

MISLAINE ADRIANA BRENZAN

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTILEISHMANIA DO *Calophyllum brasiliense* Cambess (CLUSIACEAE).

Dissertação apresentada por Mislaine Adriana Brenzan ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produtos Naturais Biologicamente Ativos como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez

Co-orientadora: Prof. Dra. Izabel Cristina Piloto Ferreira

MARINGÁ

2006

Dedico este trabalho

Aos meus pais, João e Irene, ao meu irmão, Marcelo e ao meu noivo, Amilton, pelo incentivo,  
amor, paciência e atenção a mim dedicados.

## AGRADECIMENTOS

“Nenhum trabalho é mérito de somente uma pessoa, pois é impossível realizar algo sozinho. Muitas foram as pessoas que tornaram este trabalho algo possível de ser realizado. Desta forma seria inoportuno e talvez injusto tentar agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente me incentivaram e me auxiliaram na conclusão deste trabalho, pois certamente minha memória me trairia. A todos, meus sinceros agradecimentos e meu reconhecimento à enorme contribuição à mim dedicada.”

Ao meu orientador e amigo professor Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez, meus sinceros agradecimentos, não somente pela orientação firme e segura demonstrada na elaboração deste trabalho e pela oportunidade de realizá-lo, mas também pelo incentivo contínuo aos meus estudos, pela confiança e amizade a mim dedicados nesses anos de convivência.

A minha co-orientadora e amiga professora Dra. Izabel Cristina Piloto Ferreira agradeço pela colaboração no desenvolvimento do estudo da atividade antileishmania, pelas sugestões e correções do trabalho. Assim como pelo incentivo, amizade e paciência a mim dedicados.

A professora Dra. Maria Valdrinez Campana Lonardoni, agradeço pelas orientações e por tornar possível o estudo da atividade antileishmania.

Aos professores Dr. Celso Vataru Nakamura e Dra. Tânia Ueda-Nakamura, meus sinceros agradecimentos, pela colaboração no desenvolvimento do estudo da atividade antileishmania, principalmente no auxílio à realização da microscopia eletrônica e também pelos conselhos valiosos.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade de São Carlos, Dr. Antônio Gilberto Ferreira pelo auxílio na realização dos espectros de HMBC, HSQC e ao Dr. Edson Rodrigues Filho pelo auxílio na obtenção dos espectros de massas e dos cromatogramas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Pela localização, oferta da espécie vegetal e pela identificação botânica sou grata a professora Dra. Maria Cláudia Young do Instituto de Botânica de São Paulo.

Agradeço aos técnicos do laboratório de Farmacognosia Admir, do laboratório de Farmacologia Endócrina Carlos, do laboratório de Microbiologia Básica Marinete pelas contribuições oportunas e principalmente a técnica do laboratório de química, Ivânia pelo auxílio na obtenção dos espectros de RMN.

A acadêmica Paula, estagiária no Laboratório de Imunologia Básica, pelas contribuições práticas.

Aos colegas da pós-graduação Lúcia, Sharize, Juliana, Andréa, Cecília, Michelle, Daniel, Raíssa e Vanessa; e aos colegas do laboratório de Farmacognosia Mariele e Cindy pelo adorável convívio, companheirismo e incentivo nos dias desânimo.

Agradeço a aluna de iniciação científica do laboratório de Microbiologia Básica, Adriana por me ensinar as técnicas para trabalhar com protozoários, assim como pela amizade, paciência e incentivo.

As secretárias do Departamento de Farmácia e Farmacologia, Helena e Sônia pela amizade, gentileza e eficiência com que sempre me auxiliaram.

A todos da minha família, principalmente meus pais Irene e João, meu irmão Marcelo que com amor e compreensão, torceram por mim me ajudando a vencer mais esta etapa da minha vida.

Ao meu noivo Amilton, que sempre esteve ao meu lado, compreendeu as minhas ausências e me incentivou a sempre caminhar para realização dos meus sonhos.

Às Instituições Financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas desta Universidade, pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho.

E a todas as pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada.

E especialmente quero agradecer a Deus, pela vida, pelas oportunidades e por me proporcionar sabedoria nas minhas escolhas.

*“A razão, na melhor das hipóteses, é apenas uma função negativa. Revela-nos somente os limites do nosso conhecimento e da nossa experiência. Nunca poderá revelar-nos a profundidade. Não nego mais do que afirmo. Porque, o negar assim como o afirmar, implica um senso de conhecimento. Moralmente, entretanto, conservo minha crença? Não me importa; não sei; isso não me diz respeito, mas sei que existe um Deus!” (Hume).*

## RESUMO

O presente trabalho consistiu no estudo das folhas da espécie vegetal *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), conhecida como guanandi e utilizada popularmente para o tratamento de reumatismo, varicoses, hemorróidas e úlceras crônicas, e sua atividade biológica sobre *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. O estudo fitoquímico incluiu o processo de extração e fracionamento biomonitorado por métodos cromatográficos até isolamento das substâncias F1.12 e F7.53. Estas substâncias foram identificadas através de análises espectrais de massas, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMQC e por comparação com os dados da literatura como sendo uma cumarina denominada (-) mammea A/BB e um biflavonóide denominado amentoflavona. Também foi realizada a caracterização do extrato bruto residual das folhas por CLAE-EM. Os experimentos da atividade biológica avaliaram o efeito dos extratos brutos, frações e das substâncias purificadas no crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis* e das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Assim verificou-se um aumento gradativo do efeito antileishmania com o processo de purificação, onde a concentração de 60  $\mu\text{g/mL}$  do extrato bruto apresentou uma inibição de aproximadamente 50% no crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis* enquanto a substância (-) mammea A/BB inibiu 50% do crescimento com 23,2  $\mu\text{g/mL}$ . Frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* o extrato bruto inibiu 50% do crescimento com 40  $\mu\text{g/mL}$  e a substância (-) mammea A/BB inibiu 50% do crescimento com 3,0  $\mu\text{g/mL}$  e frente as formas amastigotas o extrato bruto apresentou inibição de 50% do crescimento com 3,69  $\mu\text{g/mL}$  e a substância (-) mammea A/BB inibiu 50% do crescimento com 0,88  $\mu\text{g/mL}$ . Estudos de citotoxicidade foram realizados e a concentração tóxica da substância (-) mammea A/BB frente à cultura de macrófagos J774G8 foi bem maior do que aquela apresentada para os protozoários, apresentando índice de seletividade de 8,6 para as formas promastigotas e 29,3 para as formas

amastigotas, mostrando que esta substância apresenta importante atividade antileishmania e é pouco tóxica para os macrófagos. A análise da ultraestrutura das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 3,0 µg/mL da substância (-) mammea A/BB por microscopia eletrônica de transmissão apresentou significantes alterações ultraestruturais como o aparecimento de células binucleadas, múltipla vacuolização citoplasmática, intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar e aumento no volume da mitocôndria com a presença de membranas concêntricas na matriz mitocondrial.

**Palavras chaves:** *Calophyllum brasiliense*, Clusiaceae, cumarina, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, citotoxicidade, ultraestrutura.



## ABSTRACT

The present work consisted in the study from the leaves of herbal specie *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), known as guanandi and popularly used for treatment of reumatism, varicosity, hemorrhoids and chronic ulceration, and its biological activity on *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis*. The phytochemical study included the extraction process and bioassay-guided fractionation through chromatographic method until isolation of the compounds F1.12 and F7.53. This compound were identified through spectral analyses of mass, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMQC and by comparison with literature data as being a coumarin denominated (-) mammea A/BB and a biflavonoid denominated amentoflavone. Also, the residue crude extract of the leaves was characterized by HPLC-MS. The experiments of biological activity evaluated the effect of the crude extracts, fractions and of the purified compound in the growth of promastigote forms from *L. braziliensis* and of promastigote and amastigote forms from *L. amazonensis*. Therefore, a progressive increase of the anti-leishmanial effect was verified in the course of the purification process, where the concentration of 60  $\mu\text{g/mL}$  of the crude extract showed an inhibition of approximately 50% in the growth of promastigote forms of *L. braziliensis* while the isolated compound (-) mammea A/BB inhibited 50% of the growth with 23,2  $\mu\text{g/mL}$ . Against the promastigote forms of *L. amazonensis* the crude extract inhibited 50% of the growth with 40  $\mu\text{g/mL}$  and the compound (-) mammea A/BB inhibited 50% of the growth with 3,0  $\mu\text{g/mL}$  and the amastigote forms the crude extract showed inhibition of 50% of the growth with 3,69  $\mu\text{g/mL}$  and the compound (-) mammea A/BB inhibited 50% of th growth with 0,88  $\mu\text{g/mL}$ . Citotoxicity studies were carried out and toxic concentration of the compound (-) mammea A/BB against J774G8 culture macrophages was much larger than those presented for the protozoa, it showing seletivity index of 8,6 to the ptromastigote forms

and 29,3 to the amastigote forms, it showing that the compound shows important anti-leishmania activity and it is a little toxic to macrophages. The ultrastructural analysis of the promastigotes forms of *L. amazonensis* treated with 3,0 µg/mL of the compound (-) mamea A/BB through transmission electron microscopy showed significant ultrastructural changes like the binucleate cells, multiple cytoplasmic vacuolization, intense exocytic activity in the region of the flagellar pocket and swelling of the mitochondria with the concentric membranes in mitochondrial matrix.

**Keywords:** *Calophyllum brasiliense*, Clusiaceae, coumarin, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, cytotoxicity, ultrastructure.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Principais substâncias químicas isoladas do gênero <i>Calophyllum</i> descritos anteriormente no texto.....	43
<b>Figura 2</b> Espécie Vegetal <i>C. brasiliense</i> Cambess.....	46
<b>Figura 3</b> Espectro de massas da substância F7.53 utilizando interface APCI no modo negativo de protonação (A). Espectro de massas <i>tandem</i> (ESI-MS/MS) (B).....	89
<b>Figura 4</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).....	90
<b>Figura 5</b> Detalhamento do espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).....	91
<b>Figura 6</b> Detalhamento do espectro de RMN $^1\text{H}$ da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).....	92
<b>Figura 7</b> Espectro de $^1\text{H}$ x $^1\text{H}$ COSY da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).....	93
<b>Figura 8</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da substância F7.53 (75,5 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).....	94
<b>Figura 9</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT 90°C e 135°C da substância F7.53 (75,5 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ).....	95

- Figura 10** Espectro de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) .....96
- Figura 11** Espectros de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $d_6$ ).....97
- Figura 12** Espectros de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC da substância F7.53 (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).....98
- Figura 13** A- cromatograma a 254 nm do extrato residual das folhas (RF) da *C. brasiliense* por CLAE (1) mammea A/BB, (2) amentoflavona. B- cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato (RF). C- cromatogramas de íons extraídos (CIE) do extrato (RF). D- espectros de massas por APCI no modo negativo.....99
- Figura 14** Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Controle (A), promastigotas cultivadas na presença de 3,0  $\mu\text{g/mL}$  (B-E) e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  (F) da substância (-) mammea A/BB após 72 horas de incubação.....116

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Sistemas eluentes para o fracionamento do extrato bruto residual das folhas do *Calophyllum brasiliense* Cambess solúvel em diclorometano (RF) por cromatografia em coluna de adsorção a vácuo.....63
- Tabela 2** Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm) (300 MHz) em DMSO- $\text{d}_6$  e correlações no espectro  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) para a substância F7.53.....80
- Tabela 3** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  em ppm) (75,5 MHz) em DMSO- $\text{d}_6$  para a substância F7.53 e do modelo amentoflavona.....82
- Tabela 4** Interações de átomos de Hidrogênio e Carbono de uma ligação ( $^1J_{\text{CH}}$ ) e a longa distância ( $^2J_{\text{CH}}$ ,  $^3J_{\text{CH}}$  e  $^4J_{\text{CH}}$ ) observadas nos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC (300 MHz) e  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC (300 e 400 MHz) em DMSO- $\text{d}_6$  da substância F7.53.....85
- Tabela 5** Efeito dos extratos e substâncias da *C. brasiliense* no crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* .....102
- Tabela 6** Efeito do extrato bruto, fração e substância pura da *C. brasiliense* no crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.....108

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1** Procedimento para a obtenção dos extratos brutos hidroetanólicos 90% a partir das folhas secas e moídas do *Calophyllum brasiliense* Cambess.....62
- Fluxograma 2** Procedimento para isolamento e purificação dos constituintes do extrato residual das folhas do *C. brasiliense* solúveis em diclorometano (RF). 2B: fracionamento da Fração Hexano (FH1). 2C: fracionamento da Fração Acetato de Etila (FAC7).....64
- Fluxograma 3** Isolamento da substância bioativa a partir da fração hexano.....66
- Fluxograma 4** Isolamento da substância F7.53 a partir da fração acetato de etila.....68

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Porcentagem de inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* após 24 horas de incubação (A) extrato residual solúvel em diclorometano (RF) (B) substância (-) mammea A/BB.....103
- Gráfico 2** Porcentagem de inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* durante período de 72 horas (A) extrato residual solúvel em diclorometano (RF) (B) fração hexano (F1) (C) substância (-) mammea A/BB.....109
- Gráfico 3** Porcentagem de inibição do crescimento das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* durante período de 72 horas (A) extrato residual solúvel em diclorometano (RF) (B) fração hexano (F1) (C) substância (-) mammea A/BB.....110

**LISTA DE ABREVIATURAS UNIDADES E SÍMBOLOS**

APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas
CLM	Concentração Letal Mínima
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
DE	Dose Efetiva
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL <sub>50</sub>	Dose Letal de 50%
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
ESI/MS	Espectrometria de massas com ionização por Electrospray
HSQC	Heteronuclear Spectroscopy Quantum Coherence
eV	elétrons Volts
F	fração
FM	Fase Móvel
Hz	Hertz
IS	Índice de Seletividade



$J$	Constante de Acoplamento em Hz
RF	Extrato Residual das Folhas solúvel em diclorometano
$M^+$	Íon Molecular
MHz	Megahertz
$m/z$	razão massa carga
p.a	para análise
RMN $^{13}C$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN $^1H$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
$s$	singleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
$\lambda$	Comprimento de onda.
$\delta$	Deslocamento químico, em ppm.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	21
1.2 LEISHMANIOSES.....	25
<b>1.2.1 Ciclo de vida do Parasita</b> .....	26
<b>1.2.2 Classificação taxonômica</b> .....	27
<b>1.2.3 A doença leishmaniose</b> .....	29
<b>1.2.4 Tratamento das leishmanioses</b> .....	31
1.3 A FAMÍLIA Clusiaceae.....	35
<b>1.3.1 O Gênero <i>Calophyllum</i></b> .....	36
<b>1.3.2 A Espécie <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess (Clusiaceae)</b> .....	44
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	55
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	56
3.1 ESTUDO QUÍMICO.....	56
<b>3.1.1 Material Vegetal</b> .....	56
<b>3.1.2 Processamento do Material Vegetal</b> .....	56
<b>3.1.3 Dados Espectroscópicos e Espectrométricos</b> .....	56
<b>3.1.4 Técnicas cromatográficas</b> .....	57
3.1.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	57
3.1.4.2 Cromatografia em coluna de adsorção.....	58
3.1.4.3 Cromatografia em coluna de adsorção à pressão reduzida.....	58
3.1.4.4 Cromatografia por filtração em gel de SEPHADEX® LH20.....	59
3.1.4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas.....	60
<b>3.1.5 Extração, Fracionamento e Isolamento dos Constituintes Químicos</b> .....	61

<b>3.1.5.1 Preparo dos Extratos Brutos.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.5.2 Fracionamento do extrato bruto residual das folhas solúvel em diclorometano (RF).....</b>	<b>62</b>
<b>3.1.5.3 Fracionamento da Fração Hexano (F1).....</b>	<b>65</b>
<b>3.1.5.4 Isolamento da substância bioativa a partir da fração hexano.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1.5.5 Fracionamento da fração acetato de etila (F7).....</b>	<b>67</b>
<b>3.1.5.6 Isolamento da substância F7.53.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA <i>Calophyllum brasiliense</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA <i>C. brasiliense</i> FRENTE À <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.1.1 Cultura das formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.1.2 Avaliação da atividade antileishmania do <i>Calophyllum brasiliense</i> frente ao crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.1.3 Análise Estatística.....</b>	<b>70</b>
<b>3.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA <i>Calophyllum brasiliense</i> FRENTE À <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.2.1 Cultura das formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.2.2 Cultura das formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2.2.3 Preparo das soluções estoque das drogas .....</b>	<b>72</b>
<b>3.2.2.4 Avaliação da atividade antileishmania do <i>Calophyllum brasiliense</i> frente ao crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>3.2.2.5 Avaliação da atividade antileishmania do <i>Calophyllum brasiliense</i> frente ao crescimento de formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>.....</b>	<b>73</b>

3.2.3 Estudo da citotoxicidade da substância pura (F1.12) em macrófagos J774G8.....	74
3.2.3.1 Cultura de macrófagos J774G8.....	74
3.2.3.2 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774G8.....	75
3.2.4 Análise das alterações ultraestruturais em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	76
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
4.1 ESTUDO QUÍMICO.....	77
4.1.2 Determinação Estrutural da substância com atividade biológica (F1.12).....	77
4.1.3 Determinação Estrutural da substância F7.53.....	78
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	100
4.2.1 Estudo dos efeitos do <i>Calophyllum brasiliense</i> no crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	100
4.2.2 Estudo dos efeitos do <i>Calophyllum brasiliense</i> no crescimento das formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	104
4.2.3 Estudo da citotoxicidade da substância (-) mammea A/BB em macrófagos J774G8.....	111
4.2.4 Alterações ultraestruturais em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ao microscópio eletrônico de transmissão.....	113
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de produtos naturais na terapêutica é tão antigo quanto a civilização humana. Até meados do século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos por plantas e extratos vegetais, como demonstrado pelas farmacopéias da época, ou seja, naquela época as plantas medicinais e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos. (SCHENKEL et al., 2003).

Após séculos de uso empírico de preparações a base de ervas, a partir do século XIX, houve o interesse pelo isolamento dos princípios ativos, iniciando uma nova era da pesquisa moderna envolvendo plantas medicinais (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). É importante ressaltar que, em muitas situações, a descoberta da atividade biológica destas substâncias não representou somente o surgimento de um novo grupo de substâncias, mas deu origem a uma nova possibilidade de terapêutica (SCHENKEL et al., 2003).

Ao longo dos anos, o homem busca a cura de algumas doenças, como AIDS, câncer, doenças tropicais e infecções por microorganismos. Nestas buscas o homem tem encontrado nos produtos naturais uma fonte promissora de substâncias úteis, que são muito importantes na terapêutica, pois existem compostos isolados de plantas com ações farmacológicas diversas e que funcionam como protótipos ou modelos para o desenvolvimento de medicamentos, por exemplo, a atropina (anticolinérgico) isolado da *Atropa belladonna*, digoxina (glicosídeo cardíaco) da *Digitalis purpúrea*, morfina (analgésico narcótico) da *Papaver somniferum*, pilocarpina (anti-glaucomatoso) do *Pilocarpus jaborandi*, reserpina (anti-hipertensivo) da *Ruvolfia spp.* e a tubocurarina (bloqueador neuromuscular) da *Chondrodendron tomentosum* (SCHENKEL et al., 2003). No entanto, um significativo número de drogas sintéticas é obtido

de precursores naturais (RATES, 2001). A terapêutica moderna composta de grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não seria tão desenvolvida se não fosse a pesquisa de produtos naturais (CALIXTO, 2001).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular, pois a probabilidade de se encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular é maior em relação às plantas escolhidas ao acaso (ELISABETSKY, 2003; RATES, 2001).

O potencial farmacoterapêutico das plantas medicinais ainda é pouco explorado, pois, existe uma biodiversidade enorme de espécies vegetais. Dentre 250-500 mil espécies estimadas apenas uma pequena porcentagem tem sido pesquisada fitoquimicamente e em ensaios biológicos e farmacológicos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; RATES, 2001). Assim torna-se necessário o desenvolvimento da pesquisa científica a fim de elucidar, comprovar e racionalizar o uso de plantas medicinais e seus derivados (ALBIERO, 1994).

A importância da fitoquímica é evidenciada ao considerar-se a grande riqueza vegetal ainda sem estudo e as possibilidades para o desenvolvimento de novos e potentes medicamentos. Já que as plantas medicinais são uma das maiores fontes para a descoberta de novas substâncias químicas, com potencial atividade terapêutica e farmacológica.

