dispostos acima da linha de tendência (Figura 47).

O perfil de ação das combinações sobre eritrócitos humanos foi considerado antagônico para ambas as combinações (Q+A e Q+M). Apesar de ser expresso como $Ic > 1$ (Tabela 19), este não foi determinado com precisão, porque o maior valor da quercetina testado isoladamente (1000 $\mu\text{g/mL}$) não apresentou porcentagem de hemólise neste estudo. A combinação foi antagônica, pois para todas as concentrações utilizadas de quercetina e anfotericina B na combinação não foi possível calcular a CC_{50} sobre os eritrócitos humanos.

Figura 47 - Isobogramas demonstrativos dos efeitos combinatórios entre a quercetina e anfotericina B (Q+A), e a quercetina e miltefosina (Q+M).



Legenda: A-C: representaram a combinação Q+A sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, respectivamente. B-D: representaram a combinação Q+M sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, respectivamente. E-F: representaram a combinação Q+A e Q+M, respectivamente, sobre a avaliação da citotoxicidade em macrófagos J774-A1. **Fonte:** a autora, 2015.

Normalmente, os resultados do ensaio com eritrócitos são expressos em porcentagem de hemólise, e esta não deve ultrapassar 5% (HOU et al., 2008). Mas, neste caso o interessante foi mostrar que as combinações Q+A e Q+M tiveram perfis antagônicos na toxicidade sobre as hemácias, demonstrando outro parâmetro vantajoso destas combinações, por serem necessárias concentrações maiores dessas substâncias quando combinadas para causar danos à integridade da membrana dos eritrócitos.

De acordo com dados da literatura, a amenização dos efeitos hemolíticos quando se associa anfotericina B a outras substâncias torna-se interessante, pois a anemia é um dos principais efeitos colaterais da administração desse fármaco, mesmo na forma lipossomal. Por isto, análises de constituintes do sangue devem ser realizadas duas vezes por semana durante

o período de tratamento com este fármaco (EIRAS; KIRKMAN e MURRAY, 2015). Anemia normocítica normocrômica acompanhada de trombocitopenia também foi relatado como sendo o segundo efeito colateral mais significativo da anfotericina B (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Por isto, estudos da associação ou complexação da anfotericina B são continuamente realizados, como por exemplo, a complexação da anfotericina B com polímero (sal do ácido metacrílico) que exibiu baixas propriedades hemolíticas, e manteve a atividade contra amastigotas de *L. donovani* (LES et al., 2014).

Relatos da literatura descreveram sobre a ação hemolítica da miltefosina, em função desta substância atuar como um surfactante e promover a lise dos eritrócitos, liberando praticamente toda hemoglobina em uma concentração de 0,66 mM (WIEDER et al., 1999; ZHUKOVA; ROMANENKO e NIKOLAEVICH, 2010). Munoz et al. (2013) descreveram a ação da miltefosina sobre eritrócitos humanos, e concluíram que este fármaco estimula a entrada de Ca^{2+} com subsequente bloqueio e retração da membrana celular, características da morte suicida dos eritrócitos (eriptose).

Os dados relacionados à quercetina (Tabela 19) e a sua contribuição em prevenir e diminuir o processo anêmico provocado, seja pela doença em si ou por fármacos usados durante o tratamento, corrobora com os resultados encontrados neste estudo sobre a ação da quercetina sozinha ou combinada com anfotericina B ou com a miltefosina sobre eritrócitos humanos

No caso da avaliação citotóxica esperava-se que as substâncias combinadas fossem menos tóxicas sobre as células de mamíferos, do que quando avaliadas isoladamente. Para isso, a CC_{50} das amostras combinadas deveria ser maior que a CC_{50} das substâncias sozinhas, ou seja, uma concentração maior das substâncias combinadas seria necessária para provocar citotoxicidade em 50% dos macrófagos J774-A1 (Tabela 20). Assim, a citotoxicidade sobre macrófagos J774-A1 apresentou efeito antagônico para ambas as combinações. Tal perfil é considerado o mais apropriado, uma vez que é necessário um efeito sinérgico sobre os parasitos e um efeito protetivo ou antagônico sobre as células de mamíferos, diminuindo os efeitos tóxicos.

Dentre as combinações analisadas sobre os macrófagos J774-A1, o perfil antagônico foi evidenciado de forma mais intensa para a combinação Q+M (Tabela 19 e Figura 47 - F). Pode-se afirmar ainda, que a quercetina influenciou positivamente o Ic sobre os macrófagos, por apresentar citotoxicidade em concentração mais elevada quando combinada com a miltefosina (Tabelas 19 e 20).

Tabela 20 - Concentrações de quercetina, anfotericina B e miltefosina isoladas e combinadas (Q+A e Q+M) utilizadas no ensaio de citotoxicidade sobre macrófagos J774-A1.

Amostras	Macrófagos J774-A1
	CC ₅₀ (µM)
Quercetina	287,98 ± 5,13
Anfotericina B	3,43 ± 0,74
Miltefosina	41,35 ± 0,44
Q+A	Q: 122,39 A: 3,96
Q+M	Q: 593,27 M: 43,99

Legenda: Q+A: combinação de quercetina com anfotericina B, Q+M: combinação de quercetina com miltefosina, Q: quercetina, A: anfotericina B, M: miltefosina. Os resultados dos CC₅₀ das combinações Q+A e A+M foram obtidos a partir da média das diferentes concentrações combinadas de pelo menos três experimentos independentes. **Fonte:** a autora, 2015.

Relatos na literatura relacionam a atividade sobre formas evolutivas de *Leishmania* sp. a partir da combinação de quercetina, a anfotericina B e a miltefosina com outras substâncias. Neste sentido, a atividade *in vivo* da associação da anfotericina B com o tamoxifeno sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi estudada por Triconi et al. (2014). Os autores relataram uma boa resposta parasitológica e clínica desta combinação. A anfotericina B também foi estudada em associação com o resveratrol, apresentando perfil de ação sinérgico contra amastigotas de *L. amazonensis* (FERREIRA et al., 2014). Outras associações promissoras com anfotericina B foram relatadas na literatura sobre formas de *Leishmania* spp. (RIABI et al., 2013; CORRAL et al., 2014;). Até mesmo a associação da anfotericina B com a miltefosina apresentou melhoria na atividade quando avaliada sobre formas amastigotas de *L. donovani* (SEIFERT; CROFT, 2006). Recentemente, Pham et al. (2014) descreveram como vantajosa associação da anfotericina B com miltefosina quando encapsuladas em nanocomplexos lipídicos, por melhorar o perfil farmacocinético por via oral.

A atividade combinada da miltefosina também foi avaliada em vários estudos com outros fármacos e apresentou ação sinérgica sobre formas evolutivas de espécies de *Leishmania* (FARCA et al., 2012; SOUSA et al., 2014; SANTAREM et al., 2014).

Já em relação à quercetina, recentemente, Amin et al. (2015) demonstraram o efeito combinatório da associação com rutina e morina, além de antibióticos já consolidados na

terapêutica contra bactérias *Staphylococcus aureus* metilina resistente. Em todas as associações houve potencialização da atividade antibacteriana.

Estudos de associação da quercetina com outros fármacos estão relacionados com estudos farmacológicos de ação anticancerígena, devido à eficácia da quercetina sobre células tumorais e pela capacidade da ação antioxidante, contribuindo para prevenção dos efeitos danosos provocados por outros fármacos. Dentre esses estudos, pode-se citar a diminuição da proliferação de células HT-29 (células de câncer de cólon) quando associada à quercetina com resveratrol (FOLLO-MARTINEZ et al., 2013) e a inibição da migração e invasão de células KB/CRV, células de câncer oral humano resistente à vincristina. Além disso, a quercetina foi capaz de anular a resistência dessas células à vincristina (YUAN et al., 2014). Associações quimiopreventivas da quercetina com outras substâncias de origem natural, como a curcumina ou com outros quimioterápicos de uso na terapêutica, tem se mostrado eficazes (SAMUEL et al., 2012; NAIR; MALHOTRA e DHAWAN, 2015).

Embora, a quercetina seja uma substância amplamente estudada e conhecida, novas investigações sobre essa molécula associada a outros fármacos estão em constante avaliação, com exploração contínua do potencial antioxidante deste flavonoide.

Entretanto, poucos estudos relatam a ação da quercetina associada com outros fármacos para ação sobre espécies de *Leishmania*. Os estudos disponíveis na literatura exploraram a atividade da quercetina isolada ou no fitocomplexo sobre os protozoários, além da avaliação de seu mecanismo de ação. Por isto, ensaios com da quercetina foram conduzidos a fim de investigar a combinação deste flavonoide com fármacos já consagrados para o tratamento de leishmanioses. Pela primeira vez, a associação da quercetina com anfotericina B e quercetina com miltefosina foram relatados com perfil de ação sinérgico frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como a ação citotóxica antagônica sobre macrófagos de linhagem e eritrócitos humanos.

5.8.3 - Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão da Atividade da Quercetina, Anfotericina B e Miltefosina Isoladas e em Combinação Sobre Formas Promastigotas de *L. amazonensis*.

As alterações morfológicas e ultraestruturais foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, respectivamente, em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Para estas análises as promastigotas foram tratadas com as CI₅₀ e CI₉₀ da

quercetina isolada da fração acetato de etila do caule da casca de *A. macrocarpon*, e com anfotericina B e miltefosina isoladas e em combinação (Tabela 21).

Tabela 21 - Concentrações de quercetina, anfotericina B e miltefosina isoladas e combinadas (Q+A e Q+M) utilizadas no ensaio antiproliferativo de promastigotas de *L. amazonensis* para análise em microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Amostras	Promastigotas	
	CI ₅₀ (µM)	CI ₉₀ (µM)
Quercetina	61,93	175,16
Anfotericina B	0,096	0,49
Miltefosina	21,62	39,41
Q+A	Q: 15,02 A: 0,011	Q: 121,29 A: 0,43
Q+M	Q: 24,15 M: 4,12	Q: 115,80 M: 21,35

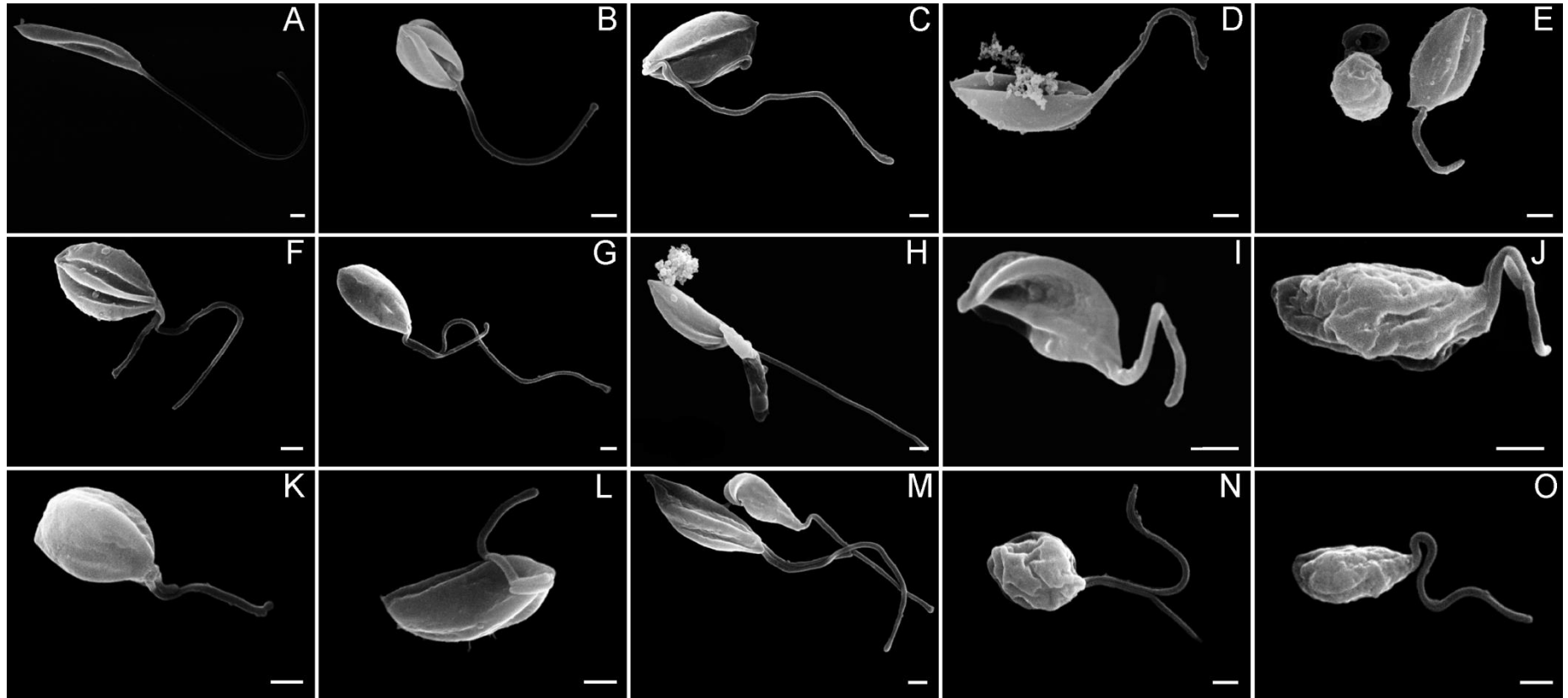
Legenda: Q+A: combinação de quercetina com anfotericina B, Q+M: combinação de quercetina com miltefosina, Q: quercetina, A: anfotericina B, M: miltefosina. **Fonte:** a autora, 2015.

As alterações morfológicas observadas por MEV proporcionaram a comparação dos parasitos tratados com não tratados (controle negativo), os quais apresentaram células com características normais, com corpo alongado, superfície celular lisa e flagelo cerca de duas vezes o tamanho do corpo, com terminação livre (Figuras 48 e 49 - A). Os parasitos tratados com diferentes concentrações de quercetina, anfotericina B e miltefosina isoladamente, ou em combinação demonstraram alterações morfológicas tanto no corpo do parasito, quanto no flagelo (Figuras - 48 e 49).

Os parasitos tratados com CI₅₀ de quercetina apresentaram arredondamento do corpo celular, com reentrâncias na superfície celular e multiplicidade de flagelos por célula (Figuras 48 e 49 - B-C). Já os parasitos tratados com CI₉₀ de quercetina demonstraram, além do arredondamento do corpo celular e aspecto rugoso da superfície celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático, devido à suposta ruptura de membrana celular (Figuras 48 e 49 - D e E).

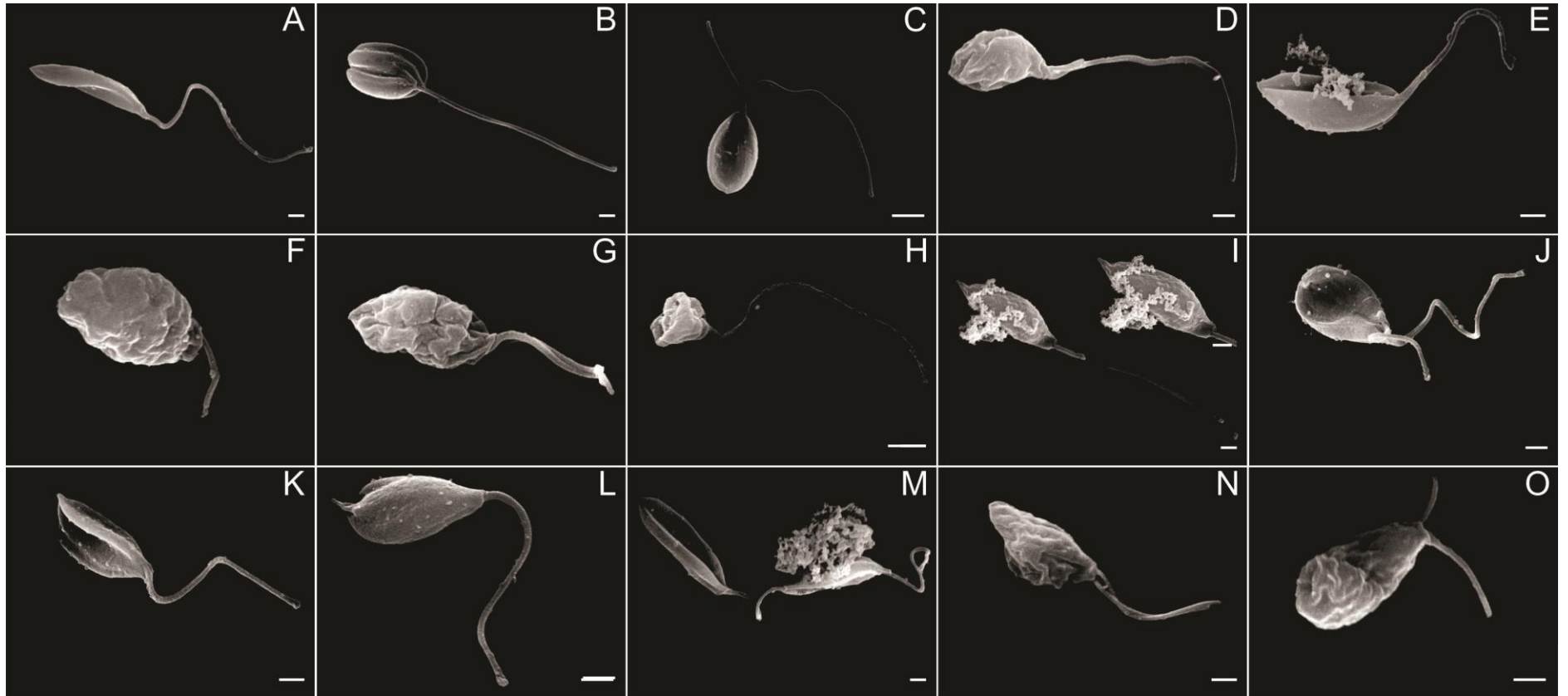
As alterações supracitadas também foram observadas por Lopes et al. (2012) que avaliaram a ação do geraniol-geraniol sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* por MEV. Santos et al. (2012), em análise por MEV das promastigotas de *L. amazonensis* observaram formas arredondadas, presença de dois flagelos e alterações na superfície celular do corpo do parasito, promovida por constituintes do óleo de copaíba.

Figura 49 - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após tratamento com quercetina, anfotericina B e combinações de Q+A.



Legenda: (A) controle; (B-C) Quercetina CI₅₀; (D-E) Quercetina CI₉₀; (F-G) Anfotericina B CI₅₀; (H-I) Anfotericina B IC₉₀; (J, K, L) CI₅₀ da combinação Q+A; (M, N, O) CI₉₀ da combinação Q+A. Barra = 1 μ m. **Fonte:** a autora, 2015.

Figura 50 - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura após tratamento com quercetina, miltefosina e combinações de Q+M.



Legenda: (A) controle; (B-C) Quercetina CI₅₀; (D-E) Quercetina CI₉₀; (F-G) Miltefosina CI₅₀; (H-I) Miltefosina CI₉₀; (J, K, L) CI₅₀ da combinação Q+M; (M, N, O) CI₉₀ da combinação Q+M. Barra = 1 μ m. **Fonte:** a autora, 2015.

A superfície celular do parasito desempenha papel importante em vários processos, como reconhecimento celular, adesão celular, regulação do crescimento celular, expressão de antígenos de superfície e receptores, como por exemplo, o lipofosfoglicano desempenha um papel importante no processo de infecção em macrófagos (SOUZA, 1995; NADERER; MCCONVILLE, 2008; SANTOS et al., 2012).

A micrografia do parasito tratado com CI_{50} da anfotericina B demonstrou aspecto arredondado do corpo celular, com formação de sulcos (reentrâncias) (Figura 48 - F), bem como a presença de dois flagelos (Figura 48 - F-G). As formas promastigotas tratadas com a IC_{90} da anfotericina B apresentaram ainda, extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 48 - H), protuberâncias e encurtamento flagelar (Figura 48 - I).

A amostra tratada com CI_{50} da combinação Q+A apresentou características semelhantes àquelas observadas nos parasitos tratados com a CI_{50} da quercetina e anfotericina B isoladamente. Foram verificados o arredondamento do corpo celular e encurtamento do flagelo (Figura 48 - K e L), enquanto na micrografia J (Figura 48) foi observada a presença de reentrâncias ou invaginações do corpo celular e de presença de dois flagelos curtos por parasito (Figura 48 - J, K, L).

Para os parasitos tratados com CI_{90} da combinação Q+A, as alterações foram às mesmas descritas anteriormente para a CI_{50} , porém foi observado um número maior de células com alterações no corpo celular, como visualizado nas células em destaque nas micrografias M, N e O (Figura 48).

As alterações morfológicas observadas nos parasitos tratados com a CI_{50} da miltefosina isolada demonstraram células com corpo celular arredondado, com aspecto bastante enrugado, com sulcos e dois flagelos por parasito (Figura 49 - F-G).

Para as células tratadas com a CI_{90} da miltefosina as alterações observadas no parasito foram mais pronunciadas, com diminuição do tamanho do corpo celular e reentrâncias ou invaginações na superfície da célula. Também foram observados parasitos com o corpo celular alterado e sinais de extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 49 - H-I).

Os parasitos tratados com CI_{50} da combinação Q+M apresentaram morfologia menos alteradas quando comparado aos tratados com a CI_{50} e CI_{90} da miltefosina sozinha. Essa amenização das alterações pode ser devido à menor concentração requerida da miltefosina para inibir 50% do crescimento de promastigotas quando combinada à quercetina. Pode-se dizer, ainda, que a quercetina potencializa a atividade da miltefosina, o que pode ser comprovado pelo índice de combinação obtido, que caracterizou efeito sinérgico.

Sobre a micrografia J (Figura 49), foi observada a presença de uma célula aparentemente após fissão binária em que não houve completa citocinese.

Os parasitos tratados com a CI_{90} da combinação Q+M destacaram-se por apresentar alterações pronunciadas no corpo celular do parasito com características relacionadas à alteração da superfície das células, com aspecto enrugado e/ou com formação de sulcos, a presença de dois flagelos por parasito, e também, células com suposta ruptura, sugerida a presença de conteúdo citoplasmático na superfície da célula (Figura 49 - M, N, O).

Embora as alterações morfológicas se assemelhem em ambas as combinações ou mesmo quando as substâncias foram testadas isoladamente, é fato que os danos observados na morfologia do parasito e visualizadas na MEV evidenciaram uma resposta do parasito frente às substâncias utilizadas, o que corrobora a continuidade dos estudos, a fim de averiguar quais são as principais organelas estruturais alteradas para a sugestão de um tipo de morte celular predominante. Por essa razão, as promastigotas também foram visualizadas por MET.

As alterações ultraestruturais das promastigotas de *L. amazonensis* tratadas ou não com a quercetina, anfotericina B e miltefosina isoladas e combinadas foram obtidas por MET e demonstraram alterações celulares importantes (Figuras 50 e 51).

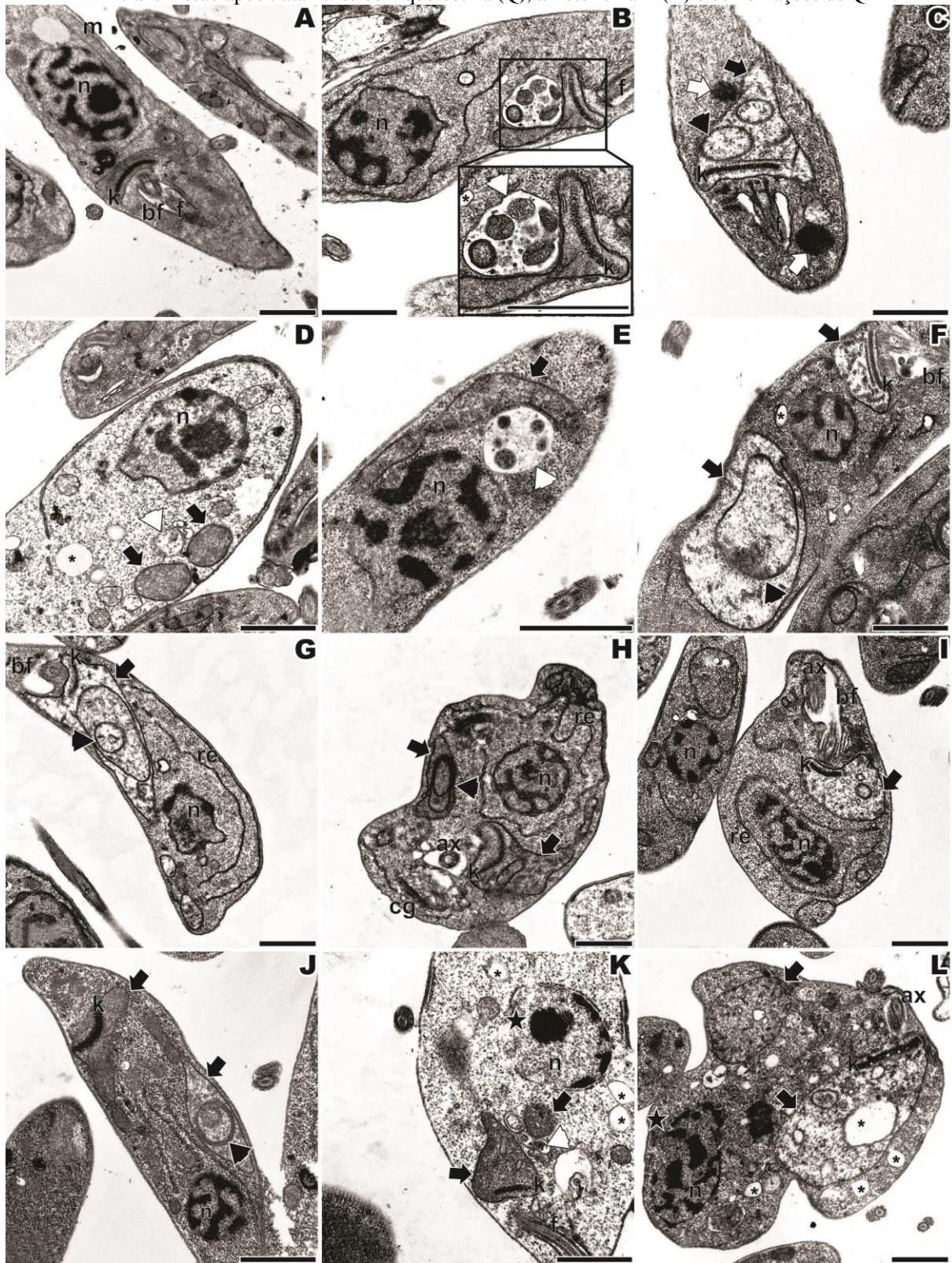
As formas promastigotas não tratadas apresentaram características ultraestruturais típicas de células normais, como presença de núcleo, mitocôndria única que se estende ao longo do corpo do parasito e contém cristas bem definidas, cinetoplasto com DNA condensado, bolsa flagelar e normalmente flagelo alongado e único (Figuras 50 e 51 - A).

A micrografia da quercetina sozinha (CI_{50}) demonstrou a presença de vacúolo autofágico (Figura 51 - B). Já os parasitos tratados com a CI_{90} da quercetina apresentaram mitocôndria inchada com presença de membranas concêntricas no seu interior, estruturas semelhantes a corpos lipídicos e presença de vacúolos citoplasmáticos (Figura 50 - B, C, D).

As alterações observadas para as células tratadas com CI_{50} e CI_{90} da anfotericina B sozinha foram semelhantes às observadas para as tratadas com a CI_{50} e CI_{90} da quercetina sozinha, apresentando mitocôndria inchada com membranas concêntricas, e presença de vacúolo autofágico (autofagossoma) (Figura 50 - E, F, G, H).

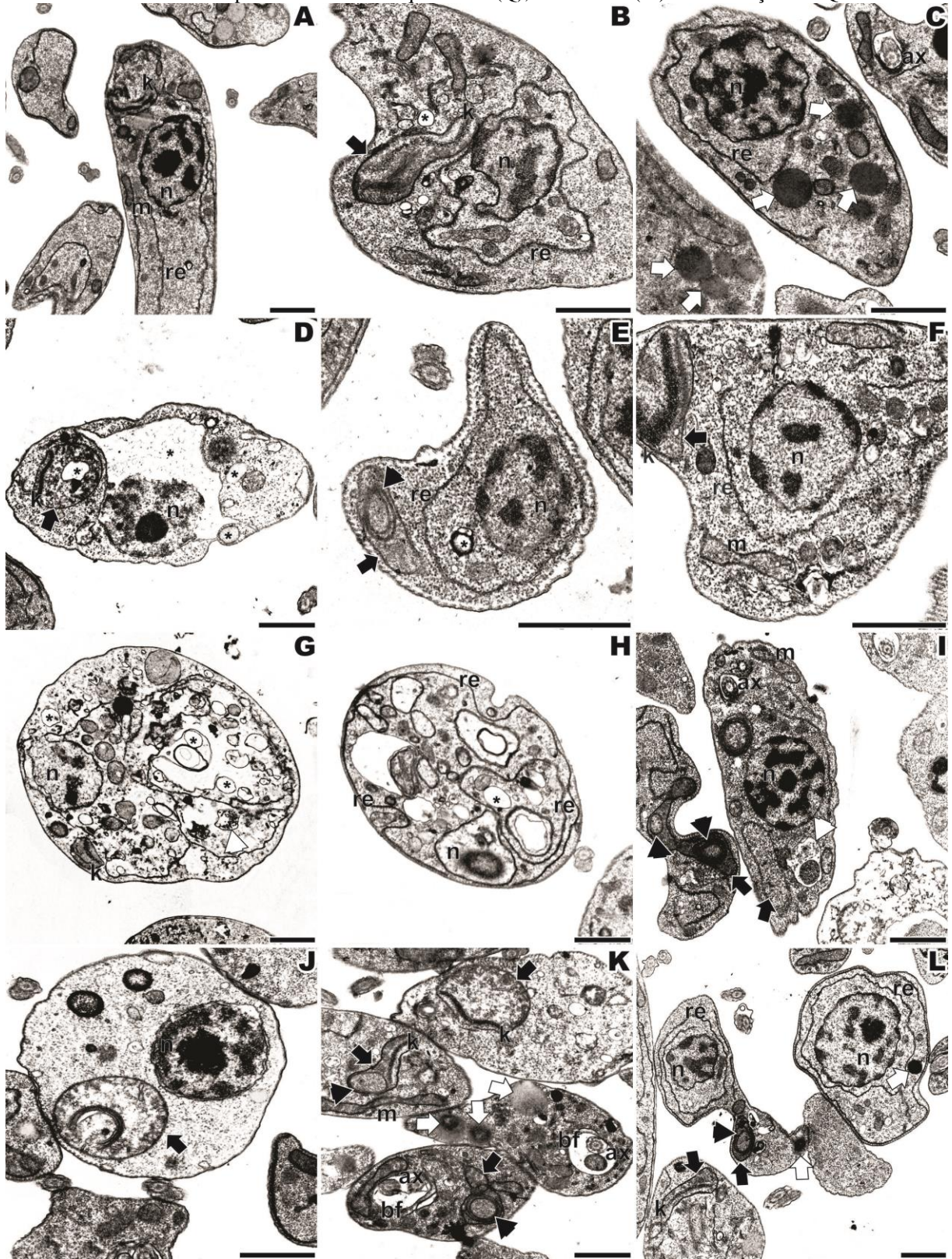
As ultraestruturas celulares tratadas com a CI_{50} da combinação Q+A também apresentaram mitocôndria aumentada de tamanho, com membranas concêntricas no seu interior (Figura 50 - I, J). Para os parasitos tratados com a CI_{90} da combinação Q+A, houve um aumento na presença de vacúolos citoplasmáticos quando comparado aos tratados com a CI_{50} da combinação Q+A. A imagem K apresentou sinais de ruptura da membrana nuclear, (Figura 50 - K, L).

Figura 51 - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* obtidas por microscopia eletrônica de transmissão após tratamento com quercetina (Q), anfotericina B (A) e combinações de Q+A.



Legenda: (A) controle (parasitos não tratados) com ultraestrutura normal; (B) Quercetina CI₅₀; (C-D) Quercetina CI₉₀; (E-F) Anfotericina B CI₅₀; (G-H) Anfotericina B CI₉₀; (I-J) CI₅₀ da combinação Q+A; (K-L) CI₉₀ da combinação Q+A. Alterações ultraestruturais foram indicadas como: setas pretas: mitocôndria inchada; setas brancas: aparência de corpos lipídicos; cabeça de seta preta: membranas concêntricas dentro da mitocôndria; cabeça de seta branca: vacúolos autofágicos; asteriscos preto: vacúolos citoplasmáticos; estrela preta: região de ruptura da membrana nuclear. Outras designações: (ax) axonema, (n) núcleo; (m) mitocôndria; (k) cinetoplasto; (f) flagelo; (bf) bolsa flagelar; (re) retículo endoplasmático; (cg) complexo de Golgi. Barra = 1 μm. **Fonte:** a autora, 2015.

Figura 52 - Micrografias de formas promastigotas de *L. amazonensis* obtidas por microscopia eletrônica de transmissão após tratamento com quercetina (Q), miltefosina (M) e combinações de Q+M.



Legenda: (A) controle (parasitos não tratados) com ultraestrutura normal; (B) Quercetina CI_{50} ; (C-D) Quercetina CI_{90} ; (E-F) Miltefosina CI_{50} ; (G-H) Miltefosina CI_{90} ; (I-J) CI_{50} da combinação Q+M; (K-L) CI_{90} da combinação Q+M. Alterações ultraestruturais foram indicadas como: setas pretas: mitocôndria inchada; setas brancas: aparência de corpos lipídicos; cabeça de seta preta: membranas concêntricas dentro da mitocôndria; cabeça de seta branca: vacúolos autofágicos; asteriscos preto: vacúolos citoplasmáticos. Outras designações: (n) núcleo; (m) mitocôndria; (k) cinetoplasto; (f) flagelo; (bf) bolsa flagelar; (ax) axonema; (re) retículo endoplasmático; (cg) complexo de Golgi. Barra = 1 μ m. **Fonte:** a autora, 2015.

As alterações ultraestruturais visualizadas na MET para a quercetina sozinha (CI₅₀ e CI₉₀) na Figura 51 foram semelhantes ao visualizado anteriormente na Figura 50.

As células tratadas com miltefosina sozinha (CI₅₀) apresentaram presença de vacúolos e desorganização no citoplasma, mitocôndria inchada com membranas concêntricas (Figura 51 - E, F). Para os parasitos tratados com a CI₉₀ da miltefosina sozinha, o grau de desordem celular foi maior, ou seja, presença de citoplasma com extravasamento de conteúdo celular, ruptura de membrana nuclear, vários vacúolos citoplasmáticos e autofágicos (Figura 51 - G, H).

Na combinação Q+M, tanto para as células tratadas com a CI₅₀, quanto para as tratadas com a CI₉₀, as alterações reproduziram as mesmas visualizadas nas células tratadas com as substâncias sozinhas, como mitocôndria inchada com membranas concêntricas no interior, vacúolos citoplasmáticos e autofágicos, células extraídas (Figura 51 - I, J, k, L).

O uso da microscopia eletrônica como ferramenta para a elucidação de alterações celulares é útil por revelar aspectos sugestivos dos possíveis alvos de ação dos fármacos. Neste estudo, as micrografias obtidas por MEV e MET contribuíram com os resultados obtidos nos ensaios antiproliferativos.

A compreensão da organização, função e composição das estruturas morfológicas e ultraestruturais são determinantes na patogenia dos protozoários. As tripomastigotas de *T. cruzi*, por exemplo, são células vastamente estudadas por microscopia eletrônica, bem como as diferentes espécies de *Leishmania* (SOUZA, 2007; SOUZA et al., 2008a).

Especificamente em espécies de *Leishmania*, os relatos sobre a ação da quercetina focam alvos terapêuticos em que, este flavonoide atuou sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Foi detectado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos infectados e também, sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, que levou a perda do potencial de membrana mitocondrial e causou a morte do parasito (FONSECA-SILVA et al., 2011 e 2013).

Segundo Fonseca-Silva et al. (2011 e 2013) a quercetina age sobre as células do parasito como pró-oxidante, por induzir a produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e outras EROs. Além disso, induz a despolarização da membrana mitocondrial de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Esta observação contribui para os achados por MET nas micrografias B e C das Figuras 50 e 51, respectivamente, sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, tratadas com CI₅₀ da quercetina sozinha (61,93 µM), onde se verificou alteração na mitocôndria.

Tasdemir et al. (2006) compararam flavonoides análogos, entre eles a quercetina, sobre a atividade antileishmania e antitripanosoma frente a amastigotas axênica de *L. donovani* e

formas tripomastigotas de *T. brucei*, respectivamente, e verificaram a relação da estrutura versus atividade, indicando que a função cetona em C4 e a dupla ligação do carbono C3 e C4 da aglicona são essenciais para o potencial da atividade destes polifenóis, além das hidroxilas. As flavonas e flavonóis glicosilados são menos potentes que seus homólogos não glicosilados (agliconas).

A capacidade antioxidante da quercetina está relacionada com a sua capacidade em sequestrar radicais de oxigênio (radical hidróxi: OH^\bullet , ânion superóxido: $\text{O}_2^{\bullet-}$), espécies reativas com potencial de promover a peroxidação lipídica (BEHLING et al., 2004).