Tem se buscado nos produtos naturais a cura para as infecções tropicais e para as doenças crônicas, já que as medicações atuais provocam sérios efeitos adversos e uma avaliação científica dos produtos naturais pode levar ao descobrimento de drogas mais seguras, de menor custo e menos tóxicas do que os medicamentos existentes (EDITORIAL, 1994).

Algumas vezes a investigação biológica é realizada somente com o extrato bruto da droga vegetal, sem uma preocupação adicional em pesquisar a atividade de diferentes extratos da mesma droga vegetal ou mesmo isolar os princípios ativos. No entanto, a cada dia, um

número maior de pesquisadores brasileiros está mostrando interesse em pesquisar as plantas medicinais mais profundamente. Além disso, em alguns estados brasileiros, alguns projetos governamentais estão introduzindo o uso de fitoterápicos nos serviços de saúde pública mostrando o valor da medicina popular (BRITO; BRITO, 1993). A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem recomendado constantemente a adoção de plantas medicinais nos programas de atenção primária de saúde, como forma de diminuir os custos dos programas de saúde pública nos países subdesenvolvidos e naqueles em desenvolvimento (MATOS, 1997).

Os fitoterápicos são bem aceitos pela população e o custo para o desenvolvimento destes são menores se comparado aos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2001). Quando prescritos adequadamente, a segurança dos fitoterápicos é alta. Portanto é aceitável que os medicamentos à base de plantas medicinais de uso popular apresentam ampla margem de segurança (ELVIN-LEWIS, 2001). Embora a população acredite que os fitoterápicos por serem produtos de origem natural, sejam seguros e não possuam efeitos colaterais, estudos clínicos têm mostrado o contrário. Atualmente, sabe-se que muitas plantas contêm constituintes extremamente tóxicos, por exemplo digitálicos, alcalóides pirroizidínicos e ésteres de forbol (CALIXTO, 2001). Algumas reações adversas devido ao uso de plantas medicinais tem sido reportadas, como: reações de hipersensibilidade, anemia, diarreia crônica, nefropatias, colite e hepatite aguda (ERNST, 1998). Portanto o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (LAPA et al., 2001).

Desta forma, assim como os produtos farmacêuticos as plantas medicinais possuem dose farmacológica e dose tóxica. No entanto, existem poucos relatos de efeitos adversos de plantas e interações farmacológicas entre plantas e produtos farmacêuticos (FUGH-BERMAN, 2000).

Muitos estudos tem mostrado que os produtos naturais representam uma fonte de moléculas para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (SHU, 1998). Muitos produtos de origem natural tem sido utilizados na síntese de moléculas complexas de interesse farmacológico e principalmente como fonte de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos biologicamente ativos (EDITORIAL, 1994; ROBBERS et al., 1997).

Dados da literatura indicam que em relação ao mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para tratamento de suas enfermidades, sendo que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais como única fonte terapêutica. (CHECHINEL FILHO et al., 1998; CALIXTO, 2001). No Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, o restante encontra nos produtos de origem natural a única fonte de recursos terapêuticos (REIS; MARIOT, 2001). Este contexto nos mostra que são imprescindíveis estudos mais abrangentes sobre estes recursos naturais, proporcionando desta forma o uso racional e terapêuticamente correto das plantas medicinais da flora brasileira e mundial.

A escolha da espécie vegetal para o desenvolvimento de estudos químicos e farmacológicos é uma das mais importantes tarefas. Plantas de uso tradicional, já comercializadas, devem ser priorizadas em detrimento a espécies pouco conhecidas, para que se possa dar suporte a sua utilização. Ainda, a regulamentação do comércio com a exigência do registro de medicamentos de origem vegetal junto aos órgãos governamentais de vigilância sanitária, conduziu a uma série de exigências relacionadas com a comprovação da eficácia, segurança e especificação da qualidade, que envolvem aspectos da matéria-prima, do processamento tecnológico e do produto final (BRASIL, 2004).



## 1.2 LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma doença tropical causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que acomete mais de 12 milhões de pessoas no mundo. Alguns indivíduos apresentam lesões incapacitantes, desfigurantes e algumas vezes até fatais, como nas leishmanioses viscerais. Com isso, a O.M.S. incluiu esta doença entre as seis mais importantes endemias do mundo (GENARO, 1998a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001a).

Segundo a World Health Organization (2001b) atualmente, as leishmanioses são prevalentes nos continentes americano, africano, asiático e europeu, sendo que 88 países são considerados zonas endêmicas e destes, 72 são países em desenvolvimento. É importante ressaltar que 90% dos casos de leishmaniose visceral acontecem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão; 90% das leishmanioses cutaneomucosas acontecem na Bolívia, Brasil e Peru e 90% dos casos de leishmanioses cutâneas acontecem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria.

A prevalência mundial das diferentes leishmanioses é desconhecida. Pois, a notificação é obrigatória somente em 32 dos 88 países afetados pelas leishmanioses, um número significativo de casos não é registrado. Na realidade, dos 1,5-2 milhões de novos casos estimados anualmente, são oficialmente notificados somente 600.000 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001a).

No Brasil, a leishmaniose é encontrada em todos os estados, sendo responsável por altas taxas de mortalidade, constituindo um grave problema de saúde pública (GENARO, 1998a). A leishmaniose tegumentar é uma doença endêmica em vários estados do Brasil sendo crescente o número de notificações, atingindo 490.606 casos confirmados de 1980 a 2001. Por este motivo esta doença constitui um problema de saúde pública em diversos

Estados do Brasil. As regiões norte e nordeste apresentam o maior número de casos 73,6%. Neste período o Estado do Paraná confirmou 10.345 casos da doença, cerca de 2,1% da incidência brasileira (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). No Paraná dentre os 1418 pacientes suspeitos de leishmaniose tegumentar; 67,3% tiveram diagnóstico laboratorial positivo; entre os quais 84,2% contraíram a infecção no Estado do Paraná. Neste estado esta doença é endêmica e já atingiu proporções epidêmicas em 1993, 1994 e 1995 (SILVEIRA et al., 1999).

### 1.2.1 Ciclo de vida do parasita

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) é constituído por espécies de protozoários unicelulares, heteroxênicos, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. As formas promastigotas (flageladas) são encontradas no trato digestivo do mosquito e a forma amastigota, sem flagelo livre, no sistema monocítico fagocitário dos hospedeiros vertebrados (MICHALICK, 1998; GENARO, 1998a).

As formas de leishmanioses são transmitidas por hospedeiros invertebrados infectados pelas formas promastigotas (flageladas) que parecem ser transmitidas somente pelas fêmeas dos insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (mosquito palha ou birigui). Esta parasitose pode ser transmitida por insetos dos gêneros *Lutzomyia*, *Phlebotomus* e *Psychodopygus* de acordo com a espécie do protozoário e distribuição geográfica da doença (GREVENLINK; LERNER, 1996; GENARO, 1998a).

Os hospedeiros vertebrados podem ser mamíferos variados, estes são infectados quando as formas promastigotas infectantes são inoculadas pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sangüíneo. As fêmeas adultas dos insetos vetores necessitam de sangue para estimular a ovoposição. Assim, durante o repasto sangüíneo, a saliva do inseto infectado é

inoculada juntamente com as formas promastigotas e parece exercer papel importante, auxiliando na lise do tecido e aumentando o fluxo de células sanguíneas para o local da picada, pois a saliva apresenta substâncias vasodilatadoras. As formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos teciduais e se transformam nas formas não flageladas, amastigotas. No fagolisossomo dos macrófagos as formas amastigotas do protozoário resistem a ação destruidora das enzimas lisossomais, multiplicam-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma da célula. Assim, a membrana do macrófago rompe-se, liberando as formas amastigotas no tecido e estas serão novamente fagocitadas por outros macrófagos. A infecção do hospedeiro invertebrado (inseto vetor) ocorre no momento do repasto sanguíneo em indivíduo ou animal infectado, quando o inseto adquire as formas amastigotas presentes no sangue e/ou linfa intersticial. As formas amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino do inseto, completando o ciclo biológico (MICHALICK, 1998; GREVELINK; LERNER, 1996; GENARO, 1998a).

### **1.2.2 Classificação taxonômica**

Em 1972 e 1973, Laison e Shaw baseados no desenvolvimento do parasita nos insetos vetores, em animais de laboratório (hamster), em meio de cultura (NNN) e na comparação entre a densidade flutuante do DNA cinetoplasmático e nuclear das espécies, propuseram o agrupamento dos parasitas causadores da leishmaniose tegumentar americana em dois grandes grupos denominados “complexos” *mexicana* e *braziliensis* (MICHALICK, 1998).

As espécies do complexo *braziliensis* apresentavam o desenvolvimento e a colonização do parasita nos intestinos médio e posterior dos insetos vetores, enquanto as espécies do complexo *mexicana* apresentavam ausência do desenvolvimento parasitário no intestino posterior do inseto vetor (MICHALICK, 1998).

A inoculação de parasitas do complexo *mexicana* na pele do hamster promove o desenvolvimento rápido de uma lesão nodulosa, ocorrendo riqueza de parasitas contrastando com ausência quase total de resposta celular. A evolução da lesão é progressiva podendo culminar na morte do animal. As metástases na pele são freqüentes. Já os parasitas do complexo *braziliensis*, embora possam determinar a infecção do animal em poucas semanas, apresentam uma evolução lenta, caracterizada pela resposta celular marcante e relativamente menor número de parasitas na lesão (MICHALICK, 1998).

Em meio de cultura NNN, os parasitas do complexo *mexicana*, aparentemente menos exigentes, crescem rapidamente e de forma exuberante sendo facilmente mantidos neste meio, enquanto que os do complexo *braziliensis*, além do crescimento pobre ou moderado, dificilmente se mantêm em cultivo. A densidade de flutuação do DNA nuclear e mitocondrial também permitem a divisão dos parasitas nos dois grupos (MICHALICK, 1998).

O complexo *Leishmania mexicana* compreende as espécies *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana pifanoi*, *L. mexicana amazonensis* e *L. mexicana enriettii*. Já o complexo *Leishmania braziliensis* agrupa as espécies *L. braziliensis braziliensis*, *L. braziliensis guyanensis* e *L. braziliensis panamensis* (MICHALICK, 1998).

O gênero *Leishmania* está separado em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Leishmania* compreende parasitas do complexo *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. hertigi*, que possuem o desenvolvimento nos insetos vetores limitados as regiões anterior e posterior do estômago, enquanto que o subgênero *Viannia* engloba parasitas do complexo *braziliensis*, que apresentam as formas paramastigotas aderidas às paredes do intestino pelo flagelo e as formas promastigotas livres e que migram do intestino para as regiões anterior e posterior do estômago (MICHALICK, 1998).

### 1.2.3 A doença leishmaniose

A doença pode manifestar-se de várias maneiras dependendo da espécie do parasita e da virulência da espécie que está causando a infecção, assim como do sistema imunológico do hospedeiro. Destas interações resulta um amplo espectro de manifestações patológicas que vão desde lesões de pele localizadas, até lesões em vários órgãos, com sério comprometimento do sistema mononuclear fagocitário. (GREVELINK; LERNER, 1996; GENARO, 1998a). Cada espécie de *Leishmania* pode produzir mais de uma forma clínica e cada forma pode ser causada por múltiplas espécies (GENARO, 1998a).

A doença humana é dividida tradicionalmente em duas formas clínicas principais: a forma visceral e a tegumentar. A forma tegumentar apresenta variantes sendo subdividida em leishmaniose cutânea localizada, cutânea difusa e cutaneomucosa. (GREVELINK; LERNER, 1996; GENARO, 1998a).

A leishmaniose cutânea localizada acomete principalmente o rosto, nariz, braços e pernas, pois estes são locais mais propícios à picada do inseto. Esta é causada por parasitas dos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis*. Primeiramente, no local da picada forma-se uma pápula que evolui para a formação de uma placa ou nódulo. As lesões são ulcerosas e indolores podendo ser rasas ou profundas e caracteristicamente apresentam bordos elevados, podendo progredir espontaneamente para a cura após 6 a 12 meses (GREVELINK; LERNER, 1996; GENARO, 1998a)

A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada pela anergia do sistema imunológico do hospedeiro e pode ser causada pelas espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi* e *L. aethiopica*. Esta doença inicia com uma lesão primária no local da picada e se dissemina pelo corpo por via hematogênica ou linfática, levando ao aparecimento de nódulos não ulcerativos

espalhados por todo o corpo. As lesões são ricas em parasitas e estes não invadem órgãos internos (GREVELINK; LERNER, 1996; GENARO, 1998a).

A leishmaniose cutaneomucosa é comumente causada pela espécie *L. braziliensis*. O hospedeiro pode apresentar lesões cutaneomucosas dentro de 2 a 10 anos após o aparecimento da lesão cutânea primária. As lesões ocorrem devido à disseminação por via hematogênica ou linfática ou por extensão de lesões primárias afetando as regiões nasofaríngeas. Trata-se de um processo lento, de curso crônico. Pode ocorrer mutilação do septo nasal, palato, faringe, gengivas e lábios enquanto que as estruturas ósseas permanecem intactas. A invasão do trato respiratório pode resultar em comprometimento da respiração e da deglutição podendo levar o paciente a óbito (GREVELINK; LERNER, 1996; GENARO, 1998a).

A leishmaniose visceral clássica ou calazar é uma doença sistêmica causada pela disseminação do protozoário por todo sistema fagocítico mononuclear e é caracterizada por febre, mal-estar, perda de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia e estado de debilidade progressivo levando o paciente a óbito se não for submetido a tratamento específico. Pode ser causada pela *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. chagasi*, geralmente está relacionada com pobreza e desnutrição (BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999; GENARO, 1998b).

A visceralização de algumas cepas de *Leishmania* que classicamente se restringiam a causar leishmaniose cutânea tem sido observada em pacientes coinfectados por *Leishmania* e vírus da imunodeficiência humana, por isso, estes casos de leishmaniose visceral tem sido chamados de infecção oportunista, ocorrendo acometimento do trato gastrointestinal de esôfago até reto (BERMAN, 1997; ROSA et al., 2003).

A espécie *Leishmania braziliensis*, pertence ao subgênero *Viannia* e ao complexo *Leishmania braziliensis* e é responsável principalmente pela forma tegumentar da doença (cutânea e cutaneomucosa). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de

mamíferos (roedores, edentados, marsupiais, canídeos e primatas) e os invertebrados são insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (GENARO, 1998a). A espécie *Leishmania Viannia braziliensis* é o principal agente etiológico prevalente no Estado do Paraná sendo identificada em 98,7% dos casos. Já a *Leishmania Leishmania amazonensis* foi identificada somente em 1,3 % dos casos. (SILVEIRA et al., 1999). A *Leishmania (V.) braziliensis* também se apresenta amplamente distribuída em todos os estados brasileiros (GENARO, 1998a).

A espécie *Leishmania amazonensis*, pertence ao subgênero *Leishmania* e ao complexo *Leishmania mexicana* e é responsável principalmente pela forma tegumentar da doença (GENARO, 1998a) podendo também causar a leishmaniose visceral (HERWALT, 1999). Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos (roedores, edentados, marsupiais, canídeos e primatas) e os invertebrados são insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (GENARO, 1998a).

#### **1.2.4 Tratamento das leishmanioses**

Os principais medicamentos recomendados para o tratamento das leishmanioses cutâneas e viscerais foram introduzidos na terapêutica há mais de meio século. Estes incluem os derivados dos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT et al., 2005; GENARO, 1998a). Entretanto, os antimoniais não são drogas ideais, pois não são ativos quando administrados oralmente, portanto são de administração parenteral e necessitam de longo período de tratamento (CROFT, 1988). São fármacos muito tóxicos podem causar artralgias, mialgias, desconforto abdominal, dores de cabeça, pancreatite, elevação de enzimas hepáticas, anemia, leucopenia, trombocitopenia, alterações cardíacas e renais. Isto torna estes

fármacos intolerantes para muitos pacientes. A resistência a estas drogas tem sido freqüente, portanto outros agentes antileishmania necessitam ser descobertos (BERMAN, 1988, 1996; GREVELINK; LERNER, 1996), mais de 50% dos casos de leishmaniose não respondem ao tratamento utilizando estas drogas (SERENO, 2000). O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda é pouco conhecido, acredita-se que estes interferem na produção de energia das formas amastigotas comprometendo a vida da célula. Nos ensaios *in vitro* tratando as formas promastigotas com antimoniais, não foi verificado efeito leishmanicida, sendo o seu efeito restrito às formas amastigotas (BERMAN, 1988; CROFT; COOMBS, 2003; OUELLETTE et al., 2004). Somente as formas amastigotas reduzem os antimoniais pentavalentes em trivalentes sendo esta forma da droga ativa (letal), desta forma os antimoniais pentavalentes funcionam como uma pró-droga, tanto os antimoniais pentavalentes quanto os trivalentes promovem a fragmentação do DNA, sugerindo que estes matam os parasitas por apoptose. (OUELLETTE et al., 2004).

A segunda linha de fármacos utilizados no tratamento dos casos que não respondem a terapia convencional inclui as pentamidinas (GENARO, 1998a; GREVELINK; LERNER, 1996; SERENO et al., 2000) e anfotericina B (SERENO et al., 2000). As pentamidinas se ligam ao DNA do cinetoplasto do parasita causando danos ao protozoário (CROFT; COOMBS, 2003). Estes fármacos também provocam efeitos colaterais como mialgias, dor no local da administração, náuseas, cefaléia e hipotensão (BERMAN, 1997). A anfotericina B age sob o ergosterol presentes na membrana das formas promastigotas promovendo a perda da permeabilidade celular (SAHA et al., 1986; COHEN, 1998). Um estudo verificou que diversas espécies de *Leishmania* são sensíveis a esta droga (ESCOBAR et al., 2002). Porém, este medicamento também apresenta efeitos colaterais como febre, calafrios, hiperpnéia, hipotensão, anemia, insuficiência renal, hipopotassemia, cefaléia, náusea, vômito, mal-estar, perda de peso e alterações cardíacas (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BENNETT,1996).



Novas formulações que associam lipídios à anfotericina B (lipossomas) além de serem mais ativas são menos tóxicas que a Anfotericina B. No entanto, estas formulações são mais caras (OUELLETTE et al., 2004; COHEN, 1998; CROFT et al., 2005)

Fármacos de administração oral como os antifúngicos derivados do imidazol e triazol (cetoconazol e itraconazol dentre outros) que bloqueiam a síntese do ergosterol têm sido particularmente estudados para o tratamento das leishmanioses. Estes têm apresentado efetividade contra algumas espécies de *Leishmania*, tanto *in vitro* (BERMAN et al., 1984, 1986; BEACH et al., 1988; HART et al., 1989; VANNIER-SANTOS et al., 1995) quanto *in vivo* (BERMAN, 1996, 1997). A membrana celular da *Leishmania* e dos fungos é constituída por ergosterol diferente da membrana dos mamíferos que é constituída de colesterol. Portanto o ergosterol é um importante alvo para a quimioterapia (CROFT, 1988; CROFT; COOMBS, 2003). A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo tem se mostrado eficaz para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea e para o tratamento parenteral de leishmaniose visceral (CROFT et al., 2005), este fármaco apresenta como alvo a mitocôndria da *Leishmania* (CROFT; COOMBS, 2003). A miltefosina, originalmente desenvolvida como um fármaco antineoplásico, tem sido eficaz no tratamento oral de leishmaniose visceral e cutânea. No entanto, este fármaco é teratogênico não podendo ser utilizado para o tratamento de mulheres na fase fértil (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT et al., 2005; ESCOBAR, 2002). Inibidores de protease utilizados no tratamento do HIV (indinavir e saquinavir) tem apresentado *in vitro* atividade leishmanicida dose dependente frente às formas promastigotas (SAVOIA et al., 2005).

O conhecimento da patogênese da leishmaniose pode levar à descoberta de agentes terapêuticos mais baratos e eficientes, já que a resistência dos parasitas aos sais de antimônio e outras drogas tem aumentado (JEBBARI; DAVIDSON, 1998). Desta forma, a crescente incidência da leishmaniose aumentou o interesse na pesquisa de novos agentes terapêuticos

mais baratos, mais efetivos, que reduza a duração do tratamento, drogas não parenterais e menos tóxicos que possam substituir os atuais (BERMAN, 1997).

Apesar dos grandes avanços da medicina moderna, as plantas tem contribuído nos cuidados primários à saúde, principalmente das populações dos países em desenvolvimento. Desde o final da década de 80 até os dias atuais, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de descobrir produtos naturais com potencial atividade antileishmanicida (IWU et al., 1994).