A explanação sobre a ação antioxidante e pró-oxidante da quercetina tem sido bem elucidada na literatura, e as mesmas características estruturais responsáveis pela ação antioxidante, à presença de hidroxilas na aglicona, são também as que causam efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos em micro-organismos e células tumorais (BEHLING et al., 2004; LAKHANPAL; RAI, 2007; FONSECA-SILVA et al., 2011 e 2013; CZEPAS; GWOZDZINZKI, 2014). Há relatos que determinadas substâncias antioxidantes agem como pró-oxidante sob determinada condição, como altas doses ou a presença de íons metálicos, como no caso de vários polifenóis (YORDI et al., 2012).

Uma das formas para o desenvolvimento de novos fármacos consiste na busca pelo modo como as substâncias ativas podem atuar no alvo celular, como enzimas chaves em rotas metabólicas do parasito.

Mitra et al. (2000) já haviam relatado a ação da quercetina *in vitro* em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. donovani*, por inibição da síntese de DNA e promovendo a linearização dos minicírculos do kDNA mediado pela topoisomerase-II. Estas alterações conduzem à morte celular por apoptose. Das et al. (2006) verificaram que a quercetina inibiu a DNA topoisomerase-I, enzima fundamental na replicação e transcrição do DNA, incluindo o DNA do cinetoplasto (kDNA).

Vila-Nova et al. (2012) demonstraram que a quercetina também é capaz de inibir a hidrólise da acetilcolina e interferir na produção da fosfatidilcolina, fosfolípido mais abundante na membrana celular de *Leishmania* spp. Segundo os autores, esta inibição ocorreu devido à diminuição da concentração da precursora colina.

As alterações ultraestruturais observadas pela MET (Figura 50 e 51) para as formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas apenas com a quercetina, de acordo com dados da literatura sugerem características de morte celular induzida por apoptose, como mitocôndria inchada, perda de conteúdo mitocondrial e alterações na disposição da cromatina no núcleo, quando comparado ao controle (Figura 51 - B e D). Como o observado na MET em estudos

realizados por Macedo-Silva et al. (2013), para ultraestruturas de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com itraconazol.

Godinho et al. (2013) relataram que as injúrias mitocondriais nos parasitos levam a uma sequência de alterações celulares, como danos oxidativos em moléculas de lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas, desestruturando de maneira geral toda a integridade celular. A não incorporação dos lipídeos para a formação de membranas leva ao acúmulo destes, formando corpos com conteúdo lipídico desordenados no interior do citoplasma. A presença de autofagossomos também foi evidenciada após tratamentos com diversos tipos de substâncias, inclusive fármacos como a miltefosina, reconhecido por induzir a morte celular por apoptose nesses parasitos. Esta evidência, bem como a presença de corpos lipídicos próximos a mitocôndria, ao retículo endoplasmático ou ao complexo de Golgi, pode ser sugestiva de biogênese ou mobilização e utilização de lipídeos, no caso dos autofagossomos, sugerindo remodelação celular intensa.

Macedo-Silva et al. (2011, 2013), assim como Godinho et al. (2013) concluíram que danos na mitocôndria em função do estresse oxidativo e presença de EROs, podem desencadear desorganização do metabolismo lipídico, com acúmulo citoplasmático anormal e possível remoção pelos autofagossomos.

Estas informações corroboram com os dados visualizados na Figura 50 - B, C e D e Figura 51 - C. As alterações induzidas pela CI_{90} (175,16 μ M) da quercetina visualizados na Figura 51 - D demonstraram destruição celular, com presença de grande vacúolo citoplasmático e extração de conteúdo citoplasmático.

A anfotericina B, por outro lado, possui como alvo celular principal o ergosterol, um esteroide presente na membrana plasmática de fungos e protozoários, como espécies do gênero *Leishmania*. Ao se ligar à membrana, essa substância produz poros, conduzindo a alterações da permeabilidade celular. A ação lítica deste fármaco também foi descrita pela interação da anfotericina B com a membrana de eritrócitos, provocando danos oxidativos (ODDS; BROWN e GOW, 2003; FILIPPIN; SOUZA, 2006; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012).

Devido a similaridades estruturais, a anfotericina B também possui afinidade sobre o colesterol presente nas membranas celulares de mamíferos. Tal afinidade é responsável pelos efeitos adversos e tóxicos sobre a medula óssea, fígado, rins e coração, amplamente relatados após a utilização desse fármaco (MILLER, 1973; ODDS; BROWN e GOW, 2003; FILIPPIN; SOUZA, 2006; ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010).

Apesar de sua eficiência, a anfotericina B é o fármaco de segunda escolha para o tratamento de leishmanioses, uma vez que apresenta severa toxicidade, baixa biodisponibilidade e relatos de cepas resistentes a esse medicamento. Contudo, a forma lipossomal da anfotericina B melhorou suas características físico-químicas, tornando-a menos tóxica, contra leishmanioses mucocutâneas e viscerais. O alto custo, entretanto, dificulta o seu uso em países em desenvolvimento, representando um fato limitante à sua utilização. (FILIPPIN; SOUZA, 2006; TIUMAN et al., 2011; BARRET; CROFT, 2012; SUNDAR et al., 2010; LES et al., 2014; EIRAS et al., 2015).

Neste estudo, as alterações morfológicas provocadas pela CI_{50} (0,096 μ M) e CI_{90} (0,49 μ M) da anfotericina B sozinha sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, foram arredondamento do corpo celular, além de sinais de extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 48). Esta última alteração pode inferir ao aspecto estrutural deste polieno, que interage com o ergosterol, formando poros aquosos que leva ao aumento da permeabilidade da membrana e morte do parasito (SINGH et al., 2013).

As micrografias visualizadas por MET para células tratadas com CI_{50} e CI_{90} da anfotericina B, apresentaram alterações semelhantes entre si, contudo, para as células tratadas com CI_{90} às desordens foram mais pronunciadas, como inchaço mitocondrial, com membranas concêntricas e perda da matriz mitocondrial (Figura 50).

A miltefosina foi o segundo fármaco selecionado para o ensaio da combinação com a quercetina neste estudo. A miltefosina, uma alquil fosfocolina (hexadecil-fosfocolina), originalmente desenvolvida para o tratamento do câncer, também descrita por apresentar atividade antifúngica, antiamebíca e antileishmania, é atualmente padronizada para o tratamento de leishmanioses em alguns países. Assim como a anfotericina B, também atua interferindo na membrana citoplasmática, mais especificamente no metabolismo dos fosfolípidios de membrana celular, alterando a composição, permeabilidade, estabilidade e fluidez, conduzindo a célula à morte celular por processos apoptóticos. A miltefosina acumula-se no interior da célula do parasito, promovendo distúrbios na biossíntese de lipídeos e disfunção mitocondrial com aumento da produção de EROs (PARIS et al., 2004; BARRET; CROFT, 2012; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; SINGH et al., 2013; CANUTO et al., 2014; SANTAREM et al., 2014).

Um aspecto favorável da utilização da miltefosina é a sua administração por via oral. Entretanto, a miltefosina não é isenta de efeitos colaterais. Entre os mais graves está o potencial teratogênico deste fármaco. A miltefosina apresenta alta taxa de cura (98%) sobre

infecções por *L. donovani*. Contudo há relatos de cepas resistentes (PARIS et al., 2004; SINGH; KUMAR e SINGH, 2012; SINGH et al., 2013; CANUTO et al., 2014).

As alterações morfológicas visualizadas por MEV sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com CI_{50} (21,62 μ M) e CI_{90} (39,41 μ M) de miltefosina evidenciaram mudanças relevantes na forma do parasito, com enrugamento do corpo celular, diminuição de tamanho, e sinais de extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 49). Estas alterações são condizentes com as observadas na MET, nas micrografias das ultraestruturas tratadas com CI_{90} da miltefosina os danos celulares foram mais intensos, houve alto grau de desorganização citoplasmática, com perda de conteúdo citoplasmático, núcleo desorganizado e vacuolização citoplasmática (Figura 51).

A indução de morte celular por apoptose foi verificada em vários estudos da miltefosina sobre espécies de *Leishmania* spp. A miltefosina promoveu fragmentação do DNA, diminuição celular e externalização da fosfatidilserina em promastigotas de *L. tropica* e *L. major* (KHADEM VATAN et al., 2011). No entanto, ainda há relatos de que o modo de ação da miltefosina como leishmanicida não está completamente compreendido, necessitando de mais estudos (COELHO et al., 2014; MOREIRA et al., 2014).

Estudos com outras espécies de *Leishmania*, como a *L. infantum* e a *L. donovani* mostram indícios de que o mecanismo de ação da miltefosina esteja relacionado a apoptose, alterações como danos a mitocôndria, encolhimento celular, fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilserina com preservação da integridade da membrana plasmática do parasito foram observadas (PARIS et al., 2004; VINCENT et al., 2014).

Cepas de *Leishmania* spp. resistentes a anfotericina B e a miltefosina apresentaram diminuição na indução de morte celular apoptótica quando exposta a estes fármacos (SAHA; MUKHERJEE e BHADURI, 1986; SHAHA, 2006; KACZANOWSKI; SAJID e REECE, 2011; MOREIRA; LEPROHON e OUELLETTE, 2011; MELOS; ECHEVARRIA, 2012; SOUSA et al., 2014).

As alterações ultraestruturais das combinações Q+A e Q+M, sugerem desordens relacionadas ao processo de morte celular por apoptose, assim como o descrito para estas substâncias isoladas. Além, dos ensaios *in vitro* realizados neste estudo para estas combinações, torna-se necessário à realização de ensaios *in vivo*, a fim de averiguar a eficácia destas combinações sobre *L. amazonensis*, bem como avaliar o perfil farmacocinético da associação, para investigar a biodisponibilidade destes fármacos combinados.

A anfotericina B e a miltefosina são fármacos já estabelecidos na terapêutica. Já a quercetina é uma substância utilizada em formulações magistrais. Portanto, a perspectiva dos

possíveis avanços nos estudos destas combinações em protozoários torna-se mais interessante, já que a combinação de fármacos liberados por órgãos competentes torna-os mais atraente para indústria farmacêutica, agilizando etapas no que concerne ao tempo para que um fármaco seja incluído na terapêutica.

Os resultados obtidos neste estudo sobre a combinação Q+A e Q+M também corroboram com as diretrizes governamentais (C.E.S.A.R., 2009; DECOMTEC, 2009; OCDE, 2013) relacionadas com a busca por inovação tecnológica para o tratamento de doenças cujos tratamentos são falhos e a cura ainda não foi descoberta, como é o caso das leishmanioses.

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

(1) Embora haja relatos etnofarmacológicos, sobre o uso de algumas espécies de *Aspidosperma* com atividade antibacteriana e antifúngica, neste estudo não se encontrou atividade significativa para os extratos e frações de *A. tomentosum*, *A. macrocarpon* e *A. pyriformium* sobre as bactérias e fungos testados. Contudo, novas avaliações podem ser realizadas, com novos extratos, frações e substâncias purificadas por biomonitoramento e apresentar resultados diferenciados sobre os mesmos micro-organismos ou outros patógenos.

(2) A atividade antileishmania dos extratos de *A. macrocarpon*, *A. tomentosum* e *A. pyriformium* realizada sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, mostrou que o extrato do fruto de *A. pyriformium* foi o mais ativo, porém também apresentou significativa toxicidade. Assim, o extrato que demonstrou ser o mais vantajoso, foi o extrato da casca do caule de *A. macrocarpon*, apresentando o melhor índice de seletividade em comparação aos extratos testados.

(3) As frações clorofórmio e acetato de etila isoladas do extrato da casca do caule de *A. macrocarpon* demonstraram melhor atividade antileishmania contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. O fracionamento da fração acetato de etila conduziu à obtenção da quercetina, que foi avaliada contra *L. amazonensis* isoladamente e em combinação com anfotericina B e miltefosina (conclusão no item 4). Após, o fracionamento da fração clorofórmio foi selecionada a F.203-222, como fração mais ativa contra formas evolutivas de *L. amazonensis*, esta apresentou como constituintes majoritários 1-monoacilgliceróis (MAG), que demonstraram potencial para atividade antileishmania.

A compilação das análises obtidas com a fração MAG, apresentados nos experimentos antiproliferativos com formas evolutivas de *L. amazonensis*, nos ensaios realizados por microscopia óptica e eletrônica e com a quantificação por citômetro de fluxo do volume celular, exposição da fosfatidilserina, avaliação da integridade de membrana, avaliação do ciclo celular, e avaliação do potencial de membrana mitocondrial corroboraram para a hipótese da morte celular por autofagia e necrose ter ocorrido com as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além, de corroborar com os relatos de uso popular da planta, estes dados são promissores devido à expectativa pela busca por novas entidades químicas que possam atuar como protótipo para síntese de outras moléculas para o tratamento individual ou sinérgico de infecções causadas por *L. amazonensis*.

(4) Os resultados expostos neste estudo, a respeito da ação sinérgica *in vitro* da combinação quercetina e anfotericina, e quercetina com miltefosina sobre formas evolutivas de *L. amazonensis* demonstraram ser promissoras, tendo em vista as vantagens obtidas com a associação como diminuição da citotoxicidade sobre macrófagos e eritrócitos humanos e da concentração das doses das substâncias quando combinadas. As micrografias visualizadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, para as formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com quercetina, anfotericina B e miltefosina sozinhas ou em combinação, sugeriram alterações morfológicas e ultraestruturais com inferência ao processo de morte celular por apoptose, assim como, o descrito na literatura para estas substâncias sozinhas. Dados experimentais *in vivo* são de fato importantes, como próxima etapa dos estudos, bem como a avaliação de dados farmacocinéticos e toxicológicos desta combinação. Estes achados *in vitro* são relevantes, como primeiro passo na busca por novas terapias para o tratamento da leishmaniose cutânea.

(5) Com base nos dados obtidos pelos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC em comparação com a literatura, foi identificada a presença do flavonoide quercetina na fração F.A.21-22 isolada da fração acetato de etila, da casca do caule de *A. macrocarpon*. E isolados da fração clorofórmio a fração F.203-222 caracterizada por conter 1-monoacilglicerois (MAG), sendo estes descritos pela primeira vez neste trabalho como princípios ativos para a espécie *A. macrocarpon*. A identificação dos 1-monoacilglicerois será conduzida por CG/EM.

Também foi isolado e caracterizado mediante análise de RMN e comparação com dados da literatura o alcaloide indólico copsanona isolado da fração clorofórmio da casca de *A. macrocarpon*. Este não demonstrou resultado significativo frente a formas evolutivas de *L. amazonensis*, quando comparado à fração clorofórmio. Embora, já tenha sido descrito para espécie *A. macrocarpon*, a presença deste reforça as características quimiotaxônomicas dos alcaloides indólicos como atributos das espécies de *Aspidosperma*.

(6) Pode-se concluir a partir dos estudos realizados nesta tese, que tanto o isolamento, quanto a utilização de frações bioativas obtidas da casca do caule de *A. macrocarpon*, bem como a possibilidade da combinação da quercetina com fármacos já padronizados para o tratamento de leishmaniose constituiu o primeiro passo para o desenvolvimento tecnológico de uma nova terapia contra infecção por *L. amazonensis*.

REFERÊNCIAS

- ABDELNUR, P. V. Metabolômica e Espectrometria de Massas. **Circular Técnica** – 10. 1^a ed. Brasília, DF, Dezembro, p. 01-04, 2011.
- ADADE, C. M.; SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 178-187, 2010.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Janeiro/março, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGRIPINO, D. G.; LIMA, M. E. L.; SILVA M. R.; MEDA, C. I.; BOLZANI, V. S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; MORENO, P. R.H. Screening of Brazilian Plants for Antimicrobial and DNA-Damaging Activities. I. Atlantic Rain Forest – Ecological Station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p.1-15, 2004.
- AJAZUDDIN, A. A.; QURESHI, A.; KUMARI, L.; VAISHNAV, P.; SHARMA, M.; SARAF, S.; SARAF, S. Role of herbal as a potential bioavailability enhancer for active pharmaceutical ingredients. **Fitoterapia**, FITO-02941, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.05.005>>. Acesso em: 10 abr. 2015.
- ALLOATTI, A.; UTTARO, A. D. Highly specific methyl-end fatty-acid desaturases of trypanosomatids. **Molecular e Biochemical Parasitology**, v. 175, p. 126-132, 2011.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PlosOne**, Maio, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- ALVIANO, D. S.; BARRETO, A. L. S.; DIAS, F. A.; RODRIGUES, I. A.; ROSA, M. S. S.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R. M. A. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. **Frontiers in Microbiology**, Agosto, v. 3, n. 283, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00283, 2012.
- ALZATE, J. F.; ARIAS, A. A.; MORENO-MATEOS, D.; ÁLVAREZ-BARRIENTOS, A.; JIMÉNEZ-RUIZ, A. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. **Molecular e Biochemical Parasitology**, v. 152, p. 192-202, 2007.
- AMBIT, A.; WOODS, K. L.; CULL, B.; COOMBS, G.; MOTTRAM, J. C. Morphological Events during the Cell Cycle of *Leishmania major*. **Eukaryotic Cell**, Novembro, vol. 10, n. 11, p. 1429-1438, 2011.
- AMIN, M. U.; KHURRAM, M.; KHATTAK, B.; KHAN, J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, DOI: 10.1186/s12906-015-0580-1. v. 15, n. 59, 2015.
- AMORIM, I. L.; SAMPAIO, E. S. B.; ARAÚJO, E. L. Flora e estrutura da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de caatinga do Seridó, RN, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 615-623, 2005.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and Applications**. New York, EUA. CRC - Taylor & Francis Group, v. 1, 2006, p. 1197.

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 3, p. 359-365, 2007.

ANNANG, F.; PÉREZ-MORENO, G.; GARCÍA-HERNANÁNDEZ, R.; CORDON-OBAS, C.; MARTÍN, J.; TORMO, J. R.; RODRÍGUEZ, L.; PEDRO, N.; GÓMEZ-PÉREZ, Y.; VALENTE, M.; REYES, F.; GENILLOUD, O.; VICENTE, F.; CASTANYS, S.; RUIZ-PÉREZ, L. M.; NAVARRO, M.; GAMARRO, F.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human African trypanosomiasis, leishmaniasis, and Chagas disease. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n.1, p. 82-91, 2015.

AQUINO, A. B.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; DA MATTA, C. B. B.; EPIFÂNIO, W. A. N.; AQUINO, P. G. V.; SANT'ANA, A. E. G.; MOREIRA-ALEXANDRE, M. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. The antinoceptive and anti-inflammatory activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). **The Scientific World Journal**, ID 21867. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/218627>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

AQUINO, E. M. **Análise química e biológica dos alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. e *Aspidosperma tomentosum* Mart.** 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

AQUINO, P. G. V. **Estudo químico e atividades anti-hipertensiva e antioxidante de *Aspidosperma macrocarpum* Mart. (Apocynaceae).** 2012. 133 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2012.

AQUINO, P. G. V.; AQUINO, T. M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; SANTOS, B. V. O.; SANT'ANA, A. E. G.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. *Aspidosperma* terpenoid alkaloids. biosynthetic origin, chemical synthesis and importance. In: **Phytochemical**, InTech, 2015. “in press”.

ARAÚJO JÚNIOR, J. X. de; ANTHEAUME, C.; TRINDADE, R. C. P.; SCHMITT, M.; BOURGUIGNON, J. J.; SANT'ANA, A. E. G. Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyriformis*. **Phytochemistry Review**, New York, v. 6, p. 183-188, 2007.

ARAÚJO-SANTOS, T.; RODRÍGUEZ, N. E.; PONTES, S. M.; DIXT, U. G.; ABÁNADES, D. R.; BOZZA, P. T.; WILSON, M. E.; BORGES, V. M. Role of prostaglandin F₂ production in lipid bodies from *Leishmania infantum chagasi*: insights on virulence. **Journal of Infectious Diseases Advance**, New York University, 29 de Maio, p. jiu299, 2014. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/at>>. Acesso em: 23 de maio de 2015.

ARNDT, R. R.; BROWN, S. H.; LING, N. C.; ROLLER, P.; DJERASSI, C.; FERREIRA, J. M.; GILBERT, F. B.; MIRANDA, E. C.; FLORES, S. E.; DUARTE, A. P.; CARRAZZONI, E. P. Alkaloid Studies – LVIII. The alkaloids of six *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v. 6p. 1633-1658, 1967.

ATTIAS, M. Desidratação, inclusão, ultramicrotomia e contrastação. In: SOUZA, W.; et al. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**, 3ª edição. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, capítulo 3, p. 37-51, 2007.

AZEVEDO, E. P. **Obtenção, caracterização e avaliação da atividade antioxidante de extratos atomizados de *Aspidosperma pyrifolium* e *Aspidosperma macrocarpum***. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, 2013.

BAHMANI, M.; SAKI, K.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; KARAMATI, S. A.; EFTEKHARI, Z.; JELODARI, M. The most common herbal medicines affecting sarcomastigophora branches: a review study. **Asian Pacific of Tropical Medicine**, DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60198-X. v. 7, n.1, p. s4-s21, 2014

BANNWART, G.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SANTIN, S. M. O. Antiproliferative Activity and Constituents of *Aspidosperma macrocarpon* (Apocynaceae) Leaves. **Records of Natural Products**, v 7, n. 2, p. 137-140, 2013a.

BANNWART, G.; SANTIN, S.; SCHUQUEL, I.; KATO, L.; OLIVEIRA, C.; BANNWART, E.; LEITE, C. Flavonoide e triterpeno isolados das folhas da *Aspidosperma macrocarpon*. In: 53º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA – CBQ. 2013, Rio de Janeiro – RJ. **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Química, 2013b. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/7/2702-16442.html>>. Acesso em: 14 de outubro de 2014.

BANNWART, Geanderson. **Contribuição ao estudo da espécie *Aspidosperma macrocarpon* da família Apocynaceae da região do cerrado: fitoquímica e avaliação biológica**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, 2012.

BARBOSA, L. F.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. Chemical Constituents from *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 21, n. 8, p. 1434-1438, 2010.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688. 2009.

BARRET, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin Advance**, Novembro, v. 104, n. 22, p. 175-196, 2012.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHINI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, SP. v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BERGHE, T. V.; VANLANGENAKKER, N.; PARTHOENS, E.; DECKERS, W.; DEVOS, M.; FESTJENS, N.; GUERIN, C. J.; BRUNK, U. T.; DECLERCQ, W.; VANDENABEELE, P. necroptosis, necrosis, and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death and Differentiation**. V. 17, p. 922-930, 2010.

BILIA, A. R.; CIAMPI, L.; MENDEZ, J.; MORRELI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. ¹Flavonoids from *Licania pyrifolia*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71 p. 199-204. 1996.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole Alkaloid Evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 2, p. 187-200, 1987.

BORGES, V. M.; REIS, G. A.; BARCINSKI, M. A. Interação Leishmania e células do hospedeiro. In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1^a edição. cap. 19, p. 102-112, 2011.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 18, p. 1-8, 2007

BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 93, p. 269-277, 2004.

BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of plants occurring in the State Minas Gerais (Brazil): part III. **Journal of chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 223-236, 2011.

BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S. M.; ROCHA, E. M. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 36, p. 175-182, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2006a, 147 p.

_____. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde (Textos Básicos de Saúde), 2006b, 92 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006c, 60 p.

_____. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Plantas medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde (Cadernos de Atenção Básica – Práticas Integrativas e Complementares), 2012, 156 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2^a. ed. atual., 3^a. reimpr. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013. 180 p.

BRENNAND, A.; GUALDRÓN-LÓPEZ, M.; COPPENS, I.; RIGDEN, D. J.; GINGER, M. L.; MICHELS, P. A. M. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. **Molecular e Biochemical Parasitology**, v. 177, p. 83-99, 2011.

BRENZAN, M. A.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antileishmanial Activity of Crude Extracta and Coumarin from *Calophyllum brasiliense* Leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 101, p. 715–722, 2007.

BRITTA, E. A.; SCARIOT, D. B.; FALZIROLLI, H.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, C. C.; DIAS-FILHO, B. P.; SILVA, C. C.; BORSALI, R.; NAKAMURA, C. V. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-nitrobenzaldehyde thiosemicarbazona derived from S-limonene. **Biomed Central Microbiology**, 2014, 14:236. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/236>>. Acesso em: 5 fev. 2015.

BRITTA, E. A.; SILVA, A. P. B.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; SILVA, C. C.; SERNAGLIA, R. L.; NAKAMURA, C. V. Benzaldehyde Thiosemicarbazone Derived from Limonene Complexed with Copper Induced Mitochondrial Dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Plos One**, v. 7, 8 ed., p.1-12, 2012.

BROOKES, P. S. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. **Free radical Biology e Medicine**, v. 38, p. 12-23, 2005.

BUSTOS, M. F. G.; BARRIO, A.; PRIETO, G. G.; RASPI, E. M.; CIMINO, R. O.; CARDOZO, R. M.; PARADA, L. A.; YEO, M.; SOTO, J.; UNCOS, D. A.; PARODI, C.; BASOMBRÍO, M. A. *In vivo* antileishmania efficacy of miltefosine against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 6, p. 840-847, 2014.

C.E.S.A.R., Centro de Estudos e Sistemas Avançados do Recife. **Manual de Incentivos a Inovação**. Como gerar inovação usando incentivos governamentais no Brasil. Junho, 2009, 17 p.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; MARLEY, D.; KIRBY, G. C.; WARHUST, D. C. Assessment of the antiprotozoal activity of *Galphimia glauca* and the isolation of new Nor-secofriedelanes and Nor-friedelanes. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1457-1461, 2002.

CAMPOS, R. A.; CUNHA, K. M. A.; SANTOS, F. A.; SILVEIRA, E. R.; UCHOA, D. E. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; RAO, V. S. N. Relaxant effects of an alkaloid-rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark on isolated rabbit corpus cavernosum. **International Journal of Impotence Research**, v.0, p. 1-9, 2007.

CAMPOS, R. A.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 104, p. 240-244, 2006.

CANUTO, G. A. B.; CASTILHO-MARTINS, E. A.; TAVARES, M. F. M.; RIVAS, L. BARBAS, C. LÓPEZ-GONZÁLEZ, A. Multi-nalytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in *Leishmania*. **Analytical and bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 3459-3476, 2014.

CARBALLEIRA, N. M. Recent developments in the antiprotozoal and anticancer activities of the 2-alkynoic fatty acids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 0, p. 58-66, DOI:10.1016/j.chemphyslip.2013.05.002, 2013.

CARBALLEIRA, N. M.; CARTAGENA, M.; SANABRIA, D.; KAISER, M.; TASDEMIR, D.; PRADA, C. F.; REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R. 2-alkynoic fatty acids inhibit topoisomerase IB from *Leishmania donovani*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, Outubro, v. 22, n. 19, p. 6185-6189, DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.08.019., 2012.

CASTRO, A. C.; OLIVEIRA, D. C.; MOREIRA, A. S. F. P.; ISAIAS, R. M. S. Synchronism between *Aspidosperma macrocarpon* (Apocynaceae) resources allocation and the establishment of the gall inducer *Pseudophacopteron* sp. (Hemiptera: Psylloidea). **Revista de Biologia Tropical**, Dezembro, v. 61, n. 4, p. 1891-1900, 2013.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2ª edição. Viçosa, Minas Gerais, 2004, 113 p.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “química orgânica”. **Química Nova**, São Paulo, n. 20, v.5, p. 560-562, 1997.

CHIERRITO, T. P. C.; AGUIAR, A. C. C.; ANDRADE, I. M.; CERAVOLO, I. P.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; KRETTLI, A. U. Anti-malarial activity of indole alkaloids isolated from *Aspidosperma olivaceum*. **Malaria Journal**, v. 13, n. 142. 2014. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/content/13/1/142>> Acesso em: 20 jan. 2015.

CHITEMERERE, T. A.; MUKANGANYAMA, S.; Evaluation of cell membrane integrity as a potencial antimicrobial target for plant products. **BCM Complementary e Alternative Medicine**, v. 14, n. 278, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/278>>. Acesso em: 24 fev. 2015.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440-446, 2010.

CHOU, T. C., TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CHOUHAN, G.; ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Maio, v. 5, artigo 193, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00193, 2014.

CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and Embryology**, v. 181, p. 195-213, 1990.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI – **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard**. Eighth edition. M07-A8 – CLSI, Wayne, PA, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI – **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard**. Eighth edition. M27-A3 – NCCLS, Wayne, PA, 2008.

COATTI, G. C.; MARCARINI, J. C.; SARTORI, D.; FIDELIS, Q. C.; FERREIRA, D. T.; MANTOVANI, M. S. Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression. Analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted from *Aspidosperma* polyneuron in HepG2 cells. **Cytotechnology**, Doi: 10.007/s10616-015-9874-9, 2015.

COELHO, A. C.; TRICONI, C. T.; COSTA, C. H. N.; ULIANA, S. R. B. *In vitro* and *in vivo* miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, Julho, v. 8, n.7, p. e2999, 2014.

CORRAL, M. J.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, E; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J. M. In vitro Synergistic Effect of Amphotericin B and Allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58. n. 3, p. 1596-1602, 2014.

COSTA, J. M. L. Modalidades Clínicas da Leishmaniose Tegumentar. In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1ª edição. cap. 13, p. 102-112, 2011.

COUTINHO, J. P.; AGUIAR, A. C. C.; SANTOS, P. A.; LIMA, J. C.; ROCHA, M. G. L.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; SANT'ANA, A. E. G.; PEREIRA, M. M.; KRETTLI, A. U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malária parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malária in the Amazon. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 8, p. 974-982. 2013.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M. Alkaloids of *Aspidosperma pyriformum*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1526-1528, 1983.

CUNHA, A. C.; CHIERRITO, T. P. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P.; SILVA, C. C.; TANAKA, J. C.; SOUZA, L. M.; GONÇALVES R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmania activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v. 19, p. 413-417, 2012.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular pathology**. DOI: 10.1006/exm. 2002.2418, v.72, p. 132-141, 2002.

CZEPAS, J.; GWOZDZINSKI, K. The flavonoid quercetin: possible solution for anthracycline-induced cardiotoxicity and multidrug resistance. **Biomedicine e pharmacotherapy**, 2014, Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.bipha.2014.10.013>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

DAS, B. B.; SEN, N.; ROY, A.; DASGUPTA, S. B.; GANGULY, A.; MOHANTA, B. C.; DINDA, B.; MAJUMDER, H. K. Differential induction of *Leishmania donovani* bi-subunit topoisomerase I-DNA cleavage complex by selected flavones and camptothecin: activity of flavones against camptotecin-resistant topoisomerase I. **Nucleic Acid Research**, v. 34, n. 4, p. 1121-1132, 2006.

DAS, S.; ROY, P.; MONDAL, S.; BERA, T.; MUKHERJEE, A. One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 107, p. 27-34, 2013.

DE PAULA, R. C.; DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, A. B. *Aspidosperma* species as sources of antimalarials. Part III. A review of traditional use and antimalarial activity. **Planta Medica, Stuttgart**, New York. v. 80, p. 378-386, 2014.

DEPARTAMENTO DE COMPETITIVIDADE E TECNOLOGIA - DECOMTEC. **Manual dos Instrumentos da Política de Desenvolvimento Produtivo – PDP**. Cadernos Políticos Industriais, n. 2, 2009. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/pdp/index>>. Acesso em: 5 out. 2010.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Acidocalcisomes. **Cell Calcium**, v. 50, p. 113-119, 2011.

DOLABELA, M. F.; OLIVEIRA, S. G.; PERES, J. M.; NASCIMENTO, J. M. S.; PÓVOA, M. M.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* antimalarial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 899-910, 2012.

EIRAS, D. P.; KIRKMAN, L. A.; MURRAY, H. W. Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers. **Current Treatment Options Infective Diseases**, v. 7, n. 1, p. 52-62, 2015.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v.161, p. 534-540, 2010.

ENDO, E. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Activity of Spray-dried Microparticles Containing Pomegranate Peel Extract against *Candida albicans*. **Molecules**, v.17, 10094-10107; DOI: 10.3390/molecules170910094, 2012.

FARCA, A. M., MINISCALCO, B., BADINO, P., ODORE, R., MONTICELLI, P., TRISCIUOGGIO, A., FERROGLIO, E. Canine leishmaniasis: *in vitro* efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2509-2513, 2012.

FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, antileishmanial and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763-769, 2010.

FERRAZ, R. Tutorial – **Citometria de Fluxo: Cell sorting – fundamentos e aplicações**. Editor: Álvaro Luiz Bertho. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (sorting), IOC, FIOCRUZ, 2013. Disponível em: <http://picf.ioc.fiocruz.br/nucleosorting_tutoriais.htm>. Acesso em: 26 abr. 2015.

FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; NASCIMENTO, M. T. C.; PINTO-DA-SILVA, L. H.; SARZEDAS, C. G.; TINOCO, L. W.; SARAIVA, E. M. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: *in vitro* effect of its association with amphotericin B. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, DOI: 10.1128/AAC.00093-14, 2014.

FERREIRA, D. T.; PINTO, J. P.; FIDELIS, Q. C.; SABINO, F. C.; UCHOA, D.; BRAZ-FILHO, R. Alcaloides indólicos e o éster dioctil do ácido adípico isolados de *Aspidosperma polyneuron*, Apocynaceae. **29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 2006**, Águas de Lindóia, SP, resumos.

FERREIRA, D. T.; SILVA Jr., J. V.; SOEIRA, L. S.; ZANOLLI, L. A.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M.; YASSUMOTO, L. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de raiz, caule e folha de *Aspidosperma polyneuron*. **XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQSUL) 2003**, Pelotas, RS, Brasil, resumos: QO-83.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Antileishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, São Paulo. v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

FERREIRA-FILHO, J. M.; GILBERT, B.; KITAGAWA, M.; PAES LEME, L. A.; DURHAM, L. J. Four heptacyclic alkaloids from *Aspidosperma* species. **Journal of the Chemical Society**, DOI: 10.1039/J39660001260, p. 1260-1266, 1966.

FESTJENS, N.; BERGHE, T. V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 1371-1387, 2006.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, abril/junho, v. 42, n. 2, p. 167- 193, 2006.

FOLLO-MARTINEZ, A. D.; BANERJEE, N.; LI, X.; SAFE, S.; MERTENS-TALCOTT, S. Resveratrol and Quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 3, p. 494-504, 2013.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, Fevereiro, v. 6, n. 2, e14666, 2011

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive Oxygen Species Production by Quercetin Causes the Death of *Leishmania amazonensis* Intracellular Amastigotes. **Journal Natural Products**, Dx.DOI.org/10.1021/np400193m, março, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **New and events: FDA approves Impavido to treat tropical disease leishmaniasis.** Silver Spring, 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/newsroom?PressAnnouncements/ucm389671.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

FUCHS, B.; SÜB, R.; TEUBER, K.; EIBISCH, M.; SCHILLER J. Lipid analysis by thin-layer chromatography – A review of the current state. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2754-2774, 2011.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980-2001.** Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/epi/pdfs/casos_conf_por_uf_1980_2001.pdf>. Acesso em: 20 set. 2010.

GARCIA, F. P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. Eupomatenoid-5 Isolated from leaves of *Piper regnelli* Induces apoptosis em *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013, 2013:940531. DOI:10.1155/2013/940531.

GENARO, O; REIS, A. B.. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. cap. 8, p. 47-64.

GEORGIEV, M. I.; Natural products utilization. **Phytochemistry Research**, v. 13, p. 339-341, 2014.

GODINHO, J. L. P.; GEORGIKOPOULOU, K.; CALOGEROPOULOU, T.; SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity *in vitro* against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, YEXPR 6703, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.015>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Janeiro/fevereiro, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous *Leishmania*. **Infectious Disease Clinics of North America**, DOI: 10.1016/j.idc.2012.03.001, v.26, p. 293-307, 2012.

GRANATO, D.; NUNES, D.S.; MATTOS, P. P.; RIOS, E. M.; GLINSKI, A.; RODRIGUES, L. C.; ZANUSSO-JÚNIOR, G. Chemical and Biological Evaluation of Rejects from the Wood Industry. **Brazil Archives Biology and Technology**, v. 48, n. especial, p. 237-241, 2005.

GUIMARÃES, H. A.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. ¹H and ¹³C-NMR data of the simplest plumeran índole alkaloids isolated from *Aspidosperma* Species. **Molecules**, v. 17, p. 3025-3043, 2012.

GUNSTONE, F. D. High resolution ^{13}C NMR. A technique for the study of lipid structure and composition. **Progress Lipid Research**, v. 33, n. ½, p. 19-28, 1994.

HENRIQUE, C. M.; NUNOMORA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcaloides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A. MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007, cap. 29, p. 765-791.

HERNÁNDEZ-GALICIA, E.; CALZADA, F.; ROMAN-RAMOS, R.; ALARCÓN-AGUILAR, F. J. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: isolation and hypoglycemic activity. **Planta Medica**, v.73, p. 236-240, 2007.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, no. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. Cromatografia Plana. In: **Técnicas de cromatografia preparativa**. Aplicaciones en el aislamiento de productos naturales. Barcelona: editora Springer, 2001, cap. 3, p. 14.42.

HOU, C.; YUAN, Q.; HUO, D.; ZHENG, S.; ZHAN, D. Investigation on clotting and hemolysis characteristics of heparin-immobilized polyether sulfones biomembrane. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.85, p.847-852, 2008.

INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACO E PRODUTOS FARMACÊUTICOS - IPD-FARMA. **Fiocruz inova em estudo de vacina contra a leishmaniose**. 2015. In: Agência Fiocruz de Notícias – 01/04/2015. Disponível em: <<http://ipd-farma.org.br/noticias/pagina/909/Fiocruz-inova-em-estudo-de-vacina-contra-a-leishmaniose>> Acesso em: 13 jun. 2015

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2994-3001, 2012.