Os produtos naturais apresentam vasto potencial na descoberta de novos agentes para o tratamento de doenças tropicais importantes causadas por protozoários (amebíases, leishmanioses, doença de Chagas e malária). Muitos metabólitos secundários encontrados nas plantas como os alcalóides, terpenos, quinonas, saponinas e flavanóides entre outros demonstram a diversidade de compostos que podem ser encontrados e que podem ser seletivos para os parasitas. Estes podem ser objetos de estudos para a identificação de novas substâncias que apresentem atividade e/ou que possam ser semi-sintetizados, a fim de melhorar a atividade terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos (WRIGHT; PHILLIPSON, 1990). Deste modo, pode-se afirmar que as plantas medicinais possuem particularidades que as tornam fontes de importantes substâncias químicas com potencial atividade biológica e de protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com atividade antileishmania.

### 1.3 A FAMÍLIA Clusiaceae

A família Clusiaceae inclui 50 gêneros e 1200 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais do globo. Entretanto, alguns gêneros se desenvolvem com grande facilidade nas regiões norte de zonas temperadas. Esta família engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, derivados químicos de interesse farmacêutico e tintas (CRONQUIST, 1981), entretanto, o gênero *Calophyllum* formado por um grande grupo de árvores tropicais constituindo aproximadamente 180 a 200 diferentes espécies (MCKEE et al., 1998; STEVENS, 1980 apud MÉSIA-VELA et al., 2001), estas são utilizadas pela população local ao longo dos anos para a obtenção de madeira nobre.

Segundo Cronquist (1981) a família Clusiaceae é rica em metabólitos secundários; suas folhas apresentam cavidades resiníferas secretoras de algumas resinas aromáticas, que somados aos canais e cavidades secretores esquizógenos promove o acúmulo de diversos tipos de substâncias incluindo esteróides, triterpenos, cumarinas, benzopiranos e diversos tipos de xantonas e proantocianinas.

Segundo Cardona et al. (1990) as xantonas são encontradas em mais de 12 diferentes ordens taxonômicas, sendo a família Clusiaceae uma das mais importantes quantitativamente. Nas plantas das famílias Clusiaceae, Hipericaceae e Gentianaceae encontram-se diversos tipos de xantonas, sendo estes compostos de grande interesse fitoquímico (CARDONA et al., 1990). Algumas propriedades farmacológicas das xantonas incluem: ação analgésica (ISAIAS et al., 2004), antimicrobiana (REYES-CHILPA et al., 1997; DHARMARATNE et al., 1999; PRETTO et al., 2004; YASUNAKA et al., 2005) e atividade antiprotozoário (ABE et al., 2004).

### 1.3.1 O Gênero *Calophyllum*

O gênero *Calophyllum* é constituído por muitas espécies vegetais, desta forma, muitos pesquisadores tem buscado atividades biológicas e estudado fitoquimicamente estas espécies. Nas espécies deste gênero estão presentes importantes classes de substâncias com atividade biológica, principalmente as cumarinas e as xantonas. Importantes atividades biológicas encontradas nas espécies deste gênero, tais como, a inibição da transcriptase reversa do HIV-1, atividade antitumoral, analgésica, antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e antileishmania entre outras tem sido encontradas em ensaios realizados com extratos, frações e substâncias puras. Dessa forma, os estudos de atividade biológica tem contribuído para a busca de futuras alternativas terapêuticas para o tratamento de algumas doenças.

As sementes da *Mammea americana* apresentam número significante de cumarinas com substituição alquil ou fenil na posição 4 (CROMBIE et al., 1967); isto sugere que a 4-substituição (alquil ou fenil) das cumarinas, são características importantes na família Clusiaceae.

Kawazu et al. (1968) isolaram das folhas do *C. inophyllum* Linn três derivados da 4-fenil-cumarina: calofilolideo, ( $\pm$ )-inofilolideo e o ácido calofílico (Figura 1, p. 43), que apresentaram atividade piscicida.

Radhakrishnan Potti; Kurup (1970) testaram a atividade antimicrobiana de uma lactona  $C_{32}H_{46}O_6$  isolada do cortéx das raízes da *C. inophyllum*, esta exerceu atividade bacteriostática frente ao *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*.

Ravelonjato et al. (1987), isolaram das cascas do *C. verticillatum* três novos neoflavonóides (ácido caloverticílico A, B, e C) e realizaram testes moluscicidas utilizando extrato bruto das folhas, sementes e cascas do *C. verticillatum*, bem como o extrato das sementes do *C. inophyllum* e da casca do *C. recedens*. Todos os extratos apresentaram

atividade em 100 ppm exceto os extratos do *C. inophyllum* e *C. recedens* que foram ativos em 10 ppm.

Ravelonjato et al. (1992) testaram uma série de extratos brutos, neoflavonóides naturais obtidos do gênero *Calophyllum* e derivados sintéticos destes em ensaios moluscicidas; os extratos brutos das espécies *C. inophyllum*, *C. recedens*, *C. chapelieri* e *C. verticillatum* apresentaram intensa atividade moluscicida em 100 ppm, enquanto que, a *C. recedens* apresentou atividade na concentração de 10 ppm. O caloflorideo, isolado das sementes do *C. verticillatum*, apresentou 100% de mortalidade em 10 ppm e 20% de mortalidade em 1 ppm. Já as cumarinas “(±) mammea A/BB”, descrita previamente por Crombie et al. (1967), isolada das sementes do *C. verticillatum*, e o ácido pseudobrasiliensico apresentaram menor atividade moluscicida. Foram também testados 14 derivados sintéticos dos neoflavonóides naturais. Os derivados da 4-fenil-cumarina apresentaram significativa atividade moluscicida em 10 ppm, e, a introdução do cloro ou nitro substituintes (como o controle positivo niclosamida), não aumentou a atividade biológica dos compostos testados, entretanto, a presença da dupla ligação nas cromeno-cumarinas e a substituição no C8, parece ser essencial para o aumento da atividade moluscicida.

Após confirmar a atividade anti-HIV do extrato bruto obtido dos frutos e raízes do *C. lanigerum*, Kashman et al. (1992) isolaram alguns derivados cumarínicos, os calanolídeos. O calanolídeo-A (Figura 1, p. 43), o 12-acetoxicalanolídeo-A e o calanolídeo-B promoveram significativa proteção *in vitro* contra os efeitos citopáticos da infecção pelo vírus HIV-1.

Em um trabalho realizado por Patil et al. (1993), foi isolada uma série de derivados cumarínicos das folhas e frutos do *C. Inophyllum*; inofilum A, B, C, D (Figura 1, p. 43), E, P, e os novos G-1 e G-2, que juntamente com o ácido calofilico (Figura 1, p. 43) e o ácido isocalofilico, apresentaram potente atividade inibidora da Transcriptase Reversa do HIV-1 (HIV-1RT), quando testados em culturas de células.

Taylor et al. (1994) descreveram que os inofilumus e calanolídeos são inibidores reversíveis da HIV-1RT e mostraram atividade frente à cepas de vírus mutantes e resistentes a outros inibidores da HIV-1RT, e que a síntese de derivados dos inofilumus e calanolídeos pode levar a compostos mais potentes e seletivos frente ao vírus do HIV-1.

McKee et al. (1996) isolaram e identificaram 04 piranocumarinas (calanolídeos) inéditas do *C. lanigerum* var. *austrocoriaceum* e do *C. teysmannii* var. *inophylloide*; estas novas piranocumarinas foram denominadas calanolídeo E2 (Figura 1, p. 43), cordatolídeo E, pseudocordatolídeo C e calanolídeo F e apresentaram considerável atividade inibidora da Transcriptase Reversa do vírus HIV-1, quando aplicadas em culturas de células. Um trabalho realizado por Currens et al. (1996) apresentou o calanolídeo-A (Figura 1, p. 43), isolado dos extratos do *C. Lanigerum*, como potente e seletivo inibidor da HIV-1RT, não exercendo atividade frente a DNA polimerase ou HIV-2RT.

Pengsuparp et al. (1996) isolaram uma cumarina do látex do *C. teysmannii*, denominada soulatrolídeo (Figura 1, p. 43) que apresentou potente atividade inibidora sobre a HIV-1RT em cultura de células, contudo, não exerceu atividade frente a HIV-2RT, AMV-RT, RNA polimerase ou DNA polimerase.

Zembower et al. (1997) realizaram modificações estruturais no calanolídeo-A isolado do *C. lanigerum*, (que apresenta potente atividade inibidora da HIV – 1RT). A adição de grupamentos metil nas posições 10 e 11, promovem decréscimo da atividade antiviral, quando comparada com a molécula original, entretanto, quando se retira da molécula a hidroxila do carbono 12, tanto as formas 10,11-*cis* quanto 10,11-*trans* apresentam atividade inibidora da HIV-1RT, sugerindo que o grupamento 12-hidroxil seria um dos possíveis responsáveis em suprimir a atividade anti-HIV.

Dharmaratne et al. (1998a), baseado em informações de que o gênero *Calophyllum* possui diversas piranocumarinas com atividade Anti-HIV-1RT, realizaram um estudo da

distribuição das cumarinas na espécie *Calophyllum cordato-oblongum*. Foi observado que quando mais jovem as partes em desenvolvimento da planta, maiores são as concentrações de cumarinas. A distribuição de piranocumarinas em ordem decrescente de concentração está no botão embrionário, brotos e ramos finos, folhas, casca e lenho justificando a produção destes metabólitos secundários para defender plantas jovens contra microorganismos diversos, incluindo os vírus.

McKee et al. (1998) realizaram um estudo quimiotaxonômico com 315 extratos orgânicos de 31 espécies do gênero *Calophyllum* e verificaram que dos 315 extratos submetidos à análise em cromatografia em camada delgada (CCD) e posteriormente em ressonância magnética nuclear RMN  $^1\text{H}$ , 127 mostraram-se “positivo” para piranocumarinas, representando 28 espécies das 31 testadas. Isto sugere que estas substâncias, apesar de se apresentarem de forma abundante na maioria das espécies, não estão amplamente difundidos em todo o gênero, podendo, entretanto, ser considerado um marcador para algumas espécies do gênero.

Shu-Geng Cao et al. (1998) isolaram das cascas do *C. teysmannii* var. *inophylloide* uma série de cumarinas policíclicas 4-fenil-substituídas, onde uma delas, a calanoneo, apresentou moderada atividade antineoplásica contra duas linhagens de células cancerígenas. Ainda relataram que a substituição 4-fenil ou 4-propil presente nestas cumarinas, é fundamental para a atividade antineoplásica.

Dharmaratne et al. (1998b) isolaram das folhas do *Calophyllum cordato-oblongum* duas piranocumarinas denominadas cordatolideo-A e cordatolideo-B, as quais apresentaram significativa atividade inibidora da HIV-1RT nas concentrações de 12,3 e 19,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Dharmaratne et al. (1999) isolaram dos extratos orgânicos do *C. moonii* e *C. lankensis* xantonas mono, di e triprenilada. A xantona monoprenilada, a calozeiloxantona, exerceu

significativa atividade inibitória frente ao *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), apresentando CIM entre 4,1-8,1 µg/mL.

Ito et al. (1999) isolaram do extrato etanólico das cascas do *Calophyllum paniciflorum*, 07 biflavonóides, estes exibiram significante atividade antineoplásica inibindo o crescimento tumoral em células Raji (*in vitro*) induzidas pelo antígeno do vírus Epstein-Barr. A atividade citoprotetora destas substâncias frente ao vírus Epstein-Barr torna promissor o desenvolvimento de novas drogas antitumorais obtidas através de produtos naturais. Já que este vírus está envolvido na gênese de alguns cânceres em humanos.

Creagh et al. (2001) realizaram um estudo em 47 voluntários sadios (HIV negativo), para avaliar a segurança e a farmacocinética do (+)-calanolideo-A (Figura 1) previamente isolado do *C. lanigerum*, objetivando um futuro tratamento contra o HIV, já que esta substância apresenta significativa atividade anti HIV-1RT. Doses únicas de 200, 400, 600, e 800 mg de (+)-calanolideo-A (Figura 1, p. 43) foram administradas e mostraram segurança e farmacocinética favorável para seu futuro emprego na clínica médica.

Guilet et al. (2001a) obtiveram dos frutos e da casca do *C. dispar*, 06 cumarinas a isodispar B, disparinol D, disparpropilinol B, dispardiol B, mammea A/AB ciclo E e mammea A/AB dioxalanociclo F; destas substâncias a isodispar B, a disparinol D e a disparpropilinol B apresentaram significativa atividade inibitória sobre o crescimento tumoral mostrando citotoxicidade frente a células de carcinoma nasofarigeal humano (KB).

Guilet et al. (2001b) isolaram da casca e dos frutos do *C. dispar*, 08 novas 4-fenil-furanocumarinas, dentre estas, as diidrofuranocumarinas apresentaram significativa atividade citotóxica inibindo 50% do crescimento das células de carcinoma nasofarigeal humano (KB) na concentração de 5 – 6 µg/mL.

Dharmaratne et al. (2001) avaliaram *in vitro* a capacidade de diferentes substâncias isoladas do gênero *Calophyllum*, em inibir a Transcriptase Reversa do HIV-1. Foram testadas



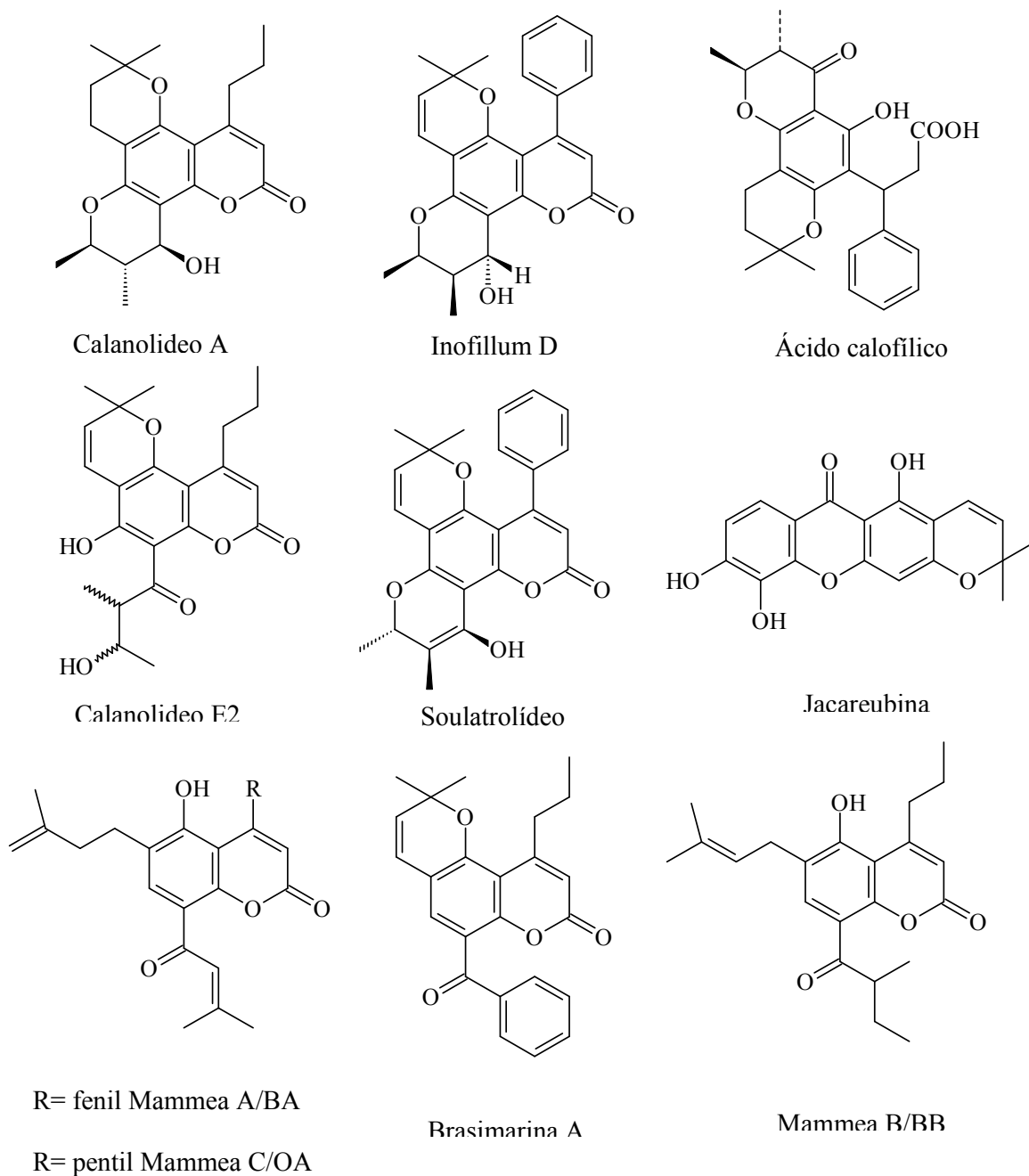
11 substâncias, as cumarinas (cordatolideo-A, cordatolideo-B, cordatolideo-B-OMe, oblongulideo e inofilum-A), as xantonas (thwaitesixantona, calothwaitesixantona, calozeiloxantona) e ácidos cromênicos (ácido cordato-oblongico, ácido cordato-oblongico metilester, ácido isocordato-oblongico metilester), utilizando como controle positivo o calanolideo A (Figura 1, p. 43), devido sua consagrada atividade *in vitro* em inibir a HIV-1RT. Foi observado que o cordatolideo A e o cordatolideo B apresentaram valores de inibição da HIV-1RT de 92 e 88%, respectivamente. O ácido cordato-oblongico inibiu 50% da atividade desta enzima, enquanto as demais substâncias apresentaram fraca atividade.

Em um trabalho realizado por Sakagami et al. (2002) foi isolada uma xantona (calozeiloxantona) da casca do *Calophyllum moonii* e submetida a ensaio antibacteriano frente a quatro cepas de *Enterococcus faecalis* sendo duas delas resistentes a vancomicina e duas delas sensíveis a vancomicina. Os autores observaram que a calozeiloxantona apresentou atividade frente as quatro cepas bacterianas testadas e que ocorreu significativo efeito sinérgico da mesma quando associada com vancomicina frente a *Enterococcus* resistentes.

Morel et al. (2002) isolaram da casca do *Calophyllum caledonicum* as caledonixantonas E e F e avaliaram a possível atividade antifúngica destas substâncias frente ao *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*. Notoriamente a substância caledonixantona E mostrou expressiva atividade antifúngica frente ao *Aspergillus fumigatus*, apresentando CIM similar ao controle positivo anfotericina B.

Recentemente Takahashi et al. (2004) avaliaram a atividade leishmanicida de 75 extratos metanólicos da madeira de diferentes plantas entre elas a espécie *Calophyllum kunstleri*. Para os ensaios da atividade leishmanicida foram utilizados formas amastigotas de *Leishmania major*. Este estudo mostrou que o extrato metanólico *C. kunstleri* apresenta importante atividade leishmanicida com concentração letal mínima (CLM) 50 µg/mL e sugere

que esta atividade pode estar relacionada com a presença de derivados de quinonas nos caules desta planta.



**Figura 1:** Principais substâncias químicas isoladas do gênero *Calophyllum* descritas anteriormente no texto.

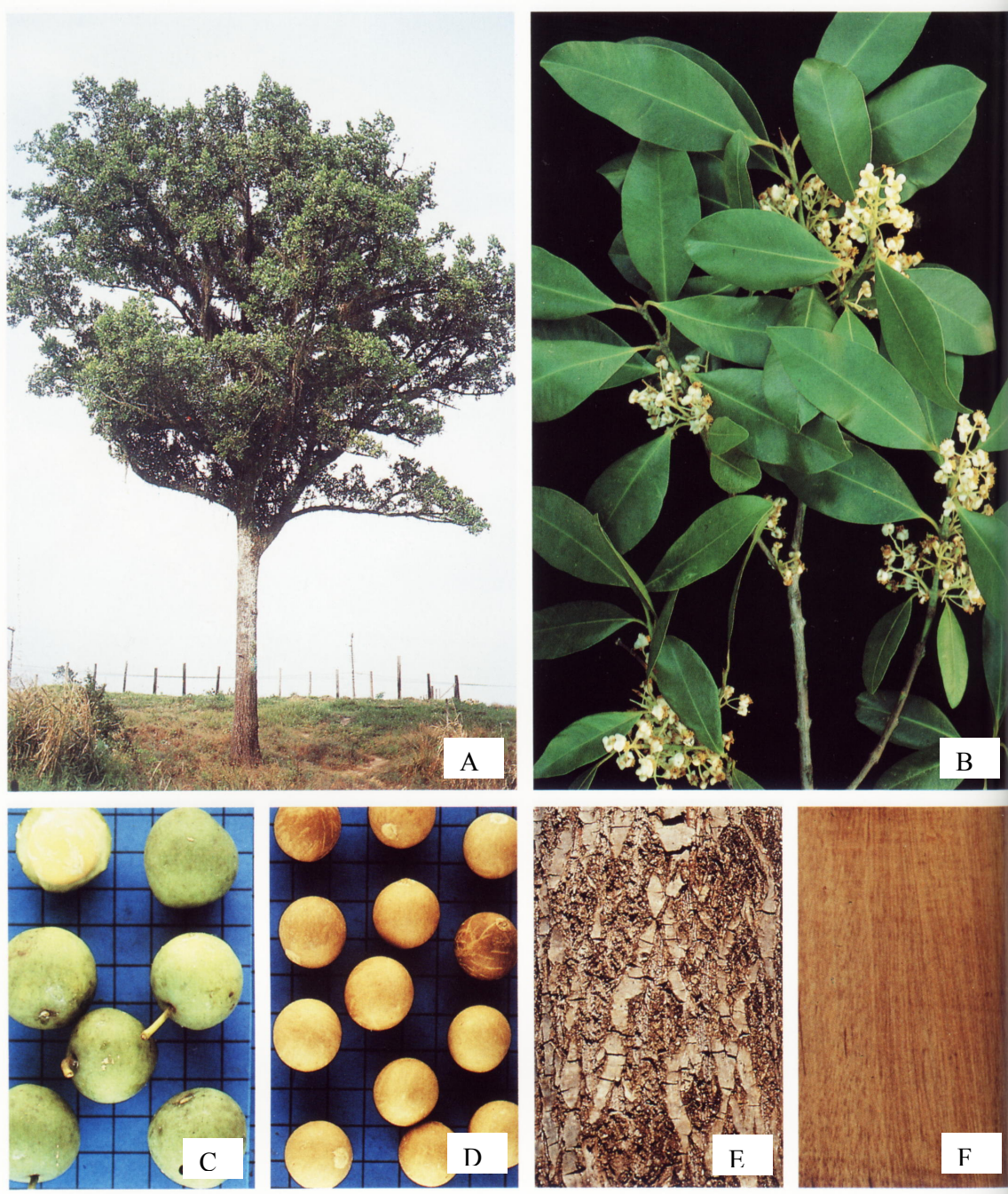
### 1.3.2 A Espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae)

A espécie *Calophyllum brasiliense* Camb. é uma árvore frondosa e alta podendo atingir até 35 metros de altura e 65 cm de diâmetro (Figura 2, p. 46), popularmente é conhecida como jacareúba, na Amazônia; gulande-carvalho, guanandi-carvalho, guanadi-cedro, landim, olandí, uá-iandi, pelos aborígenes e se distribui desde a Venezuela até o México e as Antilhas onde recebem, entre outros nomes, de pau-maria e pau-de-azeite. As variedades conhecidas na Amazônia como jacareúba-águia, jacareúba da várzea, jacareúba vermelha; são conhecidas em São Paulo como guanandi-carvalho, guanadi-cedro e guanandi-piolho, respectivamente (CORRÊA, 1978). Embora seu principal habitat seja a Amazônia, tem sido encontrado em várias regiões do Brasil tais como Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Piauí, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e pequena quantidade no estado de Alagoas, Rio Grande do Sul e no Ceará. No entanto, refere-se à sua presença no Paraná, Santa Catarina, Distrito Federal, Paraíba, Pará, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (LORENZI, 1992). Sua existência é citada desde as Guianas até o Paraná, ocorrendo preferencialmente em florestas semidecídua, ombrófila densa, amazônica e no cerrado constituente de vários Estados do Brasil (CARVALHO, 1994; CORRÊA, 1978).

A espécie vegetal apresenta folhas de distribuição oposta (Figura 2, p. 46), pecioladas, simples e elípticas, obtusas no ápice e cuneiformes na base, apresentando em média 6 cm de largura e até 13 cm de comprimento; as flores são brancas pequenas e aromáticas e dispostas em cachos abundantes (Figura 2, p. 46); possui fruto carnoso na forma de drupa globosa de coloração esverdeada (Figura 2, p. 46), com polpa oleaginosa, onde se extrai óleo industrial com 44% de pureza (LORENZI, 1992). Segundo Lorenzi (1992) o tronco é reto e cilíndrico, apresentando casca revestida de epiderme bastante dura, muito fendida (sobretudo, em plantas com crescimento secundário) (Figura 2, p. 46), quebradiça, e composta de lâminas

superpostas, podendo possuir até 40 mm de espessura, sendo a parte externa marrom-escura ou pardacenta, descamando em pequenas placas retangulares, provenientes de fissuras finas e transversais; a parte interna é rósea aromática, amargosa e ácida, exsudando látex amarelo e pegajoso (LORENZI, 1992). O *Calophyllum brasiliense* fornece madeira de alburno bastante espesso e cerne róseo-avermelhado ou castanho-avermelhado (Figura 2, p. 46), ondeada (parecendo cedro, porém mais pesada), fácil da lavrar e de serrar, talhe macio sendo muito empregado na construção de canoas, vigas, mastros, construção civil e obras internas em geral (CORRÊA, 1978).

Na medicina popular é obtida a gomo-resina que dela se obtém o bálsamo de jacareúba ou bálsamo de landim, goma amarelo-esverdeada, aromática, de sabor amargo, empregada como anti-reumático, antiulceroso e antitumoral, entretanto, como têm efeito irritativo o seu emprego é maior na medicina veterinária, sobretudo para eqüinos aplicados na forma de emplasto como relaxante dos tendões. A infusão e o banho das cascas são remédios populares utilizados para o tratamento de reumatismo, varicoses, hemorróidas e úlceras crônicas (CORRÊA, 1978).



**Figura 2:** Espécie vegetal *C. brasiliense* Cambess. A- aspecto geral da espécie; B- inflorescências e folhas; C- frutos verdes; D- frutos maduros; E- casca; F- madeira (LORENZI, 1992).

Muitos estudos tem sido realizados utilizando esta espécie vegetal *C. brasiliense* e importantes atividades biológicas foram descritas por diferentes autores, como segue.

Reyes-Chilpa et al. (1997) considerando que os metabólitos secundários presentes no *C. brasiliense*, lhe confere resistência a algumas espécies de fungos ambientais, realizou o estudo fitoquímico. Foram isoladas 5 diferentes xantonas preniladas denominadas: 6-desoxijacareubina, 1,5-diidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona, jacareubina (Figura 1, p. 43), 1,3,5 triidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona e 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona. As substâncias e os extratos em acetona, metanol e água foram submetidas a ensaio microbiológico frente ao fungo *Postia placenta*. O extrato metanólico da casca do *C. brasiliense* inibiu o crescimento micelial do *P. placenta* em 83%. As substâncias foram testadas na concentração de 0,25 mg/mL e algumas apresentaram atividade fungistática significativa, inibindo o crescimento micelial do *P. placenta* em 68,8% (jacareubina; 1,3,5 triidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona) e em 55,5% (1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona). Porém, acetilação das xantonas não conduziu ao aumento da atividade fungistática.

Sartori et al. (1999) avaliaram o efeito citoprotetor gástrico em ratos e camundongos, da fração diclorometano obtida a partir do extrato hexânico das cascas do *C. brasiliense*. Quando administrada por via oral doses de 12,5 a 250 mg/kg, esta fração exibiu significativa ação citoprotetora, anti-secretora e antiulcerogênica, inibindo a formação de lesões gástricas induzidas por etanol, indometacina e estresse por imobilização em hipotermia.

Mesía-Vela et al. (2001) re-isolaram das cascas do *C. brasiliense* as 4 xantonas denominadas: desoxijacareubina; jacareubina (Figura 1, p. 43); 1,3,5,6,tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona e 1,3,5,6,tetraidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona, previamente relatadas na literatura (REYES-CHILPA et al., 1997), e das folhas da mesma espécie duas cumarinas: mammea A/BA (Figura 1, p. 43) e mammea C/OA (Figura 1, p. 43). Estas substâncias foram submetidas a ensaio biológico em enzimas clonadas de fígado de rato,

verificando uma possível interação farmacocinética destas substâncias, frente a biotransformação hepática por sulfonação, realizada pelas sultransferases SULT1A1 e SULT2A1. Estas enzimas citosólicas são importantes agentes envolvidos no metabolismo de fase II de uma grande variedade de xenobióticos e importantes substâncias endógenas, incluindo esteróides, hormônios tireoidianos e catecolaminas. Os resultados revelaram que a desoxijacareubina; a jacareubina (Figura 1, p. 43) e a 1,3,5,6,tetraidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona foram substratos para a SULT1A em diferentes concentrações, entretanto não foram substrato para a SULT2A1. Ambas as cumarinas foram substratos para a SULT1A, contudo, somente a mammaea C/OA (Figura 1, p. 43) foi substrato para a SULT2A1. Estes resultados mostram a importância de considerar possíveis interações farmacocinéticas entre estes produtos naturais com esteróides, xenobióticos e outras substâncias endógenas (MESÍA-VELA et al., 2001).

Da Silva et al. (2001) testaram em ratos, as atividades analgésica e antiinflamatória de 3 frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) obtidas do extrato metanólico das folhas do *C. brasiliense*. Todas as frações testadas apresentaram alguma atividade analgésica e antiinflamatória, frente aos modelos de dor induzida por formalina e contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. A partir da fração acetato de etila foram isoladas 5 substâncias fenólicas: ácido gálico, ácido protocatéquico, hiperosídeo, amentoflavona e quercetina. Estas substâncias foram testadas e observou-se significativa atividade analgésica da quercetina e da amentoflavona, sugerindo que o estudo da atividade analgésica das substâncias isoladas das frações não polares do *C. brasiliense* poderá conduzir a novas drogas com significativo potencial analgésico.

Ito et al. (2002) isolaram pela primeira vez das cascas do *C. brasiliense* 7 xantonas, denominadas brasixantonas juntamente com outras 10 xantonas já conhecidas. Entre elas as brasixantonas (B, C, D) e 8-desoxigartanin exibiram significativa atividade antineoplásica,



inibindo o crescimento tumoral em células Raji (*in vitro*) induzidos pelo antígeno do vírus Epstein-Barr.

Ito et al. (2003) isolaram e identificaram das frações obtidas do extrato da casca do *C. brasiliense* 3 novas cumarinas nomeadas brasimarina A (Figura 1, p. 43), B e C, juntamente com outras 11 cumarinas previamente relatadas na literatura (KASMAN et al., 1992; PATIL et al., 1993; CROMBIE et al., 1987). Foram submetidas para avaliação de sua atividade antitumoral 8 das 14 cumarinas isoladas, sendo três fenil-cumarinas e cinco 4-propil-cumarinas. Foi observado que as 4-propil-cumarinas calanolideo-A (Figura 1, p. 43) e a mammea B/BB (Figura 1, p. 43) obtiveram atividade antitumoral mais significativa ( $CI_{50}$  = 170-290 mg/mL) quando comparadas com as 4-fenil-cumarinas ( $CI_{50}$  = 342 – 348 mg/mL). A mammea B/BB (Figura 1, p. 43), uma 4-propil-cumarina prenilada, apresentou maior potência inibitória ( $CI_{50}$  = 170 mg/mL). A calanolideo-A (Figura 1, p. 43) uma *trans*-10,11 dimetildiidropirano foi mais potente ( $CI_{50}$  = 290 mg/mL) que o derivado 10,11-*cis* calanolideo-C ( $CI_{50}$  = 351 mg/mL). Estes resultados sugerem que os grupos funcionais dos carbonos 10, 11 e 12 que são críticos para a atividade anti-HIV-1RT de algumas substâncias (KASHMAN et al., 1992; PATIL et al., 1993), podem também estar implicados com a potência da atividade antitumoral destes agentes. De uma forma geral, as 4-propil-cumarinas e as 4-fenil-cumarinas possuem potencial atividade citoprotetora frente a agentes promotores de tumoração, entretanto, um estudo destes compostos *in vivo* seria fundamental para o progresso dos agentes quimiopreventivos de origem natural.

Cottiglia et al. (2004) isolaram das cascas da *C. brasiliense* 6 novos ácidos cromanônicos. O extrato das cascas em n-hexano e em acetato de etila apresentaram atividade frente as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis*. Destes extratos foram isolados e testados os ácidos brasiliensofilico A, isobrasiliensofilico A, brasiliensofilico B, isobrasiliensofilico B, brasiliensofilico C e isobrasiliensofilico C. Os

ácidos brasiliensofílico A e isobrasiliensofílico A apresentaram maior atividade que o cloranfenicol (droga padrão). O estudo da citotoxicidade mostrou que nenhuma destas substâncias são citotóxicas para as células KB (HeLa), Jurkat T e células de miosarcoma sendo o  $CI_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$ .

Huerta-Reyes et al. (2004) estudaram a inibição do HIV-1 em 21 espécies da família Clusiaceae dentre elas estava a *C. brasiliense*. Foram preparados a partir das folhas da *C. brasiliense* extratos hexânico, metanólico, em acetona, em diclorometano:metanol (1:1). O extrato hexânico apresentou melhor atividade inibitória frente a transcriptase reversa do HIV-1 apresentando  $CI_{50} = 29,6 \mu\text{g/mL}$ , inibiu a replicação do HIV-1 IIIb/LAV em 74,5% ( $DE_{50} = 37,1 \mu\text{g/mL}$ ). No ensaio de citotoxicidade para os linfócitos MT2 os extratos hexânico, metanólico e em diclorometano:metanol (1:1) não apresentaram citotoxicidade. Este estudo sugere que o extrato em acetona, em metanol e principalmente o extrato hexânico possuem substâncias com potencial atividade anti-HIV.

O estudo realizado por Reyes-Chilpa et al. (2004) avaliou *in vitro* os efeitos citotóxicos das cumarinas tipo mammea presentes nas folhas da *C. brasiliense*. Além de 8 cumarinas tipo mammea (A/BA (Figura 1, p. 43), A/BB, B/BA, B/BB (Figura 1, p. 43), C/OA (Figura 1, p. 43), C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomammeína) foram isolados e testados os triterpenos friedelino e canofilol assim como os biflavonóides: amentoflavona, protocatequina, ácido chiquímico. Nos ensaios foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas K565 (linfoma), U251 (sistema nervoso central) e PC3 (próstata). As cumarinas foram citotóxicas para as três linhagens de células; no entanto a mammea A/BA (Figura 1, p. 43) apresentou maior atividade citotóxica ( $CI_{50} = 0,04 - 0,59 \mu\text{M}$ ), as misturas dos isômeros mammea A/BA + A/BB, mammea B/BA + B/BB e mammea C/OA + C/OB mostraram importante atividade ( $CI_{50} < 4.05 \mu\text{M}$ ), já a mistura mammea B/BA ciclo F + B/BB ciclo F e a isomammeína apresentou pequena atividade inibitória das células tumorais. O triterpeno

fridellino foi citotóxico somente para as linhagens PC3 e U254 e as outras substâncias testadas não apresentaram atividade. Também foram realizados testes de inibição da transcriptase reversa do HIV-1, no entanto nenhuma das substâncias inibiram a atividade desta enzima. Também foram testadas as atividades antibacteriana destas substâncias utilizando 14 espécies diferentes de bactérias; somente a mammea A/BA + A/BB e a mammea C/OA + C/OB inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *S. Epidermidis* e *Bacillus subtilis*.

Abe et al. (2004) avaliaram a atividade tripanosomicida da *C. brasiliense* frente a formas epimastigotas e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Para o estudo foi preparado o extrato da madeira em metanol:acetona (2:1) e este apresentou  $MC_{100} = 0,5$  mg/mL frente as formas epimastigotas, a partir deste extrato foram obtidas 3 frações (metanol 60%, metanol e acetato de etila), estas também foram testadas para as formas epimastigotas e apresentaram  $MC_{100} > 1000$  µg/mL,  $MC_{100} = 250$  µg/mL e  $MC_{100} > 1000$  µg/mL, respectivamente. A partir da fração em metanol foram isoladas 4 xantonas denominadas jacareubina (Figura 1, p. 43), 6-deoxijacareubina, 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona e a 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutenil)xantona, estas foram testadas frente as formas epimastigota e tripomastigota. Desta forma, frente as epimastigotas a jacareubina e a 6-deoxijacareubina apresentaram  $MC_{100} = 50$  µg/mL e as outras duas  $MC_{100} = 70$  µg/mL e  $MC_{100} > 300$  µg/mL, respectivamente. Já frente as tripomastigotas apresentaram  $MC_{100} = 15$  µg/mL;  $MC_{100} = 200$  µg/mL;  $MC_{100} = 40$  µg/mL e  $MC_{100} > 200$  µg/mL respectivamente. Este estudo mostrou importante atividade tripanosomicida das xantonas jacareubina (Figura 1, p. 43), 6-deoxijacareubina, 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3-metil-2-butenil)xantona.

Huerta-Reyes et al. (2004) isolaram a partir dos extratos em hexano, em acetona e em metanol das folhas da *C. brasiliense* as substâncias: calofilol, fridellino, ácido apetalico, ácido

isoapetálico e o seu isômero, amentoflavona, (+) calanolídeo A (Figura 1, p. 43), (-) calanolídeo B, (+) calanolídeo C e o soulatrolídeo. Destes (+) calanolídeo A (Figura 1, p. 43), (-) calanolídeo B e o soulatrolídeo apresentaram atividade frente ao HIV-1 RT.

Pretto et al. (2004) ensaiaram extratos metanólicos obtidos das raízes, caule, folhas, flores e frutos da *C. brasiliense*, todos os extratos apresentaram atividade frente a bactéria Gram-positiva, não apresentando atividade frente a bactéria Gram-negativa e leveduras testadas. A partir destes extratos foram isolados ácido brasiliensico, ácido gálico, epicatequina, ácido protocatéquico, friedelino, e a 1,5 diidroxixantona. Somente o ácido protocatéquico demonstrou atividade frente a todos os microorganismos testados e a 1,5 diidroxixantona apresentou atividade somente frente a bactéria Gram-positiva.

Isaias et al. (2004) analisaram os efeitos antinociceptivos de algumas frações obtidas a partir das raízes, flores e frutos da *C. brasiliense*, utilizando os modelos de dor induzida por formalina e contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em ratos. A partir da fração em clorofórmio das raízes foram isolados: o friedelino e a 1,5-diidroxixantona, estes apresentaram propriedades antinociceptivas sendo mais potentes que o ácido acetilsalicílico e o acetoaminofeno.

Gasparotto-Júnior et al. (2005) avaliaram a atividade moluscicida *C. brasiliense* frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*, molusco vetor da esquistossomose. Para este estudo foram preparados extratos hidroetanólicos 90% das folhas e dos galhos. A parte do extrato das folhas solúvel em diclorometano apresentou maior atividade que os demais, sendo a atividade moluscicida mínima 25 ppm (100% mortalidade). A fração em hexano deste extrato apresentou atividade moluscicida mínima em 1,2 ppm; a partir desta fração foi isolada pela primeira vez a cumarina 4-substituída ((-)mammea A/BB) na espécie *C. brasiliense* e esta apresentou  $DL_{50} = 0,67$  ppm e  $DL_{90} = 1,47$  ppm; sugerindo que esta substância pode ser um substituto em potencial para o moluscicida sintético niclosamida.

Yasunaka et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de vários extratos preparados a partir das folhas e da madeira *C. brasiliense* bem como as substâncias isoladas dos mesmos. O extrato em acetona das folhas apresentou melhor atividade frente as cepas de *Staphylococcus aureus* (CIM = 2 µg/mL). No entanto, a partir das folhas foram isolados o triterpeno friedelino e a cumarina mammea A/BA, já da madeira foram isoladas as xantonas: jacareubina (Figura 1, p. 43); 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,33-dimetilalil) xantona e a 6-deoxijacareubina. As substâncias, mammea A/BA, jacareubina (Figura 1, p. 43) e 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,33-dimetilalil) xantona foram ativas frente as cepas de *S. aureus* (resistente e sensível meticilina) e a 1,3,5,6-tetraidroxi-2-(3,33-dimetilalil) xantona e a 6-deoxijacareubina foram ativas frente a *Escherichia coli*.

Emendorfer et al. (2005) estudaram a atividade antiespasmódica (*in vitro*) do extrato metanólico das folhas da *C. brasiliense*, utilizando isolados de íleo de cobaia e duodeno de rato. Este extrato apresentou significativo efeito inibitório não competitivo e concentração dependente, da resposta contrátil promovida pela acetilcolina sob íleo de cobaia  $CI_{50} = 1,47$  mg/mL (0,64-3,42) e sobre duodeno de rato  $CI_{50} = 0,18$  mg/mL (0,15-0,24).