JÁCOME, R. L. R. P.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; WAGNER, H. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“pau-pereira”). **Química Nova**, São Paulo. v. 27, n. 6, p. 897-900, 2004.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies form treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, 2013. DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.005](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.005)

JAIN, M. V.; PACZULLA, A. M.; KLONISCH, T.; DIMGBA, F. N.; RAO, S. B.; ROBERG, K.; SCHWEIZER, F.; LENFERKE, C.; DAVOODPOUR, P.; PALICCHARLA, V. R.; MADDIKA, S.; LOS, M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 12-29, 2013.

JIMÉNEZ-COELLO, M.; ACOSTA-VIANA, K. Y.; ORTEGA-PACHECO, A.; PEREZ-GUTIÉRREZ, S.; GUZMAN-MARÍN, E. In vivo antiprotozoal activity of the chloroform extract from *Carica papaya* seeds against amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* during indeterminate and chronic phase of infection. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, artigo: ID 458263, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/458263>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

JIMÉNEZ-COELLO, M.; GUZMAN-MARÍN, E.; ORTEGA-PACHECO, A.; PEREZ-GUTIÉRREZ, S.; ACOSTA-VIANA, K. Y. Assesment of the anti-protozoal activity of crude *Carica papaya* seed extract against *Trypanosoma cruzi*. **Molecules**, v. 18, p. 12621-12632, DOI: 10.3390/molecules18101621, 2013.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. **Thin-Layer Chromatography. Reagentes and Detection Methods**. Nova York – EUA. VCH Publicações v. 1, 1990, p. 496

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MACLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites e Vectors**, v. 3, n. 104, 2010. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/3/1/104>>. Acesso em: 13 maio. 2013.

KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. **Parasites e Vectors**, v. 4, n.44, 2011. Disponível:<<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/44>>. Acesso em: 30 abr. 2015.

KAITIN, K. I. Deconstructing the Drug Development Process: The new face of Innovation. **Nature**, v. 87, n. 3, p. 356-361, 2010.

KAM, T. S.; SIM, K. M.; KOYANO, T.; KOMIYAMA, K. Antileishmanial alkaloids from *Kopsia griffithi*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 75-79, 1999.

KAPLUM, V. **Investigação da atividade antiproliferativa dos derivados de quinoxalina 2,3-diarilsubstituídas e dos efeitos biológicos de 6,7-dicloro-2,3-difenil quinoxalina e 2,3-di-(4metoxifenil)-quinoxalina em forma promastigota e amastigota intracelular de *Leishmania amazonensis***. Dissertação de Mestrado, p. 77, 2014. (Área de concentração: Ciências Farmacêuticas), 2014.

KATHURIA, M.; BHATTACHARJEE, A.; SASHIDHARA, V.; SINGH, S. P.; MITRA, K. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5916-5928, 2014.

KAUR, H.; SEIFERT, K.; HAWKES, G. E.; COUMBARIDES, G. S.; ALVAR, J.; CROFT, S. L. Chemical and Bioassay Techniques to Authenticate Quality of the Antileishmanial Drug Miltefosine. **Journal American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Abril, DOI: 10.4269/ajtmth.14-0586, 2015.

KAYE, P.; SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 9, p. 604- 615, 2011

KHADEM VATAN, S.; GHARAVI, M. J.; RAHIM, F.; SAKI, J. Miltefosine-induced apoptotic cell death on *Leishmania major* and *L. tropica* strains. **Korean Journal Parasitology**, Março, v. 49, n. 1, p. 17-23, 2011.

KHARCHAFI, G.; JÉROMÊ, F.; DOULIEZ, J.P.; BARRAULT, J. Facile and regioselective mono- or diesterification of glycerol derivatives over recyclable phosphazene organocatalyst. **Green Chemistry**, v.8, p.710-716, 2006.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; JOSHUA, N.; CHAI, H. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. **Journal Natural Products**, v. 74, p. 1539-1555, 2011.

KNOTHE, G.; KENAR, A. J. determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, p. 88-96, 2004.

KOBAYASHI, J.; SEKIGUCHI, M.; SHIMAMOTO, S.; SHIGEMORI, H.; ISHIYAMA, H.; OHSAKI, A. Subincanadines A-C, Novel Quaternary Indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum*. **Journal of Chemical Organic**, v. 67, p. 6449-6455, 2002.

KOHN, L. K.; PIZÃO, P. E.; FOGGIO, M. A.; ANTONIO, M. A.; AMARAL, M. C. E. BITTRIC, V.; CARVALHO, J. E. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v 8, p. 110-115, 2006.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EI-DEIRY, W. S.; GOSTEIN, P.; GRENN, D. R.; HENGARTNER, M. E.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell death 2009. **Cell Death and Differentiation**, Janeiro, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009. DOI:10.1038/cdd.2008.150.

KURKIN, V. A.; PRAVDIVTSEVA. Flavonoids from the aerial part of *Hipericum perforatum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.43, n.5, p.620-621, 2007.

LAGE, P. S.; ANDRADE, P. H. R.; LOPES, A. S.; FUMAGALLI, M. A. C.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, T. G.; SOUZA FILHO, J. D.; TAVARES, C. A. P.; PÁDUA, R. M.; LEITE, J. P. V.; COELHO, E. A. F. *Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective in vitro antileishmanial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, artigo ID 30434. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/304354>> Acesso em: 15 ago. 2014.

LAKHANPAL, P.; RAI, D. K. Quercetin: a versatile Flavonoid. **International Journal of Medical Update**, Julho-Dezembro, v. 2, n. 2, p. 22-36, 2007.

LAYNE, T. H.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; TINTO, W. F. Excelsinidine, A quaternary alkaloid from *Aspidosperma excelsum*. **Natural Product Communications**, Ohio, v.2, n.6, p.649-652, 2007.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V.C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; S. O. SILVA. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoïd-5: Confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 17-28. 2013.

LEITÃO, A.; MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; Desenvolvimento de Fármacos. In: MONTANARI, C. A. (org.). **Química Medicinal. Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo. 2011, cap. 3, p. 67-90.

LES, K. A.; MOHAMED-AHMED, A. H. A.; BALAN, S.; CHOI, J. W.; MATIN, D.; YARDLEY, V.; POWELL, K.; GODWIN, A.; BROCCINI, S. Poly(methacrylic acid) complexation of amphotericin B to treat neglected diseases. **Polymer Chemistry**, v. 5, p. 1037-1048, 2014.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Educação Médica Continuada. v. 82, n. 2, p. 111-124. 2007.

LIMA, T. C.; SOUZA, R. J.; SANTOS, A. D.; MORAES, M. H.; BIONDO, N. E.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M. W. Evaluation of antileishmanial and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Natural Products Research**, Abril, p. 1-7, 2015.

LINO, R. C.; GARROTE, C. F. D. Isolamento dos alcaloides indólicos presentes na casca do caule de *Aspidosperma subincanum* Mart., para obtenção de padrões com finalidade de desenvolvimento de metodologia para doseamento com marcadores de matéria-prima vegetal. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v.2, n. 2, p. 107-109, 2005.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, Philadelphia, v. 69, n.2, p. 581-593, 1997.

LIVORE, V. I.; UTTARO, A. D. Biosynthesis of very long chain fatty acids in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 114, p. 265-271, 2015.

LOPES, M. V.; DESOTI, V. C.; CALEARE, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. Mitochondria superoxide anion production contributes to geranylgeraniol-induced death in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID: 298320, DOI: 10.1155/2012/298320, 2012.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**. São Paulo, SP, v.27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1, p. 39, v.2, p.37,41, 2002.

MACEDO-SILVA, S. T.; SILVA, T. L. A. O.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Molecular Biology International**, ID: 8760021, DOI: 10.4061/2011/876021, 2011.

MACEDO-SILVA, S. T.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **Plos One**, v.8, n. 2, p. e83247, 2013.

MAGNUS, P.; GALLAGHER, T.; BROWN, P.; HUFFMAN, J. C. Synthesis of (\pm)-10,22-Dioxokopsane and (\pm)-Kopsanone, Heptacyclic Indole Alkaloids. Synthetic and Mechanistic Studies. **Journal American Chemical Society**, v. 106, p. 2105-2114, 1984.

MANJOLIN, L. C.; DOS REIS, M. B. G.; MAQUIAVELI, C. C.; SANTOS-FILHO, O. A.; SILVA, E. R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2253-2262, 2013.

MATOS, F. J. A. Roteiro Sequencial para a prospecção de constituintes químicos de extratos de plantas. In: **Introdução a Fitoquímica Experimental**, 3^o edição, Fortaleza: Edições UFC, 2009, cap. 4, p. 45-79.

MELOS, J. L.; ECHEVARRIA, A. Sistemas enzimáticos de tripanosomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 374-392, 2012.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P. Antileishmanial and trypanocidal activity of brazilian Cerrado plants. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 110, p. 165-170, 2007.

MILLER, J. M. T. H. Chemistry and Biology of the polyene macrolide Antibiotics. **Bacteriological Reviews**, Junho, v. 37, n. 2, p. 166-196, 1973.

MIRANDA, J. C.; DIAS, E. S. Vetores das Leishmanioses nas Américas. In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1^a edição. cap. 6, p. 55-74, 2011.

MIRANDA, N. **A busca por novos compostos com atividade anti-trypanosoma a partir de folhas de *Arrabidaea chica***. P. 78, 2013. Dissertação de Mestrado. (Área de concentração: Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Maringá – UEM – PR, 2013.

MITAINE, A. C.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; PETERMANN, C.; ARRAZOLA, S.; MORETTI, C.; ZÈCHES-HANROT, M.; LE MEN-OLIVER, L. Alkaloids from *Aspidosperma* species from Bolívia. **Planta Médica**, Stuttgart. New York. v. 62, p. 458-461, 1996.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma indole* alkaloids. **Phytomedicine**, Stuttgart- Jena- New York, v.9, p. 142-145, 2002.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A. R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent antileishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 527-541, 2000.

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Flavonoide e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v.26, n. 3, p.309-311, 2003.

MONTRIEUX, E.; PERERA, W. H.; GARCÍA, M.; MAES, L.; COS, P.; MONZOTE, L. *In vitro* and *in vivo* activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2925-2932, 2014.

MOREIRA, R. A.; MENDANHA, S. A.; FERNANDES, K. S.; MATOS, G. G.; ALONSO, L.; DORTA, M. L.; ALONSO, A. Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in *Leishmania amazonensis* Membranes at Concentrations Similar to those Needed for Cytotoxicity Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Junho, v. 58, n. 6, p. 3021-3028, 2014.

MOREIRA, W.; LEPROHON, P.; OUELLETTE, M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. **Cellular Death and Diseases**, v. 2, p. e201; DOI: 10.1038/cddis.2011.83, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MOURA, T. R.; DE JESUS, A. R.; ALMEIDA, R. P. Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar. In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1^a edição. cap. 15, p. 154 - 168, 2011.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. Lipídios: Química y productos naturales que los contienen. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007, cap. 17, p. 435-466.

MUNOZ, C.; ALZOUBI, K.; JACOBI, J.; ABED, M.; LANG, F. Effect of miltefosine on erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 1913-1919, 2013.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. L. The *Leishmania*-macrofage interaction: a metabolic prespective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301-308, 2008.

NAIR, P.; MALHOTRA, A.; DHAWAN, D. K. Curcumin and quercetin trigger apoptosis during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 400, p. 51-56, 2015.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Testing**; Twelfth Informational Supplement. Wayne, Jan. 2002. v. 22, no. 1, 136 p.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percurso**, Maringá, PR, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.

NUNES, D. S. **Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*. *Aspidosperma pruinosum* Markgraf.** 1980. 177 p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Química Orgânica)– Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1980.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, Junho, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OLIVEIRA, A. B.; SOUZA FILHO, J. D.; CHIARI, E.; BRAGA, F. C.; LOMBARDI, J. Á.; ABREU E SILVA, M. Isolamento de alcaloides de *Aspidosperma tomentosum* biomonitorado por testes *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. In: **III SEMANA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFMG**, 2001, Belo Horizonte, Brasil. Disponível em: <http://www.ufmg.br/prpg/dow_anais/cien_ex_terra/quimica_3/mabreuesilva.doc>. Acesso em: 12 out. 2014.

OLIVEIRA, A. J. B. **Estudo de seis espécies do gênero *Aspidosperma*, utilizando GC, GC/MS e HPLC: análise qualitativa e quantitativa. Teste bioautográfico, cultura de tecidos e células vegetais e rota de preparação dos compostos diméricos ramiflorina A e ramiflorina B.** 1999. 371 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas, SP. 1999.

OLIVEIRA, A. J. B.; KOIKE, L.; REIS, F. A. M.; EGUCHI, S. Y.; ENDO, E.H.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Preliminary Studies on the Antibacterial Activity of Ethanol Crude Extracts and Alkaloids from Species of *Aspidosperma*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1085-1089, 2009a.

OLIVEIRA, M. P.; COSTA, C. D. F.; HERCULANO, E. A.; AQUINO, P. G. V.; SANT'ANA, A. E. G.; RIBEIRO, Ê. A. N.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. Cardiovascular effects of the *Aspidosperma macrocarpum* leaves ethanol extract in rats. **PharmacologyOnline**, v. 1, n. especial, p. 102-107, 2012.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n. 1, p. 92-99, 2009c.

OLIVEIRA, V. B.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L.; LOPES, N. P.; CROTTI A. E. M.; UCHOA, D. E. A. Spruceanumines A and B, Novel Plumeran indole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 20, n. 4, p. 753-759, 2009b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Global Health Observatory (GHO) data: **Neglected tropical diseases**. Communicable Diseases Surveillance and Response. Geneva. 2014. In: WHO. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en>. Acesso em: 21 mar. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Media Centre. **Antimicrobial resistance**. N°194, April 2015a. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. Media Centre: **Leishmaniasis**. 2015b. In: WHO. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE. **Manual de Frascati**. Metodologia proposta para levantamento sobre pesquisa e desenvolvimento experimental. Edição F-Iniciativas, acessoria em P&D, 2013, 324 p.

PAAPE, D.; BELL, A. S.; HEAL, W. P.; HUTTON, J. A.; LEATHERBARROW, R. J.; TATE, E. W.; SMITH, D. F. Using a Non-Image-based medium-throughput assay for screening compounds targeting *N*-myristoylation in intracellular *Leishmania* amastigotes. **Plos One**, Dezembro, v. 8, n. 12, p. e3363, 2014

PANUSA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; MULTARI, G.; GALLO, F. R. UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling of *Arctostaphylos pungens* and *Arctostaphylos uva-ursi*. A comparative study of phenolic compounds from leaf methanolic extracts. **Phytochemistry**, v. 115, p. 79-88, 2015.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Março, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**, 4ª edição. São Paulo, SP: Editora Cengage Learning, 2010, 700 p.

PEREIRA, M. M.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; RASLAN, D. S. NMR structural analysis of Braznitidumine: A new índole alkaloidal with 1,2,9-triazabicyclo [7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 17, n.7, p. 1274-1280, 2006b.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 970-983, 2007.

PEREIRA, M. M.; SOUZA JÚNIOR, S. N.; ALCÂNTARA, A. F. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALVES, R. B. MACHADO, P. O.; AZEVEDO, A. O.; MOREIRA, F. H.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.3, p. 1-8, 2006a.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6A, p.1130-1133, 2005.

PHAM, T. T. H.; GUEUTIN, C.; CHERON, M.; ABREU, S.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P. M. Development of antileishmanial lipid nanocomplexes. **Biochimie**, Jun. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.007>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

PODOLSKY, S. H.; GREENE, J. A. Combination drugs – Hype, Harm, and Hope. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 6, p. 488-491, 2011.

POURKAVOOS, N. Unique Risks, Benefits, and Challenges of developing drug-Drug Combination Products in a Pharmaceutical Industrial Setting. **Combination Products in Therapy**, v. 2, n. 2, DOI: 10.1007/s135556-012-0002-2, 2012.

REINA, M.; RUIZ-MESIA, L.; SOSA-AMAY, F. E.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R. Antiparasitic indole alkaloids from *Aspidosperma desmanthum* and *A. spruceanum* from the Peruvian Amazonia. **Natural Product Communication**, Agosto, v. 9, n. 8, p. 1075-1080, 2014.

REINA, M.; RUIZ-MESIA, W.; RUIZ-MESIA, L.; MARTÍNEZ-DÍAZ, R.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Indole alkaloids from *Aspidosperma rigidum* and *A. schultesii* and their antiparasitic effects. **Zeitschrift für naturforschung**, v. 66c, p. 225-234, 2011.

REY, L. Leishmaníases Cutâneas e Muco-cutâneas do Novo Mundo. In: REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3ª edição. Rio de Janeiro: RJ. Editora Guanabara Koogan, cap. 5, p.62-83, 2013.

RIABI, R. T.; SHARIFI, I.; MOHAMMADI, A.; KHAMESIPOUR, A.; PARIZI, M. H. Evaluation of a possible synergistic effect of meglumine antimoniate with paramomycin, miltefosine or allopurinol on *in vitro* susceptibility of *Leishmania tropica* resistant isolate. **Iranian Journal Parasitology**, Julho/setembro, v. 8, n.3, p. 396-401, 2013.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; SCHILD, A. L. A review of poisonous plants that cause reproductive failure and malformations in the ruminants of Brazil. **Journal of Applied Toxicology**, v, 32, p. 245-254, 2012.

ROBERT, G. M. T.; AHOND, A.; PUPAT, C.; POTIER, P.; JOLLES, C.; JOUSSELIN, A. *Aspidosperma* de Guyane: alcaloides de *Aspidosperma marcgravianum*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 694-707, 1983.

RODRIGUES, J. C. F.; ATTÍAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. Ultrastructural and Biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Fevereiro, v. 46, n. 2, p. 487-499, 2002.

RODRIGUES, J.C.F.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v 111, p. 230-238, 2005.

RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; SOUZA, W. Biology of Human Pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle, ultrastructure, 2014. In: SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; D'AVILA-LEVY, C. M.; KNEIPP, L. F.; SODRÉ, C. L. (eds). **Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. Subcellular Biochemistry 74, DOI: 10.1007/978-94-007-7305-9_1. Editora: Springer Science, 2014, cap. 1, p. 1-42

RODRIGUES, J. C. F.; SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different class of metabolic inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 925-938, 2008.

RODRIGUES, J. H. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, A. G.; SANGI, D. P.; NAKAMURA, C. V. A Quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. **Plos One**, v. 9 (1), p.1-12, janeiro, 2014.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotas. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19; p. 195-200, 1986.

SAMMAIAH, A.; PADMAJA, K. V.; PRASAD, R. B. N. Synthesis and evaluation of novel acyl derivatives from Jatropha oil as potential lubricant basestocks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4652-4660, 2014.

SAMUEL, T.; FADLALLA, K.; MOSLEY, L.; KATKOORI, V.; TURNER, T.; MANNE, U. Dual-mode interaction between quercetin and DNA-damaging drugs in cancer cells. **Anticancer Research**, v. 32, n. 61, p. 61-72, 2012.