Considerando-se que a leishmaniose tegumentar americana é uma doença prevalente e de alta incidência em vários países do mundo entre eles o Brasil e que estudos mostraram que o extrato metanólico das folhas da *Calophyllum kunstleri* apresentou atividade leishmanicida frente a *Leishmania major* (TAKAHASHI et al., 2004) e que o extrato em metanol: acetona (2:1) da madeira da *Calophyllum brasiliense*, assim como as xantonas isoladas deste extrato apresentam atividade tripanosomicida (ABE et al., 2004) como descritos anteriormente torna interessante o estudo do gênero *Calophyllum*, já que este apresenta substâncias responsáveis por possíveis atividade antiprotozoários.

Desta maneira surgiu o interesse no estudo da atividade antileishmania do *Calophyllum brasiliense* frente à *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, bem

como no isolamento da substância que apresenta esta atividade. Também surgiu o interesse em complementar estes estudos avaliando, o efeito citotóxico da substância responsável pela atividade antileishmania sobre os macrófagos J774G8 e as alterações ultraestruturais nos protozoários tratados com a substância ativa.

## 2 OBJETIVOS

Realizar estudos utilizando as folhas da espécie vegetal *Calophyllum brasiliense*, visando:

- Efetuar o processo de extração, isolamento e identificação química de substâncias a partir do pó das folhas do *C. brasiliense*.
- Caracterizar o extrato das folhas da *C. brasiliense* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas.
- Fracionar o extrato bruto e purificar as frações que apresentarem atividade biológica por métodos cromatográficos clássicos, assim como identificar, por meio de instrumentos de análise química, a substância química com atividade biológica.
- Verificar o efeito dos extratos brutos, das frações e das substâncias isoladas sobre o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *L. amazonensis* e formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.
- Realizar ensaios de citotoxicidade da substância com atividade antileishmania, frente à cultura de macrófagos J774G8.
- Avaliar por microscopia eletrônica de transmissão, as alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a substância biologicamente ativa.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ESTUDO QUÍMICO**

##### **3.1.1 Material Vegetal**

A matéria prima utilizada neste estudo consistiu das folhas do *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae), as quais foram coletadas na Ilha do Cardoso localizada no Estado de São Paulo, pela professora Doutora Maria Claudia Young em março de 2001, e a exsicata foi depositada como documento taxonômico no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, sob número de registro SP363818.

##### **3.1.2 Processamento do Material Vegetal**

As folhas do *Calophyllum brasiliense* Camb. foram secas em estufa de ar circulante (QUIMIS®, modelo Q-31), trituradas em moinho de facas Tecnal Marconi® (modelo TE 048), acondicionadas e armazenadas em local seco e ao abrigo da luz.

##### **3.1.3 Dados Espectroscópicos e Espectrométricos**

Para identificação das substâncias puras foram utilizados métodos espectroscópicos e espectrométricos.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas equipado com interface APCI no modo negativo e ESI-MS/MS (modo negativo) – MICROMASS QUATTRO LC do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.



As análises por ressonância magnética nuclear (RMN), unidimensionais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT e bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC foram realizadas no laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) utilizando espectrômetro VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB, 300 MHz para  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC e HMBC e 75,5 MHz para  $^{13}\text{C}$  e DEPT. Algumas análises por RMN bidimensionais de HMBC, HSQC e novamente COSY, foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos utilizando espectrômetro BRUCKER, modelo DRX-400 de 400 MHz. Para a obtenção dos espectros foi utilizado solvente deuterado (ALDRICH®) apropriado, em função da solubilidade da substância a ser analisada e como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ( $\delta = 0,0$  ppm).

### 3.1.4 Técnicas Cromatográficas

#### 3.1.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a realização da CCD foram utilizadas placas de vidro de 5,0 x 10,0 cm preparadas com 0,25 mm de sílica gel GF<sub>254</sub> (MERCK®), ativadas a 105-110 °C por 30 minutos de acordo com Lopes (1997) e cromatoplasmas pré-fabricadas de alumínio Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (MERCK®), 20,0 x 20,0 cm com 0,2 mm de espessura. Como fases móveis foram utilizados solventes puros, misturas binárias e terciárias de polaridades diferentes de acordo com a característica química das substâncias presentes. Os solventes utilizados apresentavam grau p.a (SYNTH® e NUCLEAR®).

A visualização das substâncias nas placas de CCD foi realizada por radiação com luz UV ( $\lambda=254$  e 366 nm), e após revelação utilizando reativo de Godan (solução etanólica de

vanilina 1% e solução aquosa de ácido perclórico 3%). Para revelar foi necessário colocar na estufa 105-110 °C até o aparecimento das manchas (WAGNER, 1984).

#### 3.1.4.2 Cromatografia em coluna de adsorção

Esta técnica cromatográfica foi utilizada na purificação de algumas frações. Para o fracionamento foram utilizadas colunas de vidro de diversas dimensões, preparadas segundo os procedimentos descritos por Vichenevski (1997). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (70 – 230 mesh ASTM – MERCK®). Para a eluição das colunas cromatográficas por adsorção foram desenvolvidos vários sistemas eluentes de diferentes polaridades de acordo com a característica química das substâncias a serem eluídas. Foram utilizados solventes puros (grau p.a) e misturas de solventes, variando a proporção entre os mesmos. As frações foram eluídas da coluna por solventes em ordem crescente de polaridade e coletadas em tubos de ensaio. Posteriormente foram cromatografadas utilizando cromatografia em camada delgada e após revelação utilizando reativo de Godan as frações foram reunidas de acordo com a semelhança química. Em seguida foram concentradas em aparelho evaporador rotatório (modelo: R-114 – BÜCHI) à pressão reduzida com temperatura de 35-40 °C até completa eliminação do solvente, estas foram colocadas em recipientes de vidro, liofilizadas (liofilizador – modelo: 1-2 CHRIST ALPHA) e armazenadas em freezer (-10 °C).

#### 3.1.4.3 Cromatografia em coluna de adsorção à pressão reduzida

Para o fracionamento dos extratos foram utilizadas colunas cromatográficas de vidro com 3,0 cm de diâmetro e 35,0 cm de comprimento, acoplada a Kitasato e este conectado a uma bomba de vácuo.

A coluna cromatográfica foi preparada seguindo os procedimentos descritos por Vichenevski (1997). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (70 – 230 mesh) e como fase móvel, solventes puros (grau p.a) ou misturas destes ou seja foram preparados vários sistemas eluentes de diferentes polaridades de acordo com a característica química das substâncias a serem eluídas. Em seguida, todas as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada e concentradas em aparelho evaporador rotatório à pressão reduzida com temperatura de 35-40 °C até completa eliminação do solvente. As frações concentradas foram colocadas em recipientes de vidro de diferentes dimensões dependendo do volume de cada fração e posteriormente estas frações foram liofilizadas e armazenadas em freezer (-10 °C).

#### 3.1.4.4 Cromatografia por filtração em gel de SEPHADEX LH-20

Esta técnica cromatográfica foi utilizada na purificação de algumas frações. Para o fracionamento em coluna cromatográfica por filtração ou exclusão foram utilizadas colunas de vidro de diversas dimensões, como fase estacionária a resina SEPHADEX® LH-20, conforme descrito por Still (1978) e Rothschild (1997). Como fases móveis foram preparados sistemas eluentes cujas polaridades variam de acordo com as características químicas das frações que foram cromatografadas. Para preparar os sistemas eluentes foram utilizados solventes puros (grau p.a) e misturas de solventes variando a proporção entre os mesmos. No entanto, a cromatografia em coluna foi desenvolvida pelo modo isocrático, ou seja, foi utilizado somente um sistema eluente para cromatografar uma determinada amostra, as frações eluídas da coluna foram coletadas em tubos de ensaio. Posteriormente, foram cromatografadas utilizando cromatografia em camada delgada, e as frações foram reunidas de acordo com a semelhança química. Em seguida foram concentradas em aparelho evaporador rotatório à pressão reduzida com temperatura de 35-40 °C até completa eliminação do

solvente, estas foram colocadas em recipientes de vidro, liofilizadas e armazenadas em freezer (-10 °C).

#### 3.1.4.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)

As análises por CLAE foram realizadas nas seguintes condições: sistema controlador Shimadzu (SCL-10A) equipado com detector de arranjo de fotodiodo (SPP-M10AVP), injetor automático (SIL-10ADVP), duas bombas de solvente A (LC-10ADvp) (água milliQ) e B (acetonitrila) (LC-10AD), sistema controlador (SCL-10A) e computador com Software (CLASS-VP 5.032) para aquisição de dados, foi utilizada coluna de fase reversa Metasil ODS (MetaChem), 150X4,6 mm com partícula de 5 µm. A análise qualitativa foi realizada utilizando um sistema gradiente: acetonitrila: água 5:95 v/v a 55:45 (0-10min.), 55:45 v/v a 80:20 (10-20min.), 80:20 v/v a 100% de acetonitrila (20-30min.) e 100% de acetonitrila (30-40min.). A vazão da fase móvel permaneceu a 0,6 mL/min. O detector utilizado foi de arranjo de diodos (DAD) de 200 nm a 420 nm, monitorado num comprimento de onda de 254 nm. As análises foram procedidas em cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massa Micromass Quattro LC, utilizando-se uma interface APCI no modo negativo.

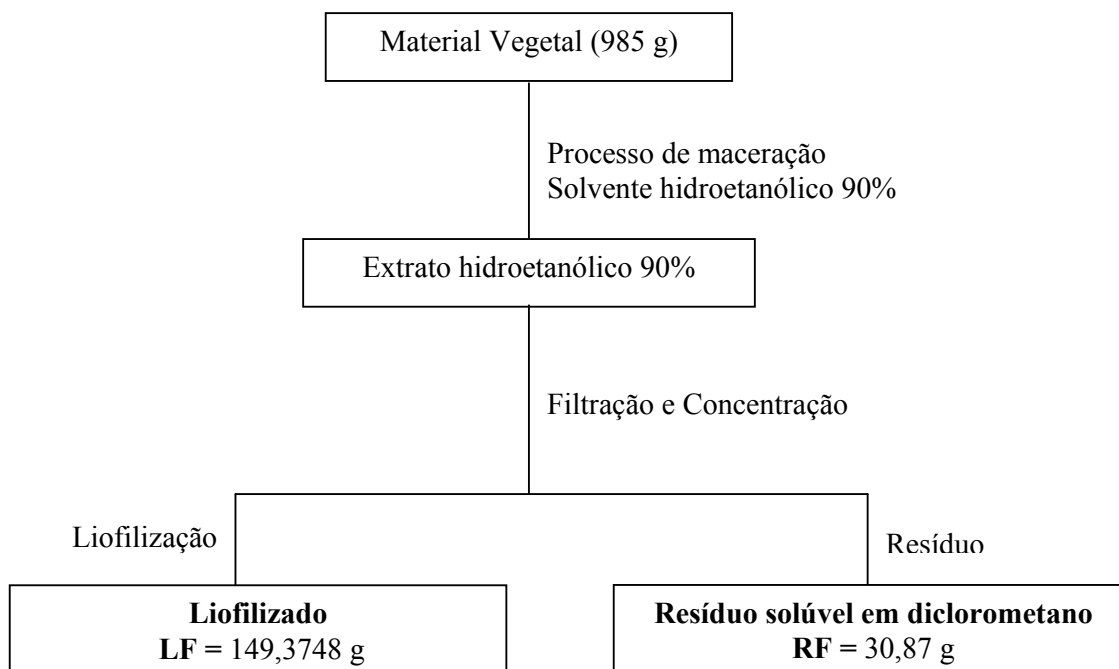
Para esta avaliação foi preparada uma amostra do extrato em diclorometano (**RF**) das folhas de *C. brasiliense* nas concentrações de 30 mg/mL em metanol e amostras das substâncias puras na concentração de 1 mg/mL em metanol, estas foram filtradas em filtro Millex® e 20 µl do extrato e 10 µl das substâncias puras foram injetadas no aparelho de CLAE.

### 3.1.5 Extração, Fracionamento e Isolamento dos Constituintes Químicos

#### 3.1.5.1 Preparo dos Extratos Brutos

As folhas secas (990 g) foram trituradas em moinho de facas e extraídas exaustivamente pelo processo de maceração a frio até esgotamento (PRISTA et al., 1975), a temperatura ambiente em local protegido da luz, utilizando como líquido extrator etanol/água 9:1 (v/v). Para cada 50,0 g do pó da planta foram utilizados 500 mL de líquido extrator. Os extratos hidroalcoólicos obtidos foram filtrados e concentrados à pressão reduzida em evaporador rotatório à temperatura de 35-40 °C até eliminação total do solvente orgânico, a parte solúvel em água foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada, sendo o produto final denominado **LF** (**LF**= liofilizado das folhas). Já a parte do extrato insolúvel em água (resíduo) foi solubilizado em diclorometano e rotaevaporado a 35-40 °C até eliminação do solvente, sendo denominado **RF** (**RF**= extrato residual das folhas). Ambos os extratos **RF**= 30,87 g e **LF**=149,3 g (Fluxograma 1, p. 62) foram armazenados ao abrigo da luz em freezer (-10 °C) para posteriormente serem submetidos aos testes de atividade biológica e/ou fracionamento e purificação por métodos cromatográficos.

Os extratos brutos **RF** e **LF** foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), eluídos em fase móvel hexano:acetato de etila (50:50, v/v).



**Fluxograma 1:** Procedimento para obtenção dos extratos brutos hidroetanólicos 90% a partir das folhas secas e moídas do *Calophyllum brasiliense* Cambess.

### 3.1.5.2 Fracionamento do extrato bruto residual das folhas solúvel em diclorometano (RF)

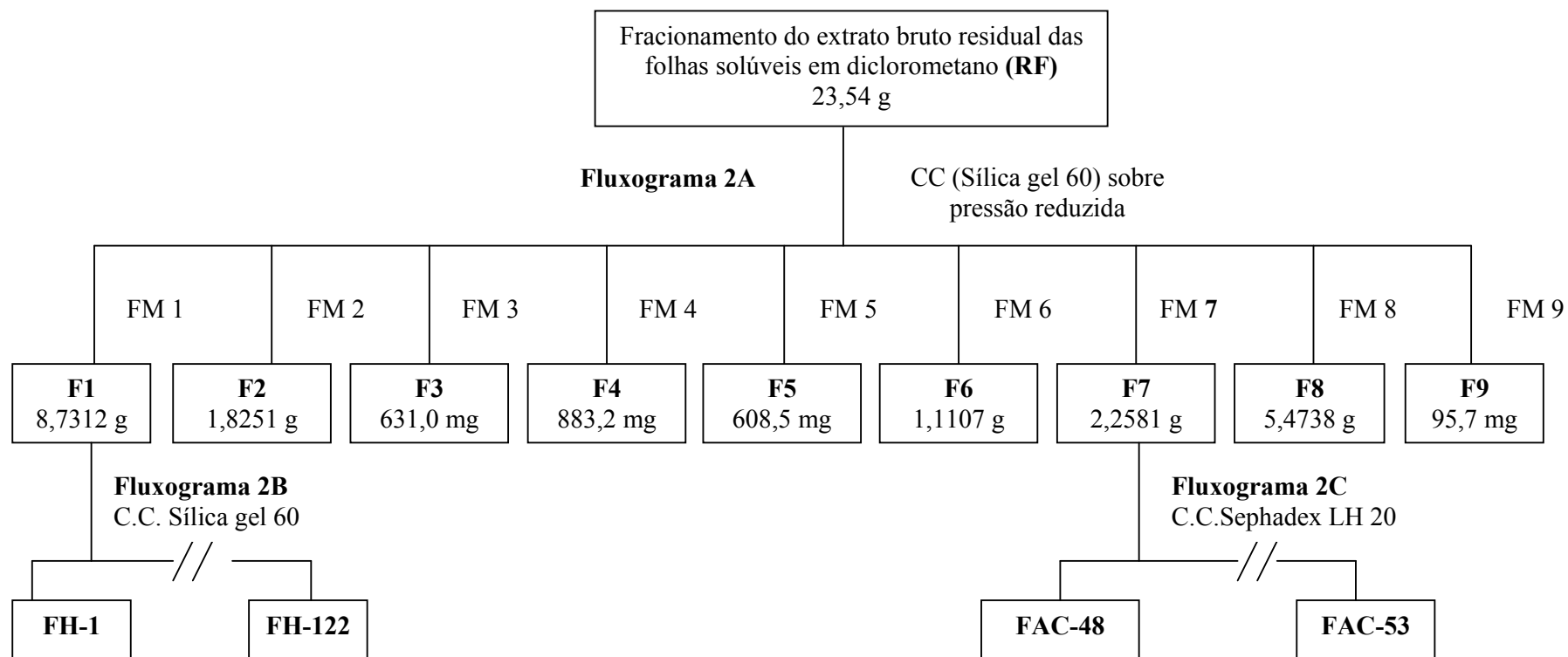
Baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios biológicos, o extrato bruto residual das folhas do *Calophyllum brasiliense* solúvel em diclorometano (RF) apresentou melhor atividade antileishmania e este foi fracionado por cromatografia em coluna de adsorção à pressão reduzida, utilizando como fase móvel, solventes orgânicos de polaridades crescentes (Fluxograma 2A, p. 64), onde 23,54 g do extrato RF foram incorporados em almofariz de porcelana a 140,0 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) com o auxílio de diclorometano, esta mistura de sílica e extrato foi empacotada a coluna de vidro com 3,0 x 35,0 cm. A coluna foi

eluída utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (Tabela 1, p. 63). As frações foram concentradas em evaporador rotatório, evaporadas a temperatura ambiente e em seguida pesadas e mantidas em freezer (-10 °C). As 09 frações obtidas foram analisadas por CCD utilizando fases móveis apropriadas.

**Tabela 1:** Sistemas eluentes para o fracionamento do extrato bruto residual das folhas do *Calophyllum brasiliense* Camb. solúvel em diclorometano (RF) por cromatografia em coluna de adsorção a vácuo.

Sistema Eluente	Proporção	Quantidade utilizada (mL)	Fração/quantidade obtida
Hexano	-	1000*	F1 = 8,7312 g
Hexano:Diclorometano	50:50	300	F2 = 1,8251 g
Diclorometano	-	700*	F3 = 631,0 mg
Diclorometano:Acetato de etila	90:10	300	F4 = 883,2 mg
Diclorometano:Acetato de etila	80:20	300	F5 = 608,5 mg
Diclorometano:Acetato de etila	50:50	300	F6 = 1,1107 g
Acetato de etila	-	700*	F7 = 2,2581 g
Metanol	-	700*	F8 = 5,4738 g
Metanol:Água	90:10	500*	F9 = 95,7 mg

\*Até completa extração



**Fase Móvel da CC:** **FM1**= Hexano; **FM2**= Hexano:Diclorometano (50:50); **FM3**= Diclorometano; **FM4**= Diclorometano:Acetato de etila (90:10) **FM5**= Diclorometano:Acetato de etila (80:20); **FM6**= Diclorometano:Acetato de etila (50:50); **FM7**= Acetato de etila; **FM8**= Metanol; **FM9** Metanol:água (90:10)

**Fluxograma 2:** Procedimento para isolamento e purificação dos constituintes do extrato residual das folhas do *C. brasiliense* solúveis em diclorometano (**RF**). **2B** fracionamento da fração hexano (**FH1**); **2C** fracionamento da fração acetato de etila (**FAC7**).



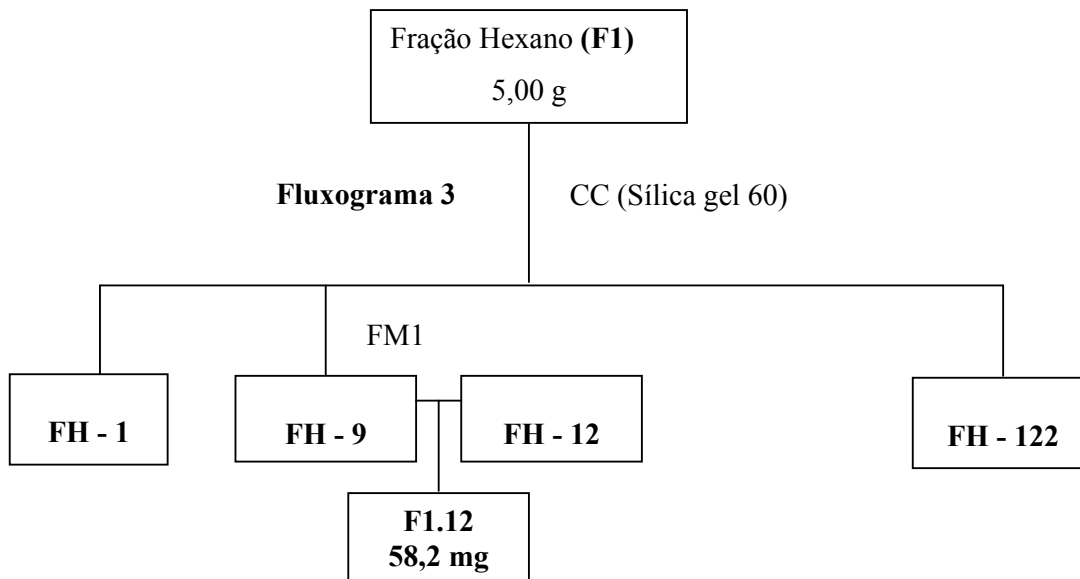
### 3.1.5.3 Fracionamento da Fração Hexano (F1)

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios leishmanicidas *in vitro* e da análise por CCD das frações obtidas a partir do extrato bruto residual (**RF**) solúvel em diclorometano, a fração hexano (8,7312 g) foi selecionada para o isolamento da(s) substância(s) pura(s).

A fração hexano foi submetida ao processo de cromatografia em coluna de adsorção, onde 5,0 g da referida fração foi cromatografada com 45,0 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) em coluna de 1,5 x 25,0 cm, empacotada com hexano (Fluxograma 2B, p. 64) e eluída com solventes de polaridades crescentes (Fluxograma 3, p. 66), desta forma, foram obtidas 122 frações, as quais foram analisadas por CCD. As frações que apresentaram semelhanças cromatográficas foram reunidas, re-cromatografadas em CCD e em seguida evaporadas a temperatura ambiente. As frações foram denominadas de FH-1 à FH-122 (Fluxograma 3, p. 66) pesadas e mantidas em freezer (-10 °C).

### 3.1.5.4 Isolamento da substância bioativa a partir da fração hexano

A substância pura foi obtida a partir do fracionamento da fração hexano (Fluxograma 2B). As frações de interesse FH-9 a FH-12 com identidade cromatográfica foram reunidas, obtendo-se a subfração F1.12 (58,2 mg). A subfração foi analisada em CCD, utilizando como fase móvel Hexano: Acetato de etila (95:5), a cromatoplaça foi visualizada através de radiação UV; e após a revelação, com reativo de Godan (Fluxograma 3). A subfração F1.12 foi identificada pelas análises espectrométricas descritas em 3.1.3 e por comparação com os dados registrados na literatura como sendo uma cumarina (substância pura). Em seguida foi submetida aos ensaios leishmanicidas.



**Fase Móvel da CC:** **FM1** = Hexano; **FM2** = Hexano:Diclorometano (98:2); **FM3** = Hexano:Diclorometano (95:5); **FM4** = Hexano:Diclorometano (90:10); **FM5** = Hexano:Diclorometano (80:20); **FM6** = Hexano:Diclorometano (50:50); **FM7** = Diclorometano; **FM8** = Diclorometano:Acetato de etila (98:2); **FM9** = Diclorometano:Acetato de etila (95:5); **FM10** = Diclorometano:Acetato de etila (90:10); **FM11** = Diclorometano:Acetato de etila (80:20); **FM12** = Diclorometano:Acetato de etila (50:50); **FM13** = Acetato de etila; **FM14** = Metanol.

**Fluxograma 3** - Isolamento da substância bioativa a partir da fração hexano.

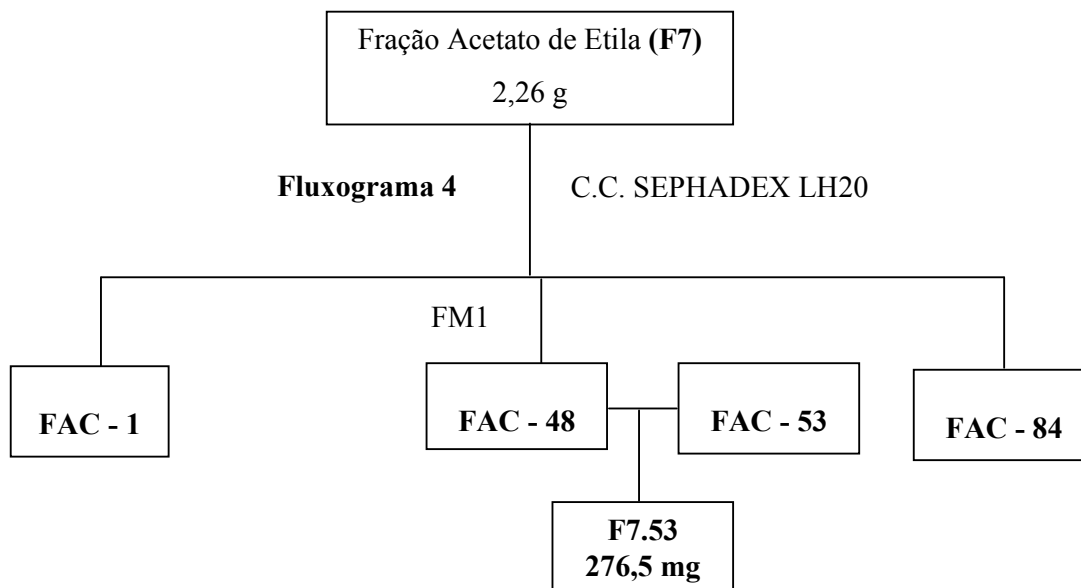
### 3.1.5.5 Fracionamento da fração acetato de etila (F7)

De acordo com a análise por CCD das frações obtidas a partir do extrato bruto residual solúvel em diclorometano (**RF**), a fração acetato de etila (**F7**) (2,26 g) foi selecionada para o estudo fitoquímico.

A fração acetato de etila (**F7**) foi submetida ao processo de cromatografia em coluna por filtração utilizando como fase em estacionária resina SEPHADEX® LH-20 pelo método isocrático, ou seja, como eluente foi utilizado somente Clorofórmio:Metanol (1:1). A fração foi solubilizada em Clorofórmio:Metanol (1:1) e aplicada em coluna de dimensões 1,5 x 25,0 cm, (Fluxograma 2C, p. 64). Foram obtidas 84 frações, as quais foram analisadas em CCD. As frações que apresentaram semelhanças cromatográficas foram reunidas, re-cromatografadas em CCD e em seguida evaporadas a temperatura ambiente. As frações foram denominadas de FH-1 à FH-84 (Fluxograma 4, p. 68) pesadas e mantidas em freezer (-10 °C).

### 3.1.5.6 Isolamento da substância F7.53

A substância **F7.53** foi obtida a partir do fracionamento da fração acetato de etila (**F7**) (Fluxograma 2C, p. 64). As frações de interesse FH-48 a FH-53 apresentaram identidade cromatográfica e foram reunidas, obtendo-se a subfração F7.53 (276,4 mg). A subfração foi analisada em CCD, utilizando como fase móvel Clorofórmio:Acetona (1:1), a cromatoplaça foi visualizada através de radiação UV; e após a revelação, com reativo de Godan (Fluxograma 4, p. 68). A subfração F7.53 foi identificada pelas análises espectrométricas descritas em 3.1.3 e por comparação com os dados registrados na literatura como sendo o biflavonóide conhecido como Amentoflavona. Este em seguida foi submetida aos ensaios antileishmania.



**Fase Móvel da CC:** FM1 = Clorofórmio:Metanol (1:1)

**Fluxograma 4:** Isolamento da substância F7.53 a partir da fração acetato de etila.

### 3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA *Calophyllum brasiliense*.

#### 3.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA *C. brasiliense* FRENTE À *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

##### **3.2.1.1 Cultura das formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FERREIRA et al., 2004)**

Para o estudo foram utilizadas formas promastigotas (extracelulares) da *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa MHOM/BR1987/M11272. As formas promastigotas foram cultivadas em frascos para cultura de células de 25cm<sup>2</sup> até a fase log de crescimento utilizando o meio Drosophila de Schneider suplementado com soro fetal bovino a 10% (v/v) inativado por aquecimento (56 °C por 30 minutos). O meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D (FANEM modelo 347 F) a 25 °C. Para os experimentos, as formas promastigotas foram ressuspensas em meio fresco e contadas em câmara de Neubauer, ajustando a concentração destas a 4x10<sup>6</sup> células/mL. Para a manutenção das culturas de protozoários, estes foram submetidos a repiques semanais.

##### **3.2.1.2 Avaliação da atividade antileishmania do *Calophyllum brasiliense* frente ao crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (FERREIRA et al., 2004)**

Para avaliar o efeito dos extratos (**RF**) e (**LF**), da fração (**F1**) e das substâncias puras (**F1.12**) e (**F7.53**) sobre o crescimento das formas promastigotas da *Leishmania (V.)*

*braziliensis*, foram pesados 5mg e diluídos em 500 µL de DMSO (dimetilsulfóxido – SIGMA CHEMICAL Co, St Louis, MO, USA®) e a partir desta solução estoque foram preparadas concentrações de 320 µg/mL a 0,125 µg/mL e estas foram adicionadas às culturas de formas promastigotas contendo  $4 \times 10^6$  células/mL na fase log (exponencial) de crescimento, ou seja 72 horas após subcultivo. Estas culturas de formas promastigotas foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino inativado e incubadas em repouso a 25 °C em estufa por 24 horas. Os experimentos foram realizados em placa de 96 poços (TPP®). O crescimento foi avaliado após incubação 24 horas, através da diluição da cultura de protozoários em formalina 5% e contagem das células em hemocítômetro (câmara de Neubauer). As contagens foram comparadas com os controles. Como parâmetros de comparação foram preparados os controles de cultura dos protozoários sem adição dos extratos, da fração ou das substâncias, e com adição de pequenos volumes de DMSO utilizados para solubilizar os extratos, a fração e as substâncias a serem testadas, onde a maior concentração utilizada não ultrapassou 1,0% (v/v). Também foi utilizado como droga referência o Isetionato de pentamidina (Eurofarma). Os experimentos foram realizados em triplicata em momentos diferentes.

### **3.2.1.3 Análise estatística**

A  $DL_{50}$  foi determinada por análises de regressão linear da porcentagem de inibição, com limite de 10%, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2003, Windows XP (FERREIRA et al., 2004).

### 3.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA *C. brasiliense* FRENTE À *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

#### 3.2.2.1 Cultura das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Para o estudo foi utilizada a cepa de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/75/JOSEFA), que foi originalmente isolada pelo Dr. César A. C. Cuba (Universidade Federal de Brasília, Distrito Federal, DF) de um paciente com leishmaniose cutânea difusa.

As formas promastigotas foram cultivadas e mantidas como descrito por Chang e Hendricks (1985). Para o cultivo foram utilizados frascos para cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio Warren (infusão de cérebro e coração DIFCO® + hemina + ácido fólico) pH 7,0 esterilizado por autoclavação a 121 °C por 15 minutos, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO®), inativado a 56 °C por 30 minutos. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. (FANEM modelo 347 F) a 25 °C. Para a manutenção da cultura de protozoários, estas foram submetidas a repiques semanais e para os experimentos, foram utilizadas culturas na fase logarítmica de crescimento, ou seja, 48 horas de incubação após subcultivo.

#### 3.2.2.2 Cultura das formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Para o estudo as formas amastigotas axênicas foram cultivadas e mantidas em frascos para cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de Schneider (SIGMA®) pH 4,6 esterilizado

por filtração em membrana com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ , suplementado com 20% de soro fetal bovino, inativado a 56 °C por 30 minutos. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D a 32 °C. Para a manutenção da cultura de protozoários, estas foram submetidas a repiques semanais e para os experimentos, foram utilizadas culturas na fase logarítmica de crescimento, ou seja, após 72 horas de incubação após subcultivo.

### 3.2.2.3 Preparo das soluções estoque das drogas.

Para o preparo de uma solução de 16 mg/mL do extrato (**RF**) e da fração hexano (**F1**) da *C. brasiliense*, foram pesados exatamente 16 mg da amostra em tubos Eppendorf estéril, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido – SIGMA CHEMICAL Co, St Louis, MO, USA®) e agitou-se vigorosamente em agitador Vortex® até a dissolução completa. Completou-se o volume para 1000  $\mu\text{L}$  com 900  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, obtendo-se assim uma solução estoque do extrato e da fração que foram utilizadas nos experimentos, a partir das quais foram preparadas as demais concentrações.

Para o preparo da solução estoque 1,0 mg/mL da substância purificada (**F1.12**) a partir da *C. brasiliense*, foi pesado exatamente 1,0 mg da amostra em tubos Eppendorf estéreis, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, agitou-se vigorosamente em agitador Vortex® até a dissolução completa. Completou-se o volume para 1000  $\mu\text{L}$  com 900  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, obtendo-se assim uma solução estoque 1000  $\mu\text{g/mL}$  da substância, a partir da qual foram obtidas as demais concentrações.



#### **3.2.2.4 Avaliação da atividade antileishmania do *Calophyllum brasiliense* frente ao crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.**

Para avaliar a atividade do extrato **(RF)** e da fração hexano **(F1)** e da substância **(F1.12)** frente ao crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, várias concentrações do extrato, da fração e da substância foram adicionadas ao meio de cultura contendo  $1,0 \times 10^6$  protozoários/mL na fase exponencial de crescimento, obtendo-se as seguintes concentrações finais, para **(RF)** e **(F1)** (160, 80, 40, 20, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) e para **(F1.12)** (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625  $\mu\text{g/mL}$ ). Para estabelecer um parâmetro de comparação, foram utilizados como controles, culturas de protozoários sem adição de extrato, fração ou substância pura e culturas com adição de pequenos volumes de DMSO utilizados para solubilizar o extrato, a fração e a substância, onde a maior concentração utilizada não ultrapassou 1,0% (v/v). Nos experimentos as culturas das formas promastigotas foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 25 °C. Estes experimentos foram realizados em placas de 24 poços (TPP®) e incubados em repouso por um período de até 72 horas. O crescimento foi avaliado 24, 48 e 72 horas após incubação, através da diluição da cultura de protozoários em formalina 5% e contagem das células em hemocitômetro (câmara de Neubauer). Os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes.

#### **3.2.2.5 Avaliação da atividade antileishmania do *Calophyllum brasiliense* frente ao crescimento de formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.**

Para avaliar a atividade do extrato **(RF)** e da fração hexano **(F1)** e da substância **(F1.12)** frente ao crescimento das formas amastigotas (axênicas) de *L. amazonensis*, várias concentrações do extrato, da fração e da substância foram adicionadas ao meio de cultura contendo  $1,0 \times 10^6$  protozoários/mL na fase exponencial de crescimento, obtendo-se as

seguintes concentrações finais, para **(RF)** (160; 80; 40; 20; 10; 5; 1 µg/mL), para **(F1)** (80; 40; 20; 10; 5; 1; 0,5 µg/mL) e para **(F1.12)** (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 µg/mL). Para estabelecer um parâmetro de comparação, foram utilizados como controles, culturas de protozoários sem adição de extrato, a fração ou substância pura e culturas com adição de pequenos volumes de DMSO utilizados para solubilizar o extrato, a fração e a substância, onde a maior concentração utilizada não ultrapassou 1,0% (v/v). As culturas das formas amastigotas foram suplementadas com 20% de soro fetal bovino e incubadas a 32 °C. Estes experimentos foram realizados em placas de 24 poços e incubados a 32 °C em repouso por um período de até 72 horas. O crescimento foi avaliado diariamente 24, 48 e 72 horas após incubação, através da diluição da cultura de protozoários em formalina 5% e contagem das células em hemocítmetro (câmara de Neubauer). Os experimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes.

### **3.2.3 Estudo da citotoxicidade da substância pura (F1.12) em macrófagos J774G8**

#### **3.2.3.1 Cultura de macrófagos J774G8**

Os macrófagos da linhagem contínua J774G8 foram cultivados em frascos de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO®) pH 7,2; o qual foi previamente esterilizado por processo de filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por 30 minutos a 56 °C e as culturas foram mantidas em estufa (FISCHER SCIENTIFIC) à temperatura de 37 °C e sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura suplementado com soro fetal bovino foi substituído diariamente nas culturas de células. Para a manutenção das culturas de macrófagos, estas foram repicadas de 3 em 3 dias.

### 3.2.3.2 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774G8

Para verificar a toxicidade da substância pura (**F1.12**) foram utilizados macrófagos de linhagem contínua J774G8. O experimento foi realizado em placas de 96 poços, onde foram adicionados  $5 \times 10^4$  macrófagos/poço e então incubados com RPMI-1640 pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24 horas a 37 °C e sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub>, para haver a formação de uma monocamada confluyente de células. Após a formação da monocamada de células, foi retirado o meio colocado no dia anterior e foram adicionadas diferentes concentrações da substância (1000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 1; 0,5 µg/mL). Após 48 horas de incubação em estufa a 37 °C e sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub>, as células viáveis foram quantificadas pelo método colorimétrico da sulforrodamina B como descrito por Papazisis et al. (1997). Para proceder a quantificação o meio foi retirado dos poços e as células que ficaram aderidas foram fixadas adicionando-se 50 µL/poço de ácido tricloroacético 10%, sendo a microplaca foi mantida por 1 hora a 4 °C, após os poços foram lavados em água corrente, e foram adicionados 50 µL/poço de sulforrodamina B (0,4% p/v em solução de ácido acético 1%), sendo a microplaca protegida da luz e mantida por 30 minutos a 4 °C, logo após os poços foram lavados com solução de ácido acético 1% e foi adicionados 150 µL/poço de Trisbase 10 mM, a microplaca foi agitada durante 15 minutos e a leitura procedida com o auxílio de um leitor de Elisa (modelo POWER WAVE XS), em comprimento de onda de 530 nm. Como parâmetro de comparação foi preparado um branco contendo somente meio de cultura RPMI 1640, um controle de células sem adição da substância e um controle de células com a adição de pequenos volumes de DMSO utilizados para solubilizar os a substância testada, onde a maior concentração utilizada não ultrapassou 1,0% (v/v). Este experimento foi realizado em triplicata e em três momentos diferentes.

### 3.2.4 Análise das alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis* (SOUZA, 1998).

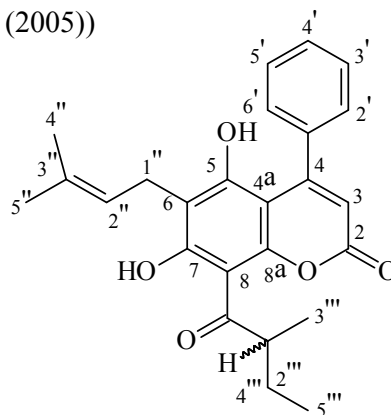
Para a avaliação das alterações ultraestruturais promovidas pela substância (-) mammea A/BB sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, os protozoários controle e tratados com  $CI_{50}$  (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $CI_{90}$  (5,0  $\mu\text{g/mL}$ ) da substância (-) mammea A/BB isolada da *C. brasiliense* foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. Desta forma, as suspensões contendo  $1,0 \times 10^6$  protozoários/mL não tratada ou tratada com  $CI_{50}$  (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $CI_{90}$  (5,0  $\mu\text{g/mL}$ ) da substância foram cultivadas em meio Warren pH 7,0 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e incubadas durante 72 horas em estufa B. O. D. 25 °C, após estas culturas foram centrifugadas (300 G por 10 minutos) e o sobrenadante retirado e então o sedimento contendo os protozoários foi fixado a 4 °C em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Após a fixação, os protozoários foram pós fixados por 30 minutos em uma solução com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1 M. Posteriormente, foram lavados com tampão cacodilato, desidratados em concentrações crescentes de acetona e embebido em resina Epon. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo (REICHTER) coletados em grade de níquel (300 mesh) e então contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDO QUÍMICO

#### 4.1.2 Determinação Estrutural da substância com atividade biológica (F1.12).

A fração **F1.12** (58,2 mg) foi isolada por cromatografia em coluna de sílica a partir da fração hexano obtida do extrato residual das folhas da *C. brasiliense* solúvel em diclorometano (**RF**) (fluxograma 3, p. 66). Esta fração foi identificada pelas análises dos dados espectrométricos e espectroscópicos como sendo a substância (-) mammea A/BB, no entanto, esta estrutura já havia sido proposta em um trabalho anterior e os dados físicos, espectroscópicos e espectrométricos estão de acordo com os dados publicados por Gasparotto-Júnior et al. (2005). A (-) mammea A/BB é uma substância cristalina de cor branca, ponto de fusão 124-125°C,  $[\alpha]_D = -10$  (CHCl<sub>3</sub>, c 0,14), UV  $\lambda_{\max}$  em CHCl<sub>3</sub>, nm (log  $\epsilon$ ): 240 (4,43), 289 (4,28) e 334 (4,31); IV  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3440, 2974, 2926, 2845, 1733, 1617, 1597, 1555, 1391, 1229, 1185; ESI-MS/MS:  $m/z$  (int. rel. %): 405 [M-H]<sup>-</sup> (24), 333 (36), 305 (51), 277(100); ESI-MS:  $m/z$  (int. rel. %): 405 [M-H]<sup>-</sup> (100); RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, COSY, DEPT, HMQC e HMBC (GASPAROTTO-JÚNIOR et al. (2005))



(-) mammea A/BB

#### 4.1.3 Determinação Estrutural da substância F7.53.

A substância **F7.53** (276,4 mg) foi isolada da fração acetato de etila obtida a partir do extrato residual das folhas da *C. brasiliense*, solúvel em diclorometano (**RF**) (Fluxograma 4, p. 68).