SANTAREM, A. A. A.; GREGGIANIN, G. F.; DEBASTIANI, R. G.; RIBEIRO, J. B. P.; POLLI, D. A.; SAMPAIO, R. N. R. Effectiveness of miltefosine-pentoxifylline compared to miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in C57B1/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, Julho/Agosto, v. 47, n. 4, p. 517-520, 2014.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Copaiba oil: alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID: 898419, DOI: 10.1155/2012/898419, 2012.

SANTOS, A.O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 108 (1), p. 59-64, Fevereiro, 2013.

SANTOS, L. Á.; CAVALHEIRO, A. J.; TEMPONE, A. G.; CORREA, D. S.; ALEXANDRE, T. R.; QUINTILIANO, N. F.; RODRIGUES-OLIVEIRA, A. F.; OLIVEIRA-SILVA, D.; MARTINS, R. C. C.; LAGO, J. H. G. Antitrypanosomal acetlylene fatty acid derivatives from the seeds of *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae). **Molecules**, v. 20, p. 8168-8180, DOI: 10.3390/molecules20058168, 2015.

SANTOS, S. R.; RANGEL, E.T.; LIMA, J.C.S.; SILVA, R. M.; NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; MARTINS, D.T.O. Toxicological and phytochemical studies of *Aspidosperma subincanum* Mart. stem bark (Guatambu). **Pharmazie**, Itália, v. 64, 836-839, 2009.

SANTOS, T. A.; FERREIRA, D. T.; PINTO, J. P.; FACCIONE M.; BRAZ-FILHO, R. New alkaloid from *Aspidosperma polyneuron* roots. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 0, p. 1-4, 2008.

SCHERZ-SHOVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **TRENDS in Cellular Biology**, v. 17, n. 9, p. 422-427, 2007.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcaloides Indólicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007, cap. 31, p. 819-846.

SEIFERT, K., CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species e its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal Medicinal Research**, Março, v. 123, p. 233-244, 2006.

SHAW, J. Leishmanial Taxonomy: a never ending academic challenge. In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1ª edição. Cap. 2, p. 6-10, 2011.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

SILVA, E. M.; VALENCIA, A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ROCHA, T. L.; FREIRE, E.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Inhibitory action of cerrado plants against mammalian and insect α -amylases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 141-146, 2009.

SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; MAGALHÃES, P. P. The antileishmanial flavonols quercetin and quercetrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 183-188, 2012.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.

SILVA, T. F. Abordagens da química medicinal para o planejamento de protótipos de fármacos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro. v. 5, n. 5, p. 921-933, 2013.

SILVEIRA, M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W.; et al. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, capítulo 4, p. 53-61, 2007.

SILVERSTEIN; R, M; WEBSTER; F. X.; KIEMLE; D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, 2012, 490 p.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 485-497, 2012.

SINGH, N.; MISHRA, B. B.; BAJPAI, S.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Natural Products based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.048>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA - SBF. **Soluções e Reagentes**. Disponível em: <http://www.sbfognosia.org.br/Ensino/solucoes_e_reagentes.html>. Acesso em: 20 fev. 2014.

SOUSA, M. C.; VARANDAS, R.; SANTOS, R. C.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALVADOR, J. A. R. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: synergistic effects with miltefosine. **Plos One**, Março, v. 9, n. 3, p. e89939, 2014.

SOUZA, A. C. M.; HASHIMOTO e SOUZA, L. K.; SILVA, M. R. R.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; SILVA, C. C.; TANAKA, J. C. A.; OLIVEIRA, A. J. B. Propriedades antifúngicas dos alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum*. In: **29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006. Águas de Lindóia, São Paulo. *Resumos...*São Paulo: ADALTECH, 2006.

SOUZA, J. P. M.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O.; LIMA, J. C. S.; SILVA, M. A. B. Avaliação da atividade hipolipêmica da plantas medicinais do cerrado matogrossense. **XVI Seminário de Iniciação Científica**, Cuiabá, MT, 2008b, 464 p.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes – A historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Junho, v. 103, n. 4, p. 313-325, 2008a.

SOUZA, W. Electron microscopy visualization of the cell surfasse of trypanosomatids. **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**, p. 77-87, 2007.

SOUZA, W. Structural Organization of the cell surfasse of pathogenic protozoa. **Micron**, v. 26, n. 5, p. 405-430, 1995.

STEFANELLO, T.F. Antileishmanial activity of *N*-butyl-[1-(4-methoxy)phenyl-9H- β -carbinile]-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* and development of thermoresponsive nanogels as carrier to hydrophobic drugs. 2014. 93 p. Tese (Doutorado – Área de concentração Biologia celular e Molecular) Universidade Estadual de Maringá. UEM, Maringá, PR, 2014.

STRUWE, L.; ALBERT, V. A.; BREMER, B. Cladistics and family level classification of the Gentianales. **Cladistics**, v. 10, p. 175-206, 1994.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOKJ. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science**, DOI: 10.1126/Science.1129720, setembro, v. 313, n. 5791 p. 1287-1290, 2006.

SUFFREDINI, I. B.; BACCHI, E. M.; SAKUDA, T. M. K.; OHARA, M. T.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D. Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of *Tabernaemontana angulata* stem organic extract. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Janeiro/março v. 38, n. 1, 2002.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; AGARWAL, D.; RAI, M.; MURRAY, H. W. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, Fevereiro, v. 11, p. 362-366, 2010

SURAPANENI, M. S.; DAS, S. K.; DAS, N. G. Designing paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. **International Scholarly Research Network Pharmacology**, ID 623139, DOI: 10.5402/2012/623139, 2012.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; BALANCO, J. M. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D. C. R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v.18, p. 250-254, 2004.

TALLARIDA, R. J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n1, 1-8, 2012.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FERREIRA, I. C. P.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; OLIVEIRA, A. J. B. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, Stuttgart- Jena- New York, v. 14, p. 377-380, 2007.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto – São Paulo, v. 39, p. 387-391, 2006.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T. J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352-1374, 2006.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; SOUZA, W. The cell biology of *Leishmania*: How to teach using animations. **PLOS Pathogens**, Outubro, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TEIXEIRA, J. P. **Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura**. 2012 p. 86. Dissertação (Mestrado - área de concentração: Toxinologia do Instituto Butantan) São Paulo, SP, 2012.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. e525-e532, 2011.

TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Jan., v. 49, n. 12005, p. 176–182, 2005.

TOLEDO, C. E.; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F.; SILVA, E. R.; MELLO, J. C. DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, Jan., v. 27; n.133(2), p.420-425, 2011.

TORRES, A. L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. efeito de extratos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (*Lepidoptera: Plutellidae*). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 151-156, 2001.

TORRES, Z. E. S.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, L. F. R.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C.; UCHOA, D. E. A.; BRAZ-FILHO, R.; POHLIT, A. M. Chemical composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and antiplasmodial activity of selected indole alkaloids. **Molecules**, DOI: 10.3390/molecules18066281. v. 18, p. 6281-6297, 2013.

TRICONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. B. Combination therapy with tamoxifen and anphotericin B in experimental cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2608-2613, 2014.

TRINDADE, R. C. P.; SILVA, P. P.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; LIMA, I. S.; PAULA, J. E.; SANT'ANA, E. G. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyrifolium* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n.12, p. 1813-1816, 2008.

UEDA-NAKAMURA, T., ATTIAS, M., SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v. 87, n. 2, p. 89-97, 2001.

UTTARO, A. D. Acquisition and biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by trypanosomatids. **Molecular e Biochemical Parasitology**, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.04.001>>. Acesso em; 24 jan. 2015.

VEIGA-SANTOS, P.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. *In vitro* anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology**, v.137, p. 1661-1670, 2010.

VENDRAMETTO, M. C.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoïd-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. **Parasitology International**, v. 59, p. 154-158, 2010.

VERPOORTE, R.; KOS-KUYCK, E.; TJIN, A. T. A.; RUIGROK, C. L. M.; BAERHEIM, S. A. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 48; n. 8, p. 283-289, 1983.

VERPOORTE, R.; RUIGROK, C. L. M.; BAERHEIM, S. A. Medicinal Plants of Surinam II: Antimicrobial Active Alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 46, n. 11, p. 149-152, 1982.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; Os produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; RONDON, F. C. M.; WILSON, M. E.; VIEIRA, I. G. P.; ANDRADE, H. F. Antileishmanial and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from caatinga biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Novembro, v. 32, n. 11, p. 1164-1168, 2012.

VINCENT, I. M.; WEIDT, S.; RIVAS, L.; BURGESS, K.; SMITH, T. K.; OUELLETTE, M. Untargeted metabolomics analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. **International Journal for Parasitology: drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 20-27, 2014.

VOLPATO, H., DESOTI, V. C., COGO, J., PANICE, M. R., SARRAGIOTTO, M. H., SILVA, S. D. O., UEDA-NAKAMURA, T., NAKAMURA, C. V. The effects of *N*-Butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* are mediated by mitochondrial dysfunction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. ID 874367,7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/874367>> . Acesso em: 5 abr. 2014.

WAGNER, H. Pesquisa Fitomédica no novo milênio: Tendências e Mudanças. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (orgs). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2ª Ed. Itajaí: Editora UNIVALI. Santa Catarina. 2009, cap. 2, p. 35-49.

WAGNER, H.; BLADT, S. Apendice A - Spray Reagents, p. 362 3 p. 264. **Plant drug Analysis. A thin layer chromatography atlas**. 2º edição: editora Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 368 p., 1996.

WALL, P. E. **Thin-layer Chromatography**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUNÓZ V.; CALLAPA J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 78, p. 193-200, 2001.

WHEELER, R.J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647-662, 2011.

WIEDER, T.; REUTTER, W.; ORFANOS, C. E.; GEILE, C. Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. **Progress in Lipid Research**, v. 38, p. 249-259, 1999.

WOODSON, R. E. Studies in the Apocynaceae. VIII. An Interim Revision of the Genus *Aspidosperma* mar. e Zucc. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Missouri. v. 38, n. 2, p. 119-206, 1951.

YORDI, E. G.; PÉREZ, E. M.; MATOS, M. J.; VILLARES, E. U. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. **INTECH Open Access Publisher**, 2012.

YUAN , Z.; WANG, H.; HU, Z.; HUANG, Y.; YAO, F.; SUN, S.; WU, B. quercetin inhibits proliferation and drug resistance in KB/VCR oral cancer cells and enhances its sensitivity to vincristine. **Nutrition and Cancer**, 2014, DOI: 10.1080/01635581.2015.965334.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; PEREIRA, L. I. A.; PELLI DE OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L.; ULIANA, S. R. B. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Vianna) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, Janeiro. v. 15, n, 1, p. 68-76, 2010.

ZHAO, L., AU, J. L. S., WIENTJES, M. G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 241, 2010.

ZHUKOVA, M. V., ROMANENKO, O. V., NIKOLAEVICH, V. A. Hemolytic properties of miltefosine in liposomes of various lipid compositions. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 44, n. 9, p. 507-509, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J, A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2007, cap. 23, p. 577-614.

**ANEXO A – Testes utilizados para Prospecção
Fitoquímica (MATOS, 2009).**

1- Teste para Fenois e Taninos

Utilizou-se um tubo de ensaio com 4 mL de solução extrativa, em seguida adicionou-se três gotas de FeCl_3 . Após, agitação observou-se a variação de cor ou formação de precipitado abundante, escuro. O tubo foi comparado com o branco (tubo contendo FeCl_3 e água). O resultado foi dado com base nas seguintes alterações:

- Coloração entre azul e o vermelho indicou a presença de compostos fenólicos, se o tubo do teste branco for negativo.
- Para taninos hidrolisáveis: presença de precipitado escuro de tonalidade azul.
- Para taninos condensados: presença de precipitado escuro de tonalidade verde.

2- Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonoides

Foram utilizados 3 tubos de ensaios com soluções extrativas de cada amostra, onde um tubo foi acidificado com HCl 0,1 N até pH 3, e os outros dois foram alcalinizados com NaOH 0,1 N até alcançarem pH 8,5 e pH 11. Logo em seguida, observou-se a alteração de cor nos tubos, os mesmos foram comparados com a tabela abaixo descrita por Matos (2009) e com os tubos brancos (solução extrativa sem alteração do pH) (Tabela 1).

Tabela 1 - Coloração indicativa da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonoides em função da mudança de pH.

Cor no interior dos tubos			
Constituintes	Ácido - pH 3	Alcalino – pH 8,5	Alcalino pH 11
Antocianinas e Antocianidinas	vermelha	lilás	azul-púrpura
Flavonas, Flavonois e Xantonas	-	-	amarela
Chaconas e Auronas	amarela	-	vermelha-púrpura
Flavonois	-	-	vermelha-laranja

Fonte: a autora, 2015, modificada de Matos, 2009.

3- Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas, Flavanonas

Utilizou-se dois tubos com as soluções extrativas, sendo um acidificado com HCl 0,1 N até pH entre 1 e 3 e outro alcalinizado com NaOH 0,1 N até pH 11. Após, os tubos foram aquecidos em manta aquecedora por 3 minutos. Utilizando o tubo branco usado no teste do item 2, a modificação ou intensificação na cor foi comparada e analisada de acordo com dados descritos na Tabela 2 abaixo, segundo Matos (2009).

Tabela 2 - Presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas em função da alteração da acidez ou basicidade do meio.

Constituintes	Meio no interior dos tubos	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	pardo-amarelada	-
Chaconas e Auronas	-	vermelho-laranja

Fonte: a autora, 2015, modificada de Matos, 2009.

4- Teste para Flavonois, Flavanonas, Flavononois e Xantonas (Reação de Shinoda).

Em tubo contendo 4 mL de solução extrativa foi adicionado magnésio em grânulos e em seguida adicionado 0,5 mL de HCl concentrado, após o término da efervescência pode-se observar a mudança de cor ou intensificação da mesma para vermelha ou um rosa intenso, indicando a presença de flavonois, flavanonas, flavanonois e/ou xantonas, que podem estar livres ou ligadas a seus heterosídeos. Sendo negativo para chalconas e isoflavonas.

5- Teste Geral para Alcaloides (Reagente de Dragendorff, de Mayer e Bertrand).

As soluções extrativas de cada amostra foram submetidas à pesquisa direta para verificação da presença de alcaloides utilizando os reagentes gerais: de

Dragendorff, Mayer⁷ e de Bertrand⁸. As soluções extrativas foram acidificadas com 20 mL de H₂SO₄ a 1%, sob aquecimento, após foram filtradas, resfriadas e divididas em porções de 3 mL em cada tubo, nos mesmos foram gotejados 1 a 2 gotas dos reagentes gerais para alcaloides descritos anteriormente. Em comparação com o branco, a visualização de precipitados alaranjados (Reagente de Dragendorff) e/ou aparecimento de precipitado ou turvação branca (Reagente de Mayer e Bertrand) indicaram a presença de alcaloides nas amostras (SBF, 2014).

6- Teste para Esteroides e Triterpenos (reação de Lieberman-Burchard)

Para este teste as soluções extrativas das amostras foram levadas a resíduo seco em béquer e extraído com 2 mL de CHCl₃, por três vezes. Triturando cuidadosamente o resíduo com o CHCl₃. Em seguida, foi filtrado para um tubo de ensaio e adicionado 1 mL de anidro acético (ELTACHEM[®]), após agitação suave foi adicionado três gotas H₂SO₄ concentrado, em capela de exaustão. Agitou-se mais uma vez suavemente e observou-se o aparecimento de cores. Quando há presença de um azul que desaparece rapidamente, dando lugar a um verde é indicativo de esteroides livres. Se houver uma coloração parda ou vermelha, indica a presença de tripernoides pentacíclicos livres.

7- Teste para Saponinas

Utilizou o resíduo da reação anterior de Lieberman-Burchard que foi insolúvel em CHCl₃, e dissolveu em 10 mL de água destilada, após filtração para tubos de ensaios, os mesmos foram vedados e agitados fortemente, por pelo menos 3 minutos. Após, observou o aparecimento de espuma no tubo, a presença de heterosídeos de saponinas é indicada pela espuma persistente e abundante (forma um colarinho de espuma no tubo).

8- Teste para Antraquinonas, Antronas e Cumarinas (reação de Bornträger)

Nos testes para antraquinonas e antronas foram preparadas soluções extrativas com 5 mL de éter etílico (SYNTH[®]) nos tubos de ensaios, em seguida foram

⁷ Misturou-se 1,35 g de cloreto de mercúrio (SYNTH[®]) em 60 mL de água, e 5 g de iodeto de potássio (SYNTH[®]) foram dissolvidas em 20 mL de água, as soluções foram misturadas e completadas para 100 mL de água.

⁸ Utilizou-se 5 g de ácido sílico-túngstico (BRASILABOR[®]) em água destilada q.s.p. para 100 mL.

adicionados 2 mL de solução de NH_4OH (SYNTH[®]) diluído. Agitou-se bem a mistura e esperou formar duas fases. Se na fase aquosa aparecer uma coloração rósea, vermelha ou violeta indica a presença de antraquinonas hidroxiladas. Para verificar a presença de cumarinas, este teste foi realizado em cromatoplaça de sílica gel (CCD), onde foram aplicadas as amostras e eluídas em fase móvel binária de CHCl_3 :MeOH (9:1). Após, borrifou-se uma solução de KOH (SYNTH[®]) 10%, depois de seca observou-se na placa de CCD a presença de manchas ou bandas de coloração azul no comprimento de onda de 366 nm, sendo indicativo da presença de cumarinas.

REFERÊNCIAS

MATOS, F. J. A. Roteiro Sequencial para a prospecção de constituintes químicos de extratos de plantas. In: **Introdução a Fitoquímica Experimental**, 3^o edição, Fortaleza: Edições UFC, 2009, cap. 4, p. 45-79.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA - SBF. **Soluções e Reagentes**. Disponível em: <http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/solucoes_e_reagentes.html>. Acesso em: 20 fev. 2014.

ANEXO B – Artigo Científico Publicado no periódico indexado da Capes: **PharmacologyOnline**. 30 de Abril, n. especial, v. 1, p.112-119, 2012.



Evaluation of antimicrobial activity of three *Aspidosperma* species

Pessini G.L.¹, Aquino P.G.V.¹, Bernardo V.B.¹, Costa M.A.², Nakamura C.V.², Ribeiro E.A.N.³, Sant'Ana A.E.G.⁴, Araujo-Júnior J.X.^{3,4,*}

¹Postgraduate students, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, UFAL, Maceio, AL, Brazil.

²Microbiology of Laboratory, Program of Postgraduate in Pharmaceutical Sciences, Maringá State University, UEM, Maringá, PR, Brazil.

³School of Nursing and Pharmacy, Federal University of Alagoas, UFAL, Maceio, AL, Brazil.

⁴Research Laboratory of Natural Resources, Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas, UFAL, Maceio, AL, Brazil.