A comparação dos dados espectrométricos RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos com os valores RMN  $^{13}\text{C}$  relatados na literatura (MARKHAM et al.,1987), assim como os demais dados espectrométricos permitiu a caracterização da substância **F7.53** isolada do *C. brasiliense* como sendo um biflavonóide, a amentoflavona que apresenta como fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ .

No espectro de massas da substância **F7.53** (Figura 3, p. 89) podemos observar o íon pseudo-molecular sendo detectado a  $m/z$  537  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , após ionização por desprotonação utilizando interface APCI no modo negativo (Figura 3A, p. 89). O espectro de massas *tanden* MS/MS foi obtido por desprotonação utilizando eletrospray (ESI) no modo negativo e foi observada a formação dos íons filhos (Figura 3B, p. 89) a partir do íon pseudo-molecular  $m/z$  537  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , os fragmentos iônicos a  $m/z$  375 (100,0% abundância),  $m/z$  443 (13,3%),  $m/z$  417 (31,5%) e a  $m/z$  399 (17,57%) foram formados por perda dos seguintes grupos  $[\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]$ ,  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}]$  mais um hidrogênio,  $[\text{C}_8\text{H}_6\text{O}]$  mais dois hidrogênios e  $[\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_3]$  mais dois hidrogênios, respectivamente.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) (Tabela 2, p. 80; Figura 4, p. 90; Figura 5, p. 91 e Figura 6, p. 92 ) da substância **F7.53** apresentou dois singletos que foram atribuídos aos hidrogênios de duas hidroxilas uma com  $\delta_{\text{H}}$  12,96 ppm ligada ao C-5 e uma com  $\delta_{\text{H}}$  13,09 ppm ligada ao C-5''. Os sinais dos hidrogênios destas hidroxilas foram visualizados, pois estes fazem ponte com o oxigênio do C-4 e do C-4'' respectivamente, já as demais hidroxilas não apresentam os sinais dos prótons no espectro por serem muito ácidas,

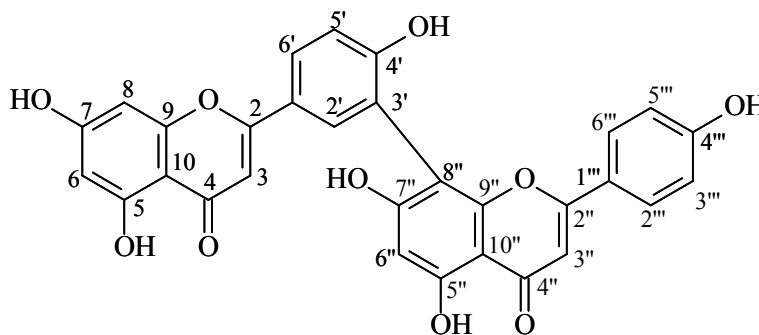
havendo troca rápida de prótons com o solvente. Outros dois sinais de singlete foram visualizados e atribuídos a dois hidrogênios oleifínicos H-3 e H-3'' com  $\delta_H$  6,82 ppm e  $\delta_H$  6,78 ppm respectivamente. Nos espectros foram observados vários sinais de carbonos metínicos na região dos aromáticos atribuídos aos H-6:  $\delta_H$  6,17 ppm d ( $J=2,1$  Hz); H-8:  $\delta_H$  6,45 ppm d ( $J=2,1$  Hz); H-2':  $\delta_H$  7,99 ppm d ( $J=2,1$  Hz); H-5':  $\delta_H$  7,14 ppm d ( $J=9,3$  Hz); H-6':  $\delta_H$  8,01 ppm dd ( $J=9,3$  Hz;  $J=2,1$  Hz); H-6'':  $\delta_H$  6,39 ppm, s; H-2''':  $\delta_H$  7,55 d ( $J=9$  Hz; 2H); H-3''':  $\delta_H$  6,70 ppm d ( $J=9$  Hz; 2H); H-5''':  $\delta_H$  6,70 ppm d ( $J=9$  Hz; 2H) e H-6''':  $\delta_H$  7,55 ppm d ( $J=9$  Hz; 2H). O H-6 e o H-8 estão acoplado na posição meta; o H-6' está acoplado em orto com o H-5' e em meta com o H-2'. O H-6''' está acoplado em orto com o H-5'''; e o H-2''' está acoplado em orto com o H-3'''. O H-6''' apresenta o mesmo deslocamento químico que o H-2''' e o H-3''' apresenta mesmo deslocamento químico que o H-5''', por serem hidrogênios quimicamente idênticos.

As correlações  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (300 MHz) observadas no espectro da substância **F7.53** (Figura 7, p. 93) estão mencionadas na Tabela 2 (p. 80).

**Tabela 2:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm) (300 MHz) em DMSO- $d_6$  e correlações observadas no espectro  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (300 MHz) para a substância F7.53.

Hidrogênio	F7.53 ( $\delta_{\text{H}}$ )*	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY
3	6,82 (s)	-
5-OH	12,96 (s)	-
6	6,17 (d, $J= 2,1\text{Hz}$ )	H-6, H-8
8	6,45 (d, $J= 2,1\text{Hz}$ )	H-8, H-6
2'	7,99 (d, $J= 2,1\text{Hz}$ )	H-2', H-6'
5'	7,14 (d, $J= 9,3\text{Hz}$ )	H-5', H-6'
6'	8,01 (dd, $J= 9,3\text{Hz}; 2,1\text{Hz}$ )	H-6', H-2', H-5'
3''	6,78 (s)	-
5''-OH	13,09 (s)	-
6''	6,39 (s)	-
2'''	7,55 (d, $J= 9\text{Hz}$ )	H-2''', H-3'''
3'''	6,70 (d, $J= 9\text{Hz}$ )	H-3''', H-2'''
5'''	6,70 (d, $J= 9\text{Hz}$ )	H-5''', H-6'''
6'''	7,55 (d, $J= 9\text{Hz}$ )	H-6''', H-5'''

\*Os valores de  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) e  $J$  (em Hz) foram calculados do espectro unidimensional (1D) de RMN  $^1\text{H}$  e (2D) de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - COSY



**amentoflavona**

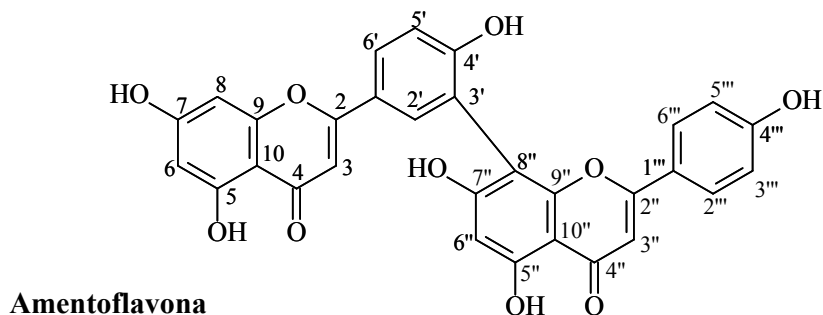


O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 3, p. 82; Figura 8, p. 94), apresentou 30 sinais de deslocamento químico que foram atribuídos à substância **F7.53** por comparação com o modelo proposto na literatura para a Amentoflavona (MARKHAM et al., 1987) (Tabela 3, p. 82). A multiplicidade destes carbonos foi verificada através da análise de DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  (Figura 9, p. 95). No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  os sinais  $\delta_{\text{C}}$  161,7; 163,9; 159,7; 160,8; 162,0; 160,7 ppm foram atribuídos aos C-5, C-7, C-4', C5'', C7'' e C4''' os quais estão ligados à hidroxila. Os sinais  $\delta_{\text{C}}$  181,9 e 182,3 ppm foram atribuídos aos carbonos carbonílicos  $\alpha, \beta$  insaturados C-4 e C-4'' respectivamente. Os sinais  $\delta_{\text{C}}$  164,0; 157,6; 104,1; 120,2; 121,6; 164,3; 103,9; 154,7; 103,9 e 121,2 ppm foram atribuídos aos carbonos quaternários C-2, C-9; C-10; C-1', C-3', C2'', C8'', C-9'', C-10'' e C-1''' respectivamente. Os C-2, C-9, C2'' e C-9'' apresentam um deslocamento químico em campo mais baixo, pois estão mais desblindados devido a ligação com átomos de oxigênio. Os sinais  $\delta_{\text{C}}$  99,1; 94,2; 128,0; 116,4; 131,6; 98,8; 128,4; 116,0; 116,0 e 128,4 ppm foram atribuídos aos carbonos metínicos na região dos aromáticos C-6, C-8, C-2', C-5', C-6', C-6'', C-2''', C-3''', C-5''' e C-6'''. Os carbonos que estão fazendo ligação com um carbono ligado à hidroxila apresentam deslocamento químico para campo mais alto. Os sinais  $\delta_{\text{C}}$  103,2 e 102,8 ppm foram atribuídos aos carbonos oleifínicos C-3 e C3''.

**Tabela 3:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  em ppm) (75,5 MHz) em DMSO- $d_6$  para a substância F7.53 e do modelo amentoflavona (MARKHAM et al., 1987).

Carbono	Amentoflavona ( $\delta_C$ )*	F7.53 ( $\delta_C$ )*
2	164,1 <sup>a</sup>	164,0
3	103,2 <sup>b</sup>	103,2
4	181,9 <sup>c</sup>	181,9
5	161,6	161,7
5-OH		
6	98,8 <sup>d</sup>	99,1
7	163,9 <sup>e</sup>	163,9
8	94,2	94,2
9	157,6	157,6
10	104,0	104,1
1'	120,3	120,2
2'	127,9	128,0
3'	121,7 <sup>f</sup>	121,6
4'	159,6	159,7
5'	116,4	116,4
6'	131,6	131,6
2''	164,3 <sup>a</sup>	164,3
3''	102,8 <sup>b</sup>	102,8
4''	182,2 <sup>c</sup>	182,3
5''	160,8	160,8
5''-OH		
6''	99,1 <sup>d</sup>	98,8
7''	161,9 <sup>e</sup>	162,0
8''	104,1	103,9
9''	154,7	154,7
10''	104,0	103,9
1'''	121,4 <sup>f</sup>	121,2
2'''	128,3	128,4
3'''	116,0	116,0
4'''	161,1	160,7
5'''	116,0	116,0
6'''	128,3	128,4

\*Os sinais de carbonos quaternários e metínicos foram reconhecidos pela análise comparativa dos espectros de DEPT 135° e 90°,  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$ -HMBC. a,b,c,d,e,f são sinais de carbonos que podem ser intercambiáveis.



As correlações entre carbono e hidrogênio a uma ligação ( $^1J_{CH}$ ) foram observadas no espectro de  $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (Figura 10, p. 96) e estão descritas na tabela 4 (p. 85). Analisando o espectro observamos as correlações do hidrogênio  $\delta_H$  6,82 ppm, s, com o carbono olefínico C-3 ( $\delta_C$  103,2 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  6,17 ppm d ( $J=2,1$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-6 ( $\delta_C$  99,1 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  6,45 ppm d ( $J=2,1$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-8 ( $\delta_C$  94,2 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  7,99 ppm d ( $J=2,1$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-2' ( $\delta_C$  128,0 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  7,14 ppm d ( $J=9,3$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-5' ( $\delta_C$  116,4 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  8,01 ppm dd ( $J=9,3; 2,1$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-6' ( $\delta_C$  131,65 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  6,78 ppm, s, com o carbono olefínico C-3'' ( $\delta_C$  102,8 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  6,39 ppm, s, com o carbono metínico do anel aromático C-6'' ( $\delta_C$  98,8 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  7,55 ppm d ( $J=9,0$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-2''' ( $\delta_C$  128,4 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  6,70 ppm d ( $J=9,0$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-3''' ( $\delta_C$  116,0 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  6,70 ppm d ( $J=9,0$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-5''' ( $\delta_C$  116,0 ppm); do hidrogênio  $\delta_H$  7,55 ppm d ( $J=9,0$  Hz) com o carbono metínico do anel aromático C-6''' ( $\delta_C$  128,4 ppm).

As correlações a longa distância a duas, três e quatro ligações ( $^2J_{CH}$ ,  $^3J_{CH}$  e  $^4J_{CH}$ ) foram estabelecidas a partir da análise dos espectros de  $^1H \times ^{13}C$ -HMBC (Tabela 4, p. 85; Figura 11 e 12, p. 97 e 98). Os espectros demonstraram as correlações dos hidrogênios H-8 e H-3 com o carbono C-4 ( $\delta_C$  181,9 ppm); bem como do hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 5 (5-OH) e do hidrogênio H-8 com o carbono C-5 ( $\delta_C$  161,7 ppm); foram observadas também correlações do hidrogênio da hidroxila (5-OH) e do hidrogênio H-8 com o carbono C-6 ( $\delta_C$  99,1 ppm), do hidrogênio H-8 com o carbono C-7 ( $\delta_C$  163,9 ppm), do hidrogênio H-6 com o carbono C-8 ( $\delta_C$  94,2 ppm); do hidrogênio H-8 com o carbono C-9 ( $\delta_C$  157,6 ppm); dos

hidrogênios H-6, H-3, H-8 e do hidrogênio da hidroxila (5-OH) com o carbono C-10 ( $\delta_C$  104,1 ppm), foram observadas também correlações o hidrogênio H-5' com o carbono C-1' ( $\delta_C$  120,17 ppm); dos hidrogênios H-3, H-5' e H-6' com o carbono C-2' ( $\delta_C$  128,0 ppm); do H-2' com o carbono C-6' ( $\delta_C$  131,6 ppm); dos hidrogênios H-3'', H-2'', H-3'', H-5'' e H-6'' com o carbono C-2'' ( $\delta_C$  164,3 ppm); do hidrogênio H-3'' com o carbono C-4'' ( $\delta_C$  182,3 ppm); do hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 5'' (5''-OH) com os carbonos C-5'' ( $\delta_C$  160,8 ppm) e C-6'' ( $\delta_C$  98,8 ppm); também foram estabelecidas as correlações do hidrogênio H-2' com o carbono C-7'' ( $\delta_C$  162,0 ppm); do hidrogênio H-6'' com o carbono C-8'' ( $\delta_C$  103,9 ppm), dos hidrogênios H-6'', H-3'' e do hidrogênio da hidroxila (5''-OH) com o carbono C-10'' ( $\delta_C$  103,9 ppm); dos hidrogênios H-3'', H-3'' e H-5'' com o carbono C-1'' ( $\delta_C$  121,2 ppm); dos hidrogênios H-2'' e H-6'' com o carbono C-4'' ( $\delta_C$  160,7 ppm); e por fim os hidrogênio H-3'' e H-3'' estão se correlacionando com o carbono C-6'' ( $\delta_C$  128,4 ppm). As correlações a longa distância entre os hidrogênios das hidroxilas (5-OH e 5''-OH) e os carbonos, descritas anteriormente, possibilitaram a atribuição correta dos deslocamentos químicos de hidrogênio de ambas (Figura 11, p. 97).

Markham et al. (1987) por análises de RMN  $^{13}C$  atribuíram os deslocamentos químicos aos carbonos da amentoflavona, no entanto, no modelo proposto por estes autores, alguns deslocamentos químicos de carbonos C-2 e C-2''; C-3 e C-3''; C-4 e C-4''; C-6 e C-6''; C-7 e C-7'', C-3' e C-1'' foram considerados intercambiáveis (Tabela 3, p. 82). Entretanto, no presente trabalho, através de análises utilizando técnicas modernas, as quais correlacionam hidrogênios e carbonos a longa distância,  $^1H \times ^{13}C$ -HMBC (Tabela 4, p. 85; Figura 11 e 12, p. 97 e 98), foi possível estabelecer inequivocamente, os deslocamentos químicos corretos de todos os carbonos que antes eram considerados pela literatura, como intercambiáveis.

**Tabela 4:** Interações de átomos de hidrogênio e carbono de uma ligação ( $^1J_{CH}$ ) e a longa distância ( $^2J_{CH}$ ,  $^3J_{CH}$  e  $^4J_{CH}$ ) observados nos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear  $^1H \times ^{13}C$ -HSQC (300 MHz) e  $^1H \times ^{13}C$ -HMBC (300 e 400 MHz), em DMSO da substância F7.53. Deslocamentos químicos ( $\delta_C$  e  $\delta_H$ ) em ppm.

Carbono	$^1H \times ^{13}C$ -HSQC		$^1H \times ^{13}C$ -HMBC
	( $\delta_C$ )*	( $\delta_H$ )*	
2	164,0		
3	103,2	6,82 (s)	
4	181,9		H-8; H-3
5	161,7		H-8; 5-OH
5-OH	-		
6	99,1	6,17 (d, $J= 2,1$ Hz)	5-OH; H-8
7	163,9		H-8
8	94,2	6,45 (d, $J= 2,1$ Hz)	H-6
9	157,6		H-8
10	104,1		H-6; H-3; H-8; 5-OH
1'	120,2		H-5'
2'	128,0	7,99 (d, $J= 2,1$ Hz)	H-3; H-5';H-6'
3'	121,6		
4'	159,7		
5'	116,4	7,14 (d, $J= 9,3$ Hz)	
6'	131,6	8,01 (dd, $J= 9,3$ Hz; 2,1Hz)	H-2'
2''	164,3		H-3''; H-2'''; H-3''''; H-5''''; H-6''''
3''	102,8	6,78 (s)	
4''	182,3		H-3''
5''	160,8		5''-OH
5''-OH	-		
6''	98,8	6,39 (s)	5''-OH
7''	162,0		H-2'
8''	103,9		H-6''
9''	154,7		
10''	103,9		H-6''; 5''-OH; H-3''
1'''	121,2		H-3''; H-5''', H-3'''
2'''	128,4	7,55 (d, $J= 9$ Hz)	H-3'''; H-3''
3'''	116,0	6,70 (d, $J= 9$ Hz)	
4'''	160,7		H-2''';H-6'''
5'''	116,0	6,70 (d, $J= 9$ Hz)	
6'''	128,4	7,55 (d, $J= 9$ Hz)	H-3'''; H-3''

Na caracterização do extrato residual solúvel em diclorometano (**RF**) por CLAE-EM (Figura 13, p. 99) foi possível identificar com precisão que as substâncias amentoflavona (SILVA et al., 1995) e (-) mammea A/BB (GASPAROTTO-JÚNIOR et al., 2005) estão presentes no extrato **RF**. Através do cromatograma obtido por CLAE-UV (Figura 13A, p. 99) observamos dois picos mais abundantes, um no tempo de retenção de aproximadamente 15,0 minutos atribuído à substância amentoflavona (**2**) e um no tempo de retenção de aproximadamente 29,5 minutos atribuído à substância (-) mammea A/BB (**1**). Para caracterizar estas substâncias no extrato (**RF**) foram obtidos o cromatograma dos íons totais (TIC) (Figura 13B, p. 99), o cromatograma dos íons extraídos (CIE) (Figura 13C, p. 99) e os espectros de massa das substâncias por APCI no modo negativo (Figura 13D, p. 99). Segundo Silva et al. 1995 a substância amentoflavona apresenta peso molecular de 538 u. m. a. e segundo Gasparotto-Júnior et al. 2005 o peso molecular da substância (-) mamea A/BB é 406 u. m. a. O pico do biflavonóide amentoflavona (**2**) não era observado no cromatograma dos íons totais, por isto utilizou-se o cromatograma dos íons extraídos que é uma técnica útil para separar pico de  $m/z$  definido e melhorar sua resolução, separando-o de possíveis contaminantes presentes no cromatograma de íons totais, desta forma o pico da amentoflavona (**2**) pôde ser observado no cromatograma dos íons extraídos a  $m/z$  537 no tempo de retenção de aproximadamente 15,0 minutos (Figura 13, p. 99). Já o pico da cumarina (-) mammea A/BB (**1**) pode ser observado no cromatograma de íons totais no tempo de retenção de aproximadamente 29,5 minutos, no entanto também pode ser observado no cromatograma de íons extraídos a  $m/z$  405 no mesmo tempo de retenção que no cromatograma dos íons totais, porém o pico apresenta melhor resolução (Figura 13, p. 99).

O perfil cromatográfico obtido para o extrato (**RF**) permite sua padronização, para fins de controle de qualidade, contribuindo para a futura utilização deste extrato bruto no tratamento da leishmaniose como alternativa a utilização da substância (-) mammea A/BB.

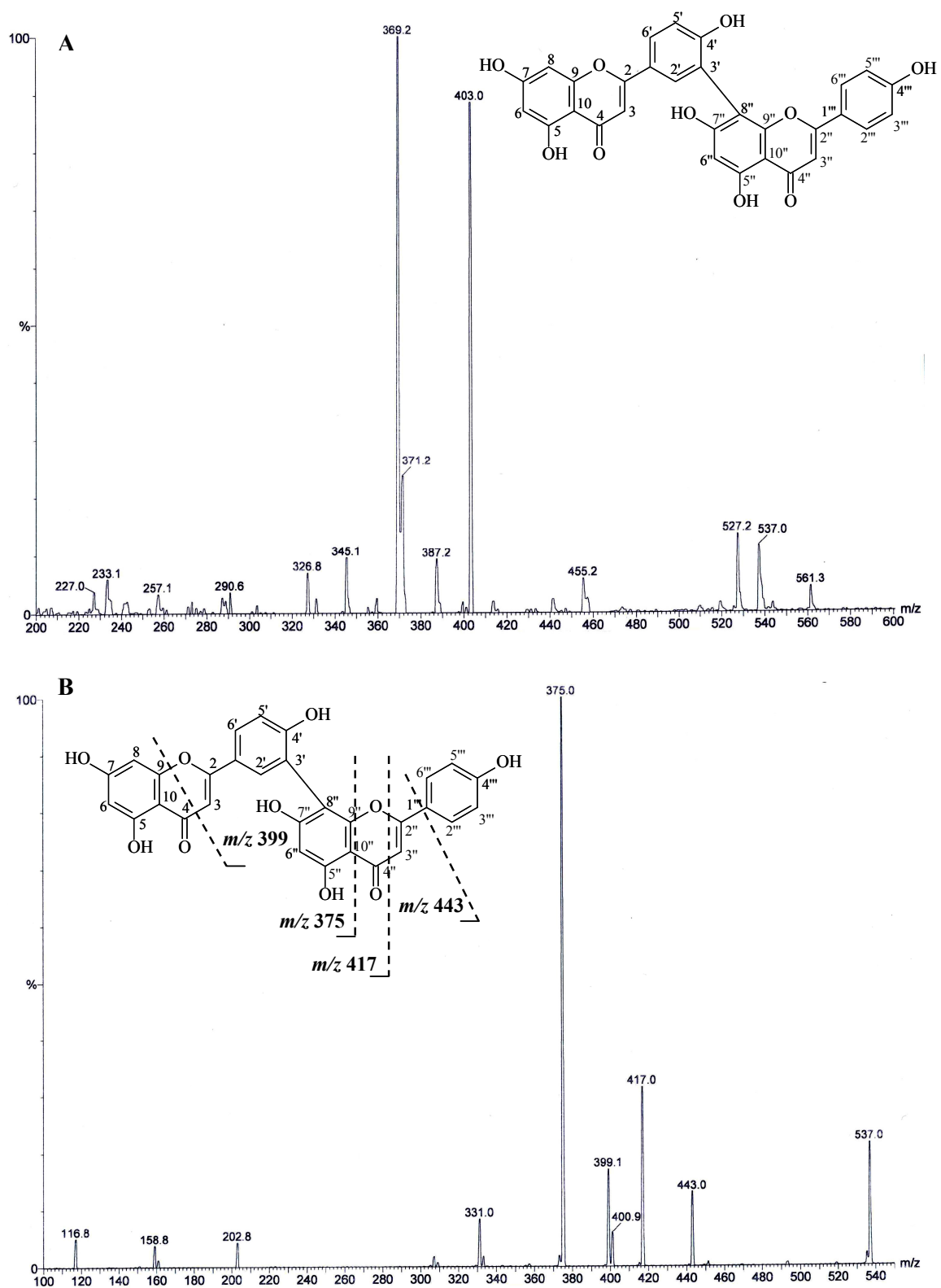
Através da análise dos dados espectrométricos foi possível a identificação das duas substâncias isoladas a partir do extrato residual (**RF**) solúvel em diclorometano das folhas da *C. brasiliense* a (-) mammea A/BB e a amentoflavona. Crombie et al. (1967) isolaram pela primeira vez a ( $\pm$ ) mammea A/BB das folhas da *Mammea americana*, entretanto Gasparotto-Júnior et al. (2005) isolaram pela primeira vez das folhas da *C. brasiliense* a (-) mammea A/BB e esta apresentou atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. Crombie et al. (1987) propuseram a síntese da mistura racêmica da mammea A/BB bem como de outras cumarinas tipo mammea. As cumarinas tipo mammea isoladas de diferentes partes da *C. brasiliense* apresentam importantes atividades biológicas entre elas estão a atividade moluscicida (GASPAROTTO-JÚNIOR et al., 2004); atividade citotóxica para células tumorais humanas (REYES-CHILPA et al., 2004), antitumoral (ITO et al., 2003) e antibacteriana (REYES-CHILPA et al., 2004; YASUNAKA et al., 2005). As cumarinas tipo mammea isoladas da *C. verticillatum* também apresentaram atividade moluscicida (RAVENLOJATO et al., 1987) e as isoladas da *C. dispar* apresentaram atividade citotóxica (GUILLET et al., 2001a).

O biflavonóide amentoflavona é uma substância muito conhecida, tendo sido isolada de diversas plantas. Segundo Nielsen et al. (1988) a amentoflavona apresenta afinidade pelos receptores benzodiazepínicos comparável com a afinidade do diazepam, podendo a ligação ser competitiva e não competitiva. Segundo Silva et al. (1995) a amentoflavona isolada a partir das folhas da *Selaginella willdenowii* não apresentou citotoxicidade frente à linhagem de células cancerígenas humanas. Suzuki et al. (1999) mostrou que a amentoflavona aumenta concentração dependente a liberação de  $Ca^{+2}$  do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético de coelho, sendo esta atividade aproximadamente 20 vezes mais potente que a da cafeína, sugerindo que amentoflavona liga-se ao mesmo sítio de ligação da cafeína nos canais de  $Ca^{+2}$  e induz a liberação de  $Ca^{+2}$  do retículo sarcoplasmático. Banerjee et al. (2002)

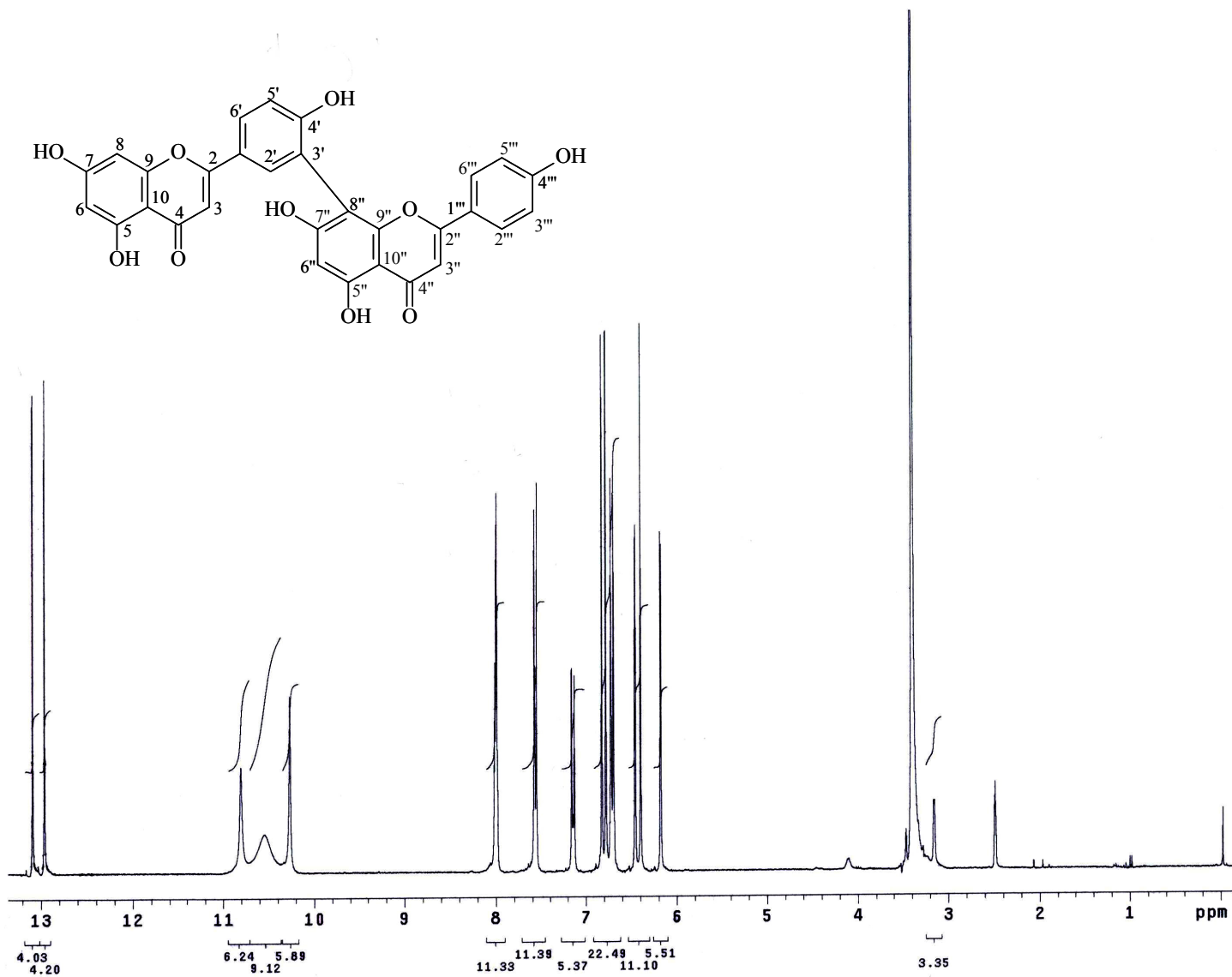
demonstrou que a amentoflavona inibe a biossíntese cicloxigenase-2 e conseqüentemente a biossíntese das prostaglandinas E<sub>2</sub>, assim como inibiu a expressão da proteína indutora do óxido nítrico sintetase (iNOS). Yamaguchi et al. (2005) demonstraram que a amentoflavona isolada a partir da *Araucaria angustifolia* protege o DNA plasmidial frente à quebra promovida pelos radicais livres (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) induzida por reação de Fentem ou por lipoperoxidação. Kang et al. (2005) mostraram que a amentoflavona exibiu importante neuroproteção frente à citotoxicidade induzida por estresse oxidativo e amilóide β, sugerindo o potencial terapêutico frente a doenças neurodegenerativas, incluindo derrame isquêmico e doença de Alzheimer's. Sannomiya et al. (2005) testaram o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* frente a ulceração induzida por HCl/etanol em ratos, e este reduziu a ulceração em 93 e 99% nas doses de 500 e 1000 mg/Kg respectivamente, o efeito antiulcerogênico foi devido a presença da amentoflavona. Hansen et al. (2005) demonstraram que a amentoflavona interagem com receptores GABA<sub>A</sub> ligando-se ao sítio para os benzodiazepínicos e também aos subtipos deste receptor, semelhante ao diazepam, agindo como antagonistas dos benzodiazepínicos clássicos. Woo et al. (2005) isolaram a amentoflavona da *Selaginella tamariscina* e sugeriram que amentoflavona apresenta atividade antiinflamatória, por inibir a produção de óxido nítrico concentração dependente e suprimir a expressão dos genes para a produção de lipopolissacarídeos e para indutor do óxido nítrico sintetase (iNOS) em macrófagos bloqueando a ativação NF-κB.

A amentoflavona também foi isolada a partir das folhas da *C. brasiliense* (REYES-CHILPA et al. 2004; DA SILVA et al. 2001) esta apresentou atividade analgésica (DA SILVA et al. 2001).





**Figura 3:** Espectro de massas da substância F7.53 utilizando interface APCI no modo negativo (A). Espectro de massas *tandem* (ESI-MS/MS) (B).



**Figura 4:** Espectro de RMN $^1\text{H}$  da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $d_6$ ).

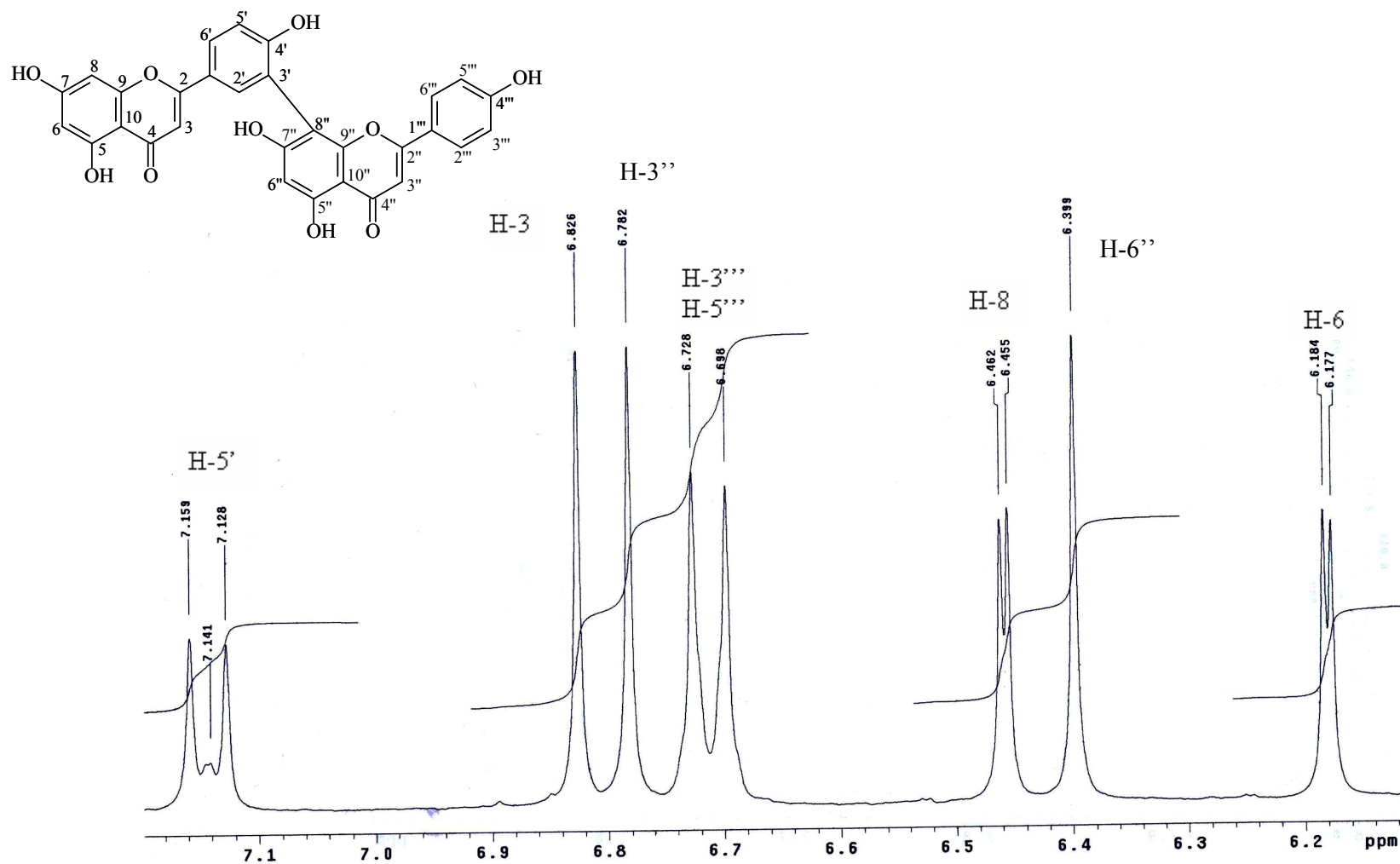
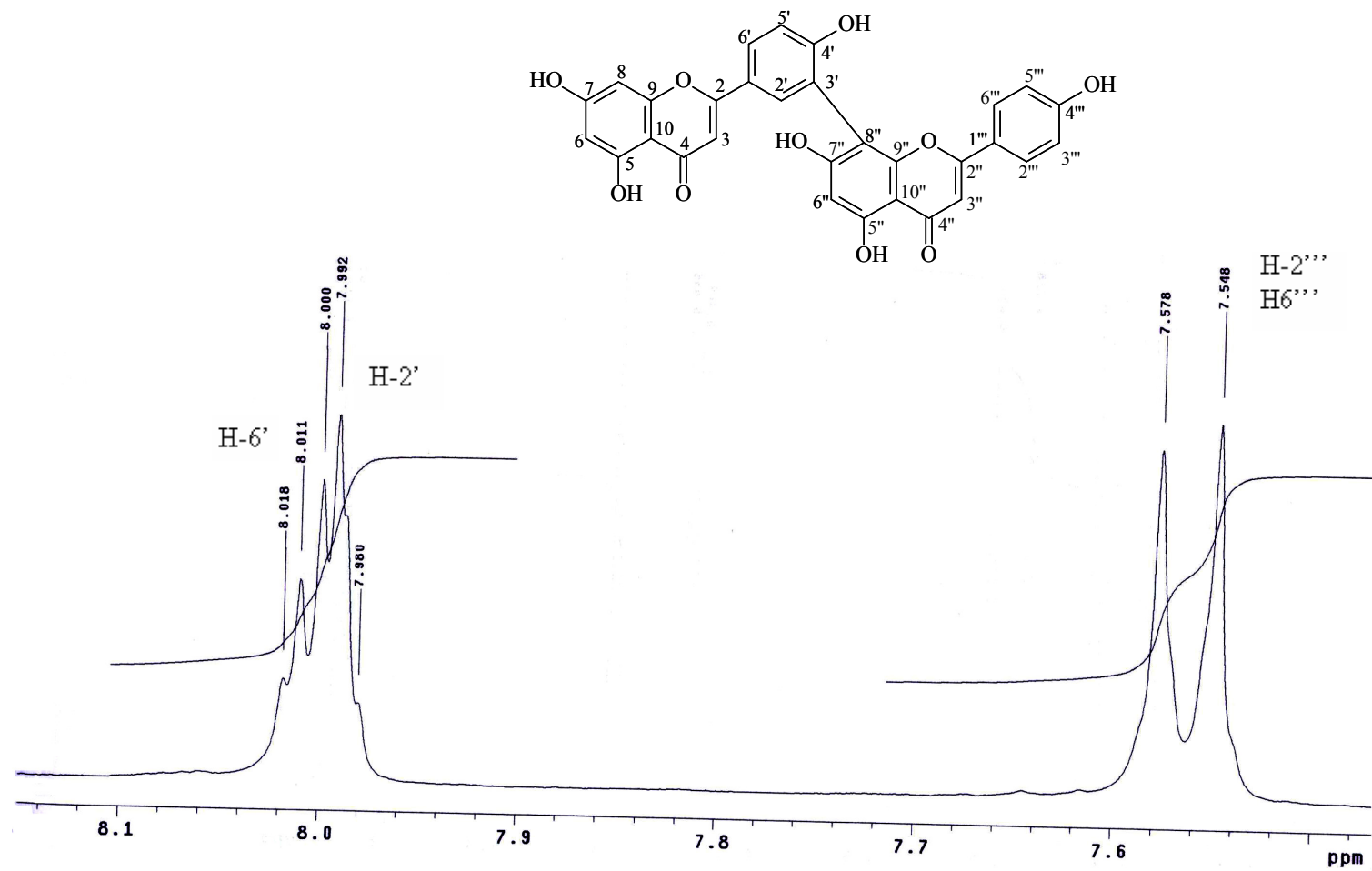