*jotnaraujo2004@gmail.com

Abstract

Several species of the genus *Aspidosperma* are used in folk medicine as a potential agent against malaria, leishmaniasis, antimicrobial and inflammatory process. For this study we selected the species *Aspidosperma tomentosum*, *A. macrocarpum* and *A. pyriformis* commonly known as "peroba". The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of extracts and fractions of these species against strains of Gram positive and Gram negative bacteria and yeasts. We used ethanol extracts of root bark, stem bark, stem and root of *A. tomentosum*, *A. macrocarpum* were used ethanolic extracts of the twigs and stems, leaves, stem bark and stem, and the fractions obtained from crude extract of the stem. For the species *A. pyriformis* were used crude ethanol extract of the fruit, flower, root, root bark, bark of the wood and timber, and the fractions of crude ethanol extract of the wood. The antimicrobial activity was observed on strains of Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6623), Gram negative (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) and *Candida* species (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. tropicalis*), by broth microdilution test for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal and fungicidal concentration (MBC/MFC). The extracts and fractions of *A. macrocarpum* showed no activity against the tested bacteria (MIC > 1000 µg/mL) and ethyl acetate fraction (MIC 250 µg/mL) and the alkaloidal fraction (MIC 500 µg/mL) of the stem showed weak activity for *C. parapsilosis*. The crude extract of root bark of *A. tomentosum* showed a weak antibacterial activity in *S. aureus* and *B. subtilis* (MIC 1000 and 500 µg/mL, respectively) and showed no activity against yeasts (MIC > 1000 µg/mL). For the species *A. pyriformis* only the alkaloidal fraction of the wood showed a moderate activity with MIC of 125 and 250 µg/mL in *S. aureus* and *B. subtilis*, and the MBC was 1000 µg/mL for both bacteria. This fraction also showed a weak activity against *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* (MIC 500 µg/mL). Although there are ethnopharmacological reports about the popular use of some species of *Aspidosperma* as antimicrobial, as this study found no significant activity for this action in the extracts and fractions of *A. tomentosum*, *A. macrocarpum* and *A. pyriformis* against the tested microorganisms. Tests for verification of the action potential of these extracts on protozoa are being conducted.

Key words: *Aspidosperma tomentosum*, *Aspidosperma macrocarpum*, *Aspidosperma pyriformis*, antimicrobial activity

Introduction

The plant kingdom is responsible for the biggest part of chemical diversity known and reported in the literature (1).

It is estimated that 25% of modern medicine comes directly or indirectly from plants, and one third of the most prescribed and sold medicine in the world were developed from natural products (2, 3).

The species of the genus *Aspidosperma* belong to the family *Apocynaceae* and are restricted of Americas, they are found between Mexico and Argentina. Besides the good wood provided by the trees of *Aspidosperma* species, the barks are used as infusion by folk medicine from Amazonia (4, 5).

For this study we selected the species *Aspidosperma tomentosum* Mart., *A. macrocarpum* Mart., and *A. pyriforme* Mart., species commonly known as "peroba" in the most of Brazilian regions and as "carapanaúba" in Amazon region (6). Other denominations are used by folk medicine such as "peroba-do-campo" for species of *A. tomentosum* Mart., "pau-pereira" or "guatambu" for *A. macrocarpum* Mart. and "pereiro" or "pereiro-vermelho" for *A. pyriforme* Mart. species, in the "caatinga" region this species may reach 8 meters high (7).

When chemical constitution of *Apocynaceae* family is concerned one important characteristic is that the species of *Aspidosperma* present as indolic alkaloids chemotaxonomy markers, mainly the monoterpene considered as a group of molecules with great medicative potential (8, 9, 10).

Several species of genus *Aspidosperma* are used in folk medicine as a potential agent against malaria, leishmaniasis, antimicrobial, antiinflammatory process (uterus and ovary), rheumatism, against cancer, stomach diseases, diabetes, cholesterol, hypertension and erectile dysfunction (10, 11, 12, 13, 14).

Based on these ethnopharmacology information some studies about biological action of *Aspidosperma* species were reported, as an exam-

ple, antibacterial action of *A. ramiflorum* extract which demonstrated a good activity on *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* and of *A. pyriforme* and *A. olivaceum* extracts which present moderate action on *B. subtilis* (15).

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of extracts and fractions of species *A. tomentosum* Mart., *A. macrocarpum* Mart., and *A. pyriforme* Mart against strains of Gram positive and Gram negative bacteria and yeasts.

Methods

Plants collection

The root and stem barks of *A. tomentosum* species were collected in May 2004; twigs, stems, stem bark and leaves of *A. macrocarpum* were collected in November 2007, both in Planaltina city - GO - Brazil. The fruit, flower, root, root bark of the wood and bark of the plant species *A. pyriforme* were collected in October 2001 in São José da Tapera - AL - Brazil. The species were identified by the botanist Dr. J. E. de Paula, the University of Brasilia (UnB), where a voucher specimen of each specimen is deposited. Voucher specimen: *A. tomentosum* n. JEP 3732 (UnB); *A. macrocarpum*: n. JEP3767 (UnB); *A. pyriforme* - n. JEP 3686 (UnB).

Plant extract and fractionation

The material collected from three species of *Aspidosperma* (*A. tomentosum*, *A. macrocarpum* and *A. pyriforme*) was dried in a circulating air hothouse at medium temperature of 45 °C, for 72 h and grinded in knife mill Tecnal Marconi mod. TE 048, and stored in a dark and dry place to be used in the extract preparation.

Aspidosperma tomentosum extraction

The powder of stem barks (3.6 kg), root barks (2.4 kg), stem (3.0 kg) and root (2.0 kg) of *A. tomentosum* Mart., was submitted to extraction in perco-

lator with 95% ethanol at environmental temperature ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), in three cycles of 72 h each, the ethanolic solution was concentrated under reduced pressure at 40°C in rota-evaporator unit to remove the solvent, providing respectively the crude ethanolic extract of *A. tomentosum*: root bark (AT₁ – 230.60 g), stem bark (AT₂ – 316.50 g), stem (AT₃ – 320.40 g), and root (AT₄ – 250.80 g). In this study for *A. tomentosum* species only crude extract was tested.

Aspidosperma macrocarpum extraction

Percolation with 95% ethanol was done, in three cycles of 72 h each, with powder of stem barks (4.0 kg), leaves (1.6 kg), stems (3.5 kg) and branches (1.2 kg) of *A. macrocarpum*, the procedure was conducted at environmental temperature ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). After this, the ethanolic solution was concentrated under reduced pressure at 40°C in rota-evaporator unit, providing the crude ethanolic extract of *A. macrocarpum*: of branches and stems (AM₁ – 187.10 g), leaves (AM₂ – 436.00 g), stem barks (AM₃ – 507.00 g), and stem (AM₄ – 560.00 g).

From the ethanolic crude extract of stem (AM₄) of *A. macrocarpum* liquid-liquid partition was made. After the extract dissolution in methanol/water (3:2) the partition with hexane was made, from this procedure the hexanic fraction (AM₄ – 7.8 g) was obtained. The fraction methanol/water (3:2) (AM₄F.M. – 14.5 g) was also used for the antimicrobial, and from this fraction more three partitions were made: in chloroform, ethyl acetate, and butanol, providing the following fractions; chloroformic fraction (AM₄F.C. – 52.15 g), ethyl acetate fraction (AM₄F.A. – 2.7 g), and butanolic fraction (AM₄F.B. – 28.7g).

The ethanolic crude extract of stem (AM₄) of *A. macrocarpum* was submitted to acid/basis extraction to obtain alkaloids (16). In this extraction 10 g of ethanolic crude extract was used, 892 mg of alkaloidal fraction was obtained (AM₄F.ALC.). The precipitant of organic fraction (AM₄F.O.1. – 5.00 g) was separated to be used in antimicrobial tests, the

supernatant of organic fraction and the aqueous fraction (AM₄F.AQ – 3.50 g.) all of them obtained from alkaloids extraction of ethanolic crude extract (AM₄) of *A. Macrocarpum* stem. The solvents were removed of the fractions through rota-evaporation under reduced pressure at 40°C .

Aspidosperma pyrifolium extraction

The ethanolic crude extracts of *A. pyrifolium* were obtained from stem bark (3.0 kg) (AP₃ – 150.00 g), stem (2.8 kg) (AP₄ – 150.00 g), root bark (1.0 kg) (AP₉ – 70.00 g), root (1.5 kg) (AP₁₂ – 80.00 g), flowers (0.2 kg) (AP₁₁ – 10.00 g) and from the fruit (0.50 kg) (AP₁₀ – 25.00 g). The process for obtaining these extracts was performed in a Soxhlet apparatus, in 95% ethanol, for 72 h, the ethanolic solution was concentrated under reduced pressure at 40°C in rota-evaporator unit.

The ethanolic crude extract of the stem bark of *A. pyrifolium* was dissolved in methanol (300 mL) and water (450 mL), of mixtures (hydromethanol fraction) resulting was performed an ethyl acetate partition. The ethyl acetate fraction (AP₁ – 91.00 g) and hydromethanol (AP₂ – 55 g) obtained were concentrated under reduced pressure in rota-evaporator at 40°C .

To fractionate the ethanolic crude extract of the stem (AP₄) of *A. pyrifolium* first a liquid-liquid partition, the ethanolic crude extract (AP₄) was solubilized in water and submitted to the ethyl acetate and butanol, from this process the following fractions were obtained: ethyl acetate (AP₅ – 89.00 g), butanolic (AP₆ – 10.00 g) and aqueous (AP₇ – 50.00 g). From the fraction AP₅ (40.00 g) the extraction for alkaloid was performed (16). After the solubilization in chloroform and extraction with HCl 0.1 N, the following fractions were obtained: the organic one (AP₅-FO – 21.50 g) and the acid fraction (AP₈ – 19.20 g) from the extraction for alkaloids. After the basification with Na_2CO_3 and after new extraction in chloroform the following fractions were obtained: alkaloidal (AP₅.ALC. – 4.30 g) and the aqueous (AP₅.AQ. – 17.00 g) from *A. pyrifolium*

stem.

All the extracts and fractions described above were tested for antimicrobial activity reported in this study.

Microorganisms used and growth conditions

The antimicrobial activity was observed on strains of Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus subtilis* ATCC 6623), Gram negative (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) and *Candida* species (*Candida albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. tropicalis*). The bacteria were grown in nutrient broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) at 37 °C and maintained on nutrient agar slants at 4 °C. The yeast grown maintained on Sabourand-dextrose agar (Merck SA, São Paulo, Brazil).

Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of all extracts, fractions and reference antibiotics (tetracycline, vancomycin, penicillin, and nistatin - Sigma) were determined by microdilution techniques in Mueller-Hinton broth (Merck) for bacteria and RPM-1640 medium (Sigma) for yeast (17). Inoculate was prepared in the same medium at a density adjusted to a 0.5 McFarland turbidity standard (10⁸ colony-forming units [CFU]/mL) and diluted 1:10 for the broth microdilution procedure. Microtiter trays were incubated at 37 °C and the MICs were recorded after 24 h of incubation. Two susceptibility endpoints were recorded for each isolated. The MIC was defined as the lowest concentration of compounds at which the microorganism tested does not demonstrate visible growth. MBC (Minimum Bactericidal Concentration) and MFC (Minimum Fungicidal Concentration) was defined as the lowest concentration yielding negative subcultures or only one colony (17).

Results

The crude ethanolic extract of root bark of *A. tomentosum* (AT₁) showed a weak antibacterial activity of *S. aureus* and *B. subtilis* (MIC 1000 and 500 µg/mL, respectively) (Table 1) and no activity against yeasts (MIC >1000 µg/mL). For the species *A. pyriformis* only the alkaloidal fraction (AP₅.ALC) of the wood showed moderate activity with MIC of 125 and 250 µg/mL in *S. aureus* and *B. subtilis* (Table 1), and the MBC was 1000 µg/mL for both bacteria. This fraction (AP₅.ALC) also showed a weak activity against *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* (MIC 500 µg/mL) (Table 2). The extracts and fractions of *A. macrocarpum* showed no activity against the tested bacteria (MIC >1000 µg/mL), and ethyl acetate fraction (AM₄F.A) (MIC 250 µg/mL) and the alkaloidal fraction (AM₄F. ALC) (MIC 500 µg/mL) of the stem showed weak activity for *C. parapsilosis* (Table 2). The other extracts and fractions tested did not show activity against the tests (MIC >1000 µg/mL).

see Table 1.

see Table 2.

Discussion

The antimicrobial activity of extracts and fractions of *Aspidosperma* species tested against Gram positive and Gram negative bacteria and *Candida* species in this study did not present significant results. Although results from the literature describe the use of *Aspidosperma* species from Suriname with antimicrobial as the one observed for alkaloid type secamine and the indolic alkaloid dihydrocorynantheol isolated from stem barks of *A. macrogravianum* Woodson active against Gram positive bacteria and the activity of indolic alkaloids aspidoscarpine, reserpine and reserpiline against *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *P. aeruginosa* and *E. coli* (18).

The alkaloids isolated from the root barks of *A. excelsum* Benth present activity against Gram positive bacteria *B. subtilis*. However its were inactive against Gram negative bacteria. Among the active alkaloidal structures type secamine reported in the study two new ones were described 16-hydroxytetrahydrosecamine and 16-hydroxy,16-

demethoxycarbonyltetrahydro secamine (19).

The antibacterial activity was also reported for the ethanolic extract obtained from the wood *A. polyneuron* known as "peroba-rosa" which presented strong action against *Proteus mirabilis*. The microbiological assay was performed through the diffusion method in solid medium through plaque cavity. A qualitative analysis of this extract presented positive result for presence of phenols and total alkaloids (20).

The ethanolic extract from root, stem and leaf of *A. polyneuron* presented antifungal activity on *Cladosporium herbarum* through the method bio-revelation on plates of thin layer chromatography (21). Another study reported the presence of a new alkaloid isolated from ethanolic extract of *A. Polyneuron* roots, it was identified as 2,7-dihydroxiquibrachamina (22).

The antibacterial action of methanolic extract and fractions obtained after acid/basis and the pure substance obtained from the stem bark of *A. ramiflorum* species were evaluated through the microdilution in broth Mueller-Hinton technique. The methanolic extract demonstrated moderate activity against *B. subtilis* (MIC: 250 µg/mL) and *S. aureus* (MIC: 500 µg/mL), and they were inactive against *E. coli* and *P. aeruginosa* (MIC: > 1000 µg/mL). While the fraction denominated IV, obtained from chloroform fraction of acid/basis extraction presented a good activity against *B. subtilis* and *S. aureus* (MIC: 15,6 µg/mL) and moderated action against *E. coli* and *P. aeruginosa* (MIC: 250 µg/mL). The pure substances denominated ramiflorines A and B (bis-indolic alkaloids), both, presented good activity against *S. aureus* (MIC: 25 µg/mL) and *Enterococcus faecalis* (MIC: 50 µg/mL) (23).

According to another study performed with ethanolic crude extract of several species of plants collected in Atlantic forest region in São Paulo - SP - Brazil, just the extract of *A. ramiflorum* branches and leaves presented weak activity against *E. coli* (inhibition zone: 2.5 e 1.4 mm, for branch and leaf, respectively). The microbiological assay was performed through the diffusion method in solid medium

through plaque cavity. The extract demonstrate itself inactive for *S. aureus* and *C. albicans*, as well the extract from *A. Olivaceum* species did not present activity (24).

Antifungal properties were also reported for *A. ramiflorum* alkaloids. The ramiflorine, a substance was more active demonstrating a good antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* (MIC: 3,12 - 12,5 µg/mL) (25). Study performed with ethanolic crude extract of *A. pyricolum* and *A. olivaceum* (MIC: 125 e 250 µg/mL, respectively) demonstrated a moderate antibacterial activity against *B. subtilis* (15).

The minimum inhibitory concentration demonstrated for the ethanolic extract of root barks of *A. tomentosum* (AT₁) was weak for *S. aureus* (1000 µg/mL) and *B. subtilis* (1000 µg/mL), considered inactive for Gram negative bacteria which were tested (Table 1). The extract of *A. tomentosum* tested did not present activity for *Candida* species.

According to the literature reports the ethanolic extracts of *A. tomentosum* demonstrated activity on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (14). Good results were reported for antiproliferative action of the terpenic fraction of dichloromethane extract obtained from aerial parts of *A. tomentosum* on lineages of human cells: MCF7 (breast) e NCI460 (lung) (26).

The alkaloidal fraction (AP₅.ALC) obtained from stem of *A. pyrifolium* specie demonstrated moderate activity for *S. aureus* and *B. subtilis* (MIC: 125 e 250 µg/mL, respectively) (Table 1), and weak activity against *C. parapsilosis* (500 µg/mL) and *C. tropicalis* (500 µg/mL) (Table 2).

However the insecticide activity against *Plutella xylostella* larvae was reported for ethanolic extracts of stem barks, fruit and root of *A. pyrifolium* with mortality rate of 51,716% for the barks extracts, 13,320% for root extract and 11,73% for fruit extract. Sub-fractions obtained from ethanolic extract of stem bark presented 100% of mortality on *P. xylostella* larvae. The insecticide activity of these sub-fractions was related for the presence of indolic

monoterpenoids alkaloids: aspidofractine, 15-demetoxipirifoline e N-formilaspidofractiea isolated from *A. pyriformium* (27).

A study demonstrated low antiplasmodial action of aspidolimidina alkaloid from *A. pyriformium* Mart, and citotoxicity due to the tetrahydrofurane ring presence (28).

The antimicrobial action of *A. macrocarpum* specie was observed only for the ethyl acetate fraction (AM4F.A) (MIC 250 µg/mL) and alkaloidal fraction (AM4F. ALC) (MIC 500 µg/mL) obtained from stem ethanolic extract.

According to literature data the extract obtained from the leaves of *A. macrocarpum* presented activity against amastigote form of *T. cruzi* (IC₅₀: 59.212 %) (29). The extract obtained from root stem of *A. macrocarpum* demonstrated activity on *Plasmodium falciparum* (IC₅₀: 4.9 g/mL) (30).

Aspidosperma species have been chemically investigated and special emphasis is given to endolic alkaloids. According to the literature the search for new bioactive substances of *Aspidosperma* specie represent great scientific interest, as the structural diversity of indolic alkaloids present in all the species of this genus.

Among other species of *Aspidosperma* which presented phytochemical study, can be listed as chemical constituents of *A. illustre*, where it were isolated two indolic monoterpenes alkaloids, β-ioimbine and 1,2-dihidroaspidospermidine besides the triterpenes molecules (5). Indolic alkaloids type elipticine and N-metiltetra-hidroelipticine were isolated from *A. Vargasii* and the aspidocarpine compound of *A. desmanthum* (31). Two new endolic alkaloids with plumerano skeleton were obtained from methanolic extract from stem barks and seeds of *A. spruceanum* (32). A new alkaloid isolated from ethanolic extract of *A. polyneuron* roots was identified as 2,7-dihidroxi quebrachamine (22). From stem barks of *A. pyriformium* the 15-demetoxipirifoline, aspidofractine and N-formilaspidofractine (33) were isolated.

Study related with antiprotozoal activity are also

described in ethnopharmacological reports and are proved in studies performed with extracts and alkaloids isolated from *Aspidosperma* species, especially activity against *P. falciparum* and trypanosomatids. An example, the active alkaloids *A. ramiflorum* against *Leishmania braziliensis* and *L. amazonensis* (23, 34). Other *Aspidosperma* species reported in the literature against malaria are *A. quebracho-blanco* zschlechdt., *A. polyneuron* Muell., *A. album* (Vahl) Benoist, *A. discolor* DC., *A. excelsum* Benth., *A. nitidum* Benth (35, 36).

Due to the great variety and chemical peculiarity of compounds structures, especially alkaloids, found among species of *Aspidosperma* genus, it can justify the gamma of biological activities described for these plants used by the traditional medicine (10).

Conclusions

Although there are ethnopharmacological reports about the utilization of some species of *Aspidosperma* with antimicrobial activity, this study found no significant activity for the extracts and fractions of *A. tomentosum*, *A. macrocarpum* and *A. pyriformium* against the tested microorganisms. Despite the great quantity of studies reported in the literature about the chemical isolation of indolic alkaloids of *Aspidosperma* species, new chemical structure are being identified proving the chemical diversity, and the gamma of therapeutical application of *Aspidosperma* species. Tests for verification of the potential activity of these extracts on protozoa are being conducted.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Capacitação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas, FAPEAL, and Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia,

Universidade Federal de Maceió. The authors would like to thank Marinete Martinez Vicentin for skillful technical assistance.

References

- Viegas Júnior C, Bolzani VS, Barreiro EJ. Os produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quim Nova* 2006; 29(2): 326-337.
- Shu Y. Recent natural products based drug development. A pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod* 1998; 61:1053-1071.
- Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Rev Soc Bras Prog Clin* 2003; 3:37-9.
- Pereira MM, Jácome RLRP, Alcântara AFC, Alves RB, Raslan DS. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quim Nova* 2007; 30(4):970-983.
- Barbosa LF, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira U. Chemical Constituents from *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). *J Brazil Chem Soc* 2010; 21(8):1434-1438.
- Henrique CM, Nunomora SM, Pohlit AM. Alcalóides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Quim Nova* 2010; 33(2):284-287.
- Lorenzi H. *Arvóres brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2002.
- Nunes DS. Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*. *Aspidosperma prunosum* Markgraf. 1980. 177 p. Dissertação, Campinas.
- Pereira MM, Alcântara AFC, Piló-Veloso D, Raslan DS. NMR structural analysis of Braznitidumine: A new indole alkaloid with 1,2,9-triazabicyclo [7.2.1] system, isolated from *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). *J Braz Chem Soc* 2006; 17(7): 1274-1280.
- Oliveira VB, Freitas MSM, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira U. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. *Braz J Med Plan* 2009; 11(1): 92-99.
- Lino RC, Garrote CFD. Isolamento dos alcalóides indólicos presentes na casca do caule de *Aspidosperma subincanum* Mart., para obtenção de padrões com finalidade de desenvolvimento de metodologia para doseamento com marcadores de matéria-prima vegetal. *Rev Eletr Farm*. 2005; (2):107-109.
- Campos RA, Lima Júnior RCP, UCHOA DEA, Silveira ER, Santos FA, Rao VSN. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 104:240-244.
- Barbosa LF, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira U. Chemical Constituents from *Aspidosperma illustre* (Apocynaceae). *J Braz Chem Soc* 2010; 21(8):1434-1438.
- Marcondes ABS, Melo LVL, Ribello RV, et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipêmica e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 2010; 20 (4):549-562.
- Oliveira AJB, Kolke L, Reis FAM, et al. Preliminary Studies on the Antibacterial Activity of Ethanol Crude Extracts and Alkaloids from Species of *Aspidosperma*. *Pharm Biol* 2009; 47:1085-1089.
- Marinho AF. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação da Warifiteína em Extratos de Cissampelos Sympodioides Eichl (Milona). Tese de Doutorado. LTF, PPGPNSB, UFPA, João Pessoa, PB, 2008.
- CLSI. 7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: third edition (M27-A3). Wayne, PA: CLSI; 2008.
- Verpoorte R, Ruijgrok CLM, Baerheim Svendsen A. Medicinal Plants of Surinam II: Antimicrobial Active Alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. *Planta Med* 1982; 46(11):149-152.
- Verpoorte R, Kos-Kuyck E, Tjin A Tsoi A, Ruijgrok CLM, Baerheim Svendsen A. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. *Planta Med* 1983; 48(8):283-289.
- Granato D, Nunes DS, Mattos PP, et al. Chemical and Biological Evaluation of Rejects from the Wood Industry. *Brazil Arch Biolog Technol* 2005; 48:237-241.
- Ferreira DT, Silva Jr JV, Soeira LS, et al. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos etanólicos de raiz, caule e folha de *Aspidosperma polyneuron*. XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQ SUL) 2003, Pelotas, RS, Brasil, resumos: QO-83.
- Santos TA, Ferreira DT, Pinto JP, Faccione M, Braz-Filho R. New alkaloid from *Aspidosperma polyneuron* roots. *Nat Prod Commun* 2008; 3(0):1-4.
- Tanaka JCA, Silva CC, Oliveira AJB, Nakamura CV, Dias Filho BP. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39:387-391.
- Agripino Dg, Lima MEL, Silva MR, et al. Screening of Brazilian Plants for Antimicrobial and DNA-Damaging Activities. I. Atlantic Rain Forest - Ecological Station Juréia-Itatins. *Biota Neotropica* 2004; 4(2):1-15.
- Souza ACM, Hasimoto LKS, Silva MRR, et al. Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. In: 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2006. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil. Resumos. São Paulo: ADALTECH.
- Kohn LK, Pizão PE, Foglio MA, et al. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. *Rev Bras Pl Med* 2006; 8:110-115.
- Trindade RCP, Silva PP, Araújo Júnior JX, Lima IS, Paula JE, Sant'ana EG. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyriforme* ethanolic extracts. *Pesq Agropec Bras* 2008; 43(12): 1813-1816.
- Miataine-Offier AC, Sauvalin M, Valentin A, Callapa, J, Mailhé M, Zèches-Hanrot M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomed* 2002; 9:142-145.
- Mesquita ML, Desrivot J, Borjes C, Fournet A, Paula JE, Grellier P. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(7):783-787.
- Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, Paula JE, Espindola LS. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol* 2007; 110:165-170.
- Henrique CM, Nunomora SM, Pohlit AM. Alcalóides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Quim Nova* 2010; 33(2):284-287.
- Oliveira VB, Vieira U, Braz-Filho R, et al. Spruceanumines A and B, Novel Plumeran indole alkaloids from *Aspidosperma spruceanum* (Apocynaceae). *J Braz Chem Soc* 2009; 20(4): 753-759.
- Araújo Júnior JX de, Antheaume C, Trindade RCP, Schmitt M, Bourguignon JJ, Sant'ana AEG. Isolation and characterisation of the monoterpene indole alkaloids of *Aspidosperma pyriforme*. *Phytochem Rev* 2007; 6:183-188.
- Ferreira ICP, Lonardoni MVC, Machado GMC. Antileishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(3): 325-327.

35. Bourdy G, Oporto P, Gimenez A, Deharo E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. *J Ethnopharmacol* 2004; 93:269-277.

36. Botsaris AS. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora medicinal. *J Ethnobiol Ethnomedicine* 2007; 3(18):1-8.

Samples	Minimum Inhibitory Concentrations – MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AT1	1000	500	>1000	>1000
AP5.ALC	125	250	>1000	>1000
Penicillin	0.019	-	-	-
Vancomycin	-	0.18	-	-
Tetracycline	-	-	1.57	3.15

Table 1. Minimum Inhibitory Concentrations of *A. tomentosum* and of *A. pyriformis* in bacteria Gram positive and Gram negative.

AT1: crude ethanolic extract of root bark of *A. tomentosum*.

AP5.ALC: alkaloidal fraction of wood of *A. pyriformis*.

Samples	Minimum Inhibitory Concentrations – MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
AM4.F.A	>1000	250	1000
AM4.F.ALC	>1000	500	500
AP5.ALC	>1000	500	500
Nystatin	1.56	1.56	3.12

Table 2. Minimum Inhibitory Concentrations of the fraction of *A. macrocarpum* and of *A. pyriformis* in *Candida* species.

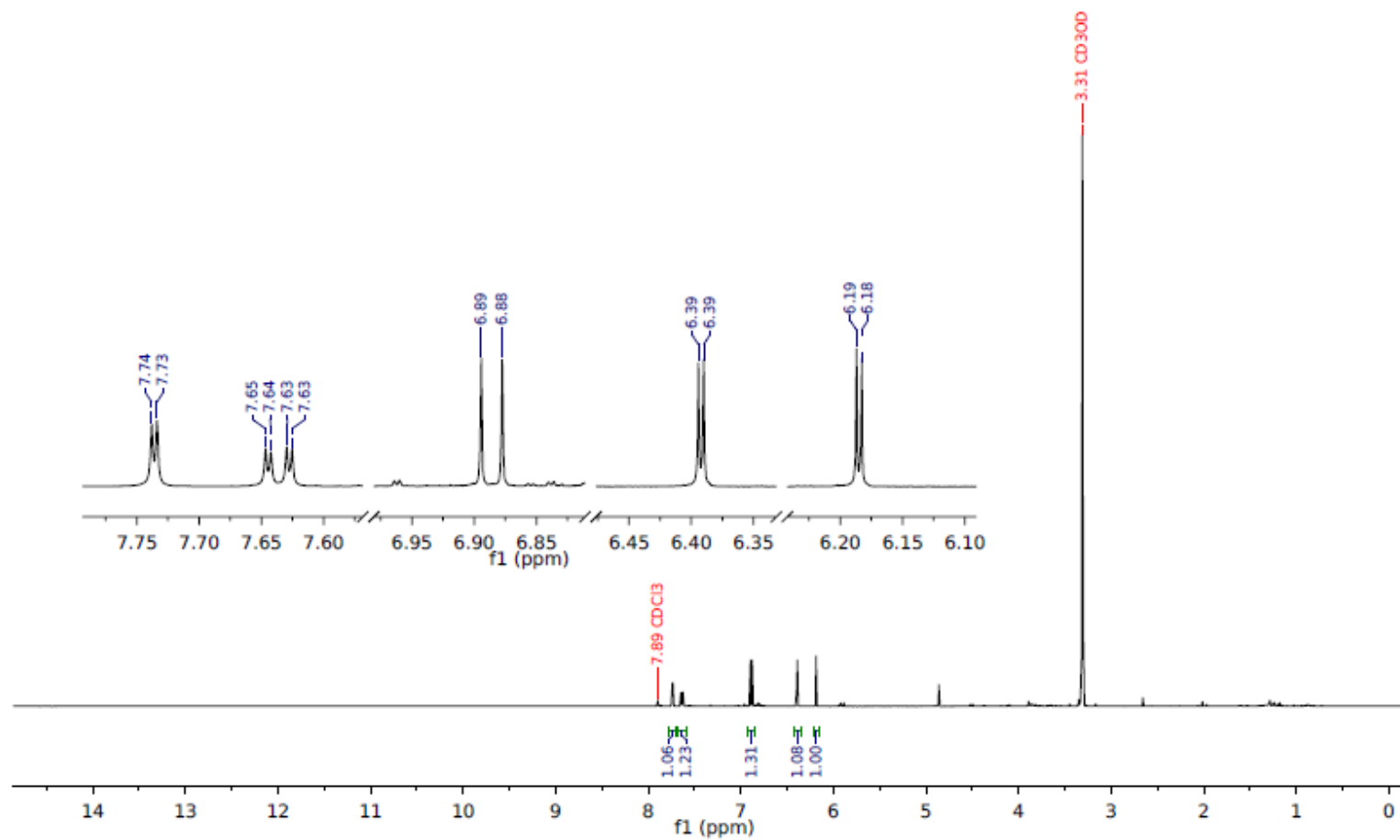
AM4.F.A: ethyl acetate fraction of stem of *A. macrocarpum*.

AM4.F.ALC: alkaloidal fraction of stem of *A. macrocarpum*.

AP5.ALC: alkaloidal fraction of wood of *A. pyriformis*.

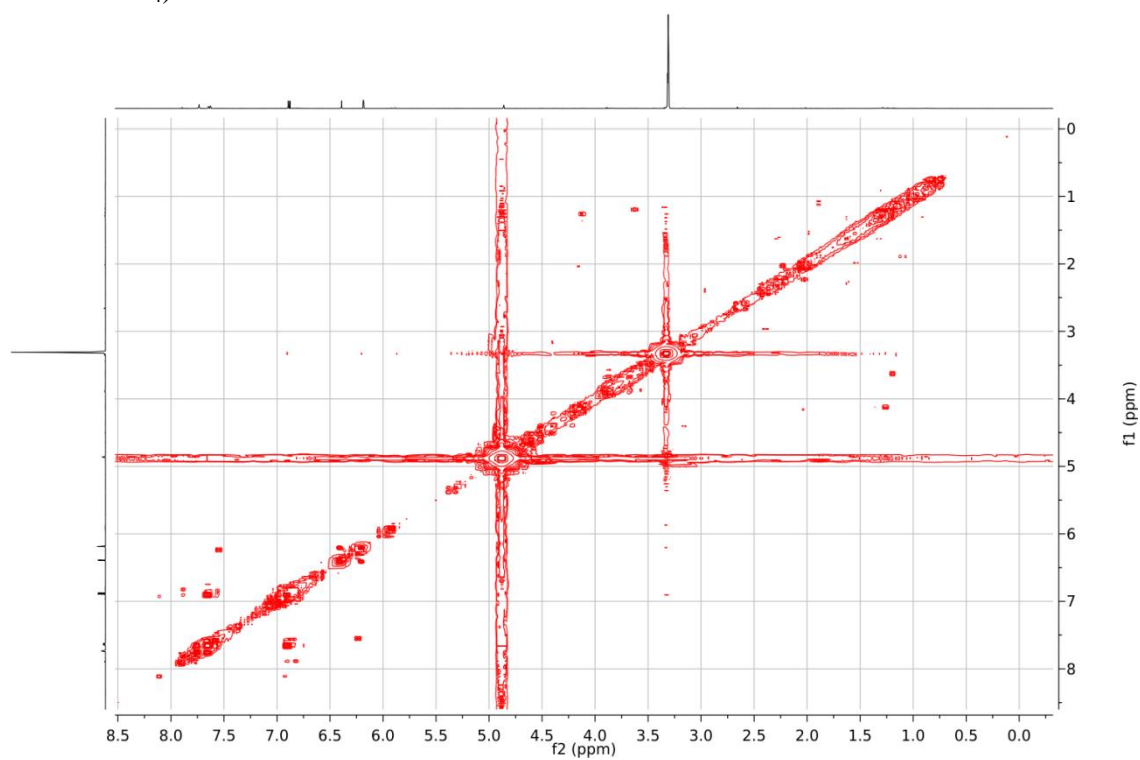
ANEXO C – Espectros de RMN de ^1H , COSY e HMBC
da Fração F.21-22.

Anexo 1: Espectro total e expansões de RMN de ^1H da fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4).



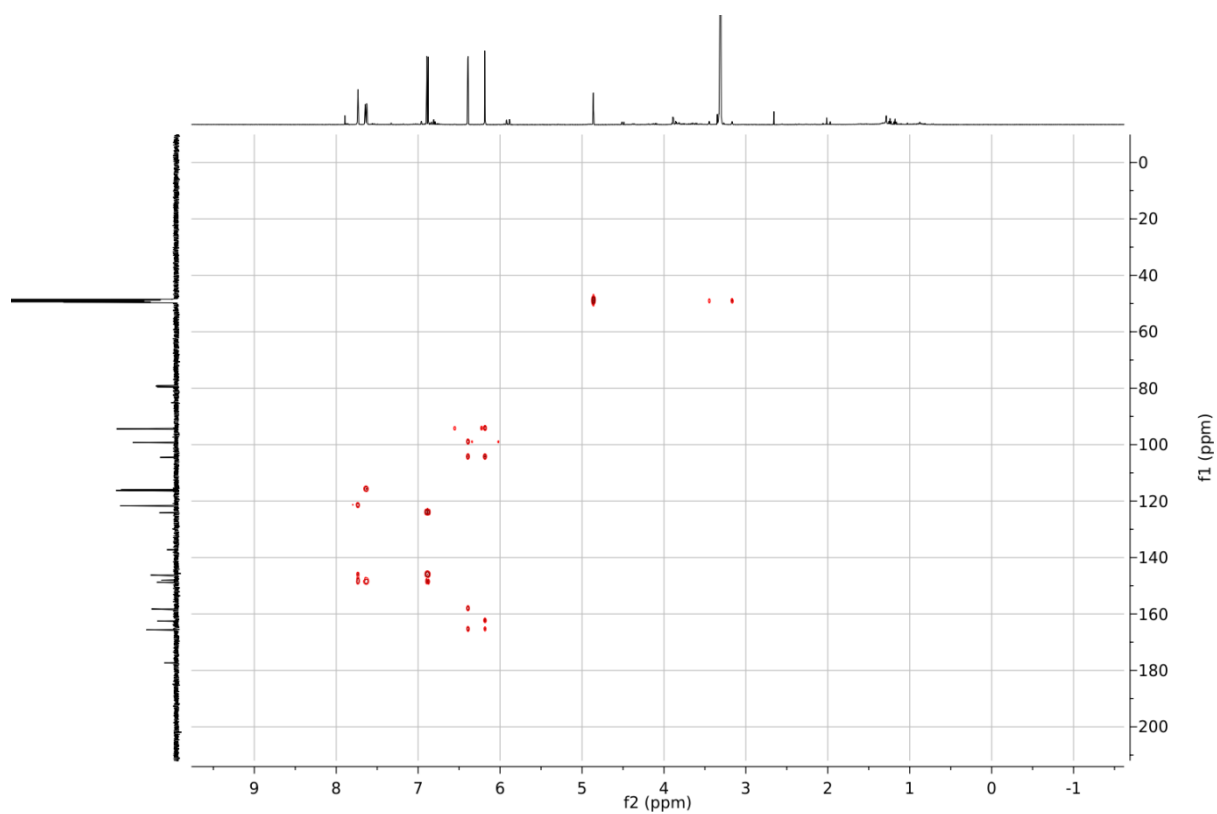
Fonte: a autora, 2015.

Anexo 2: Mapa de contornos COSY total para a fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4).



Fonte: a autora, 2015.

Anexo 3: Mapa de contornos HMBC total para a fração F.A-21-22 (500 MHz, Metanol- d_4).



Fonte: a autora, 2015.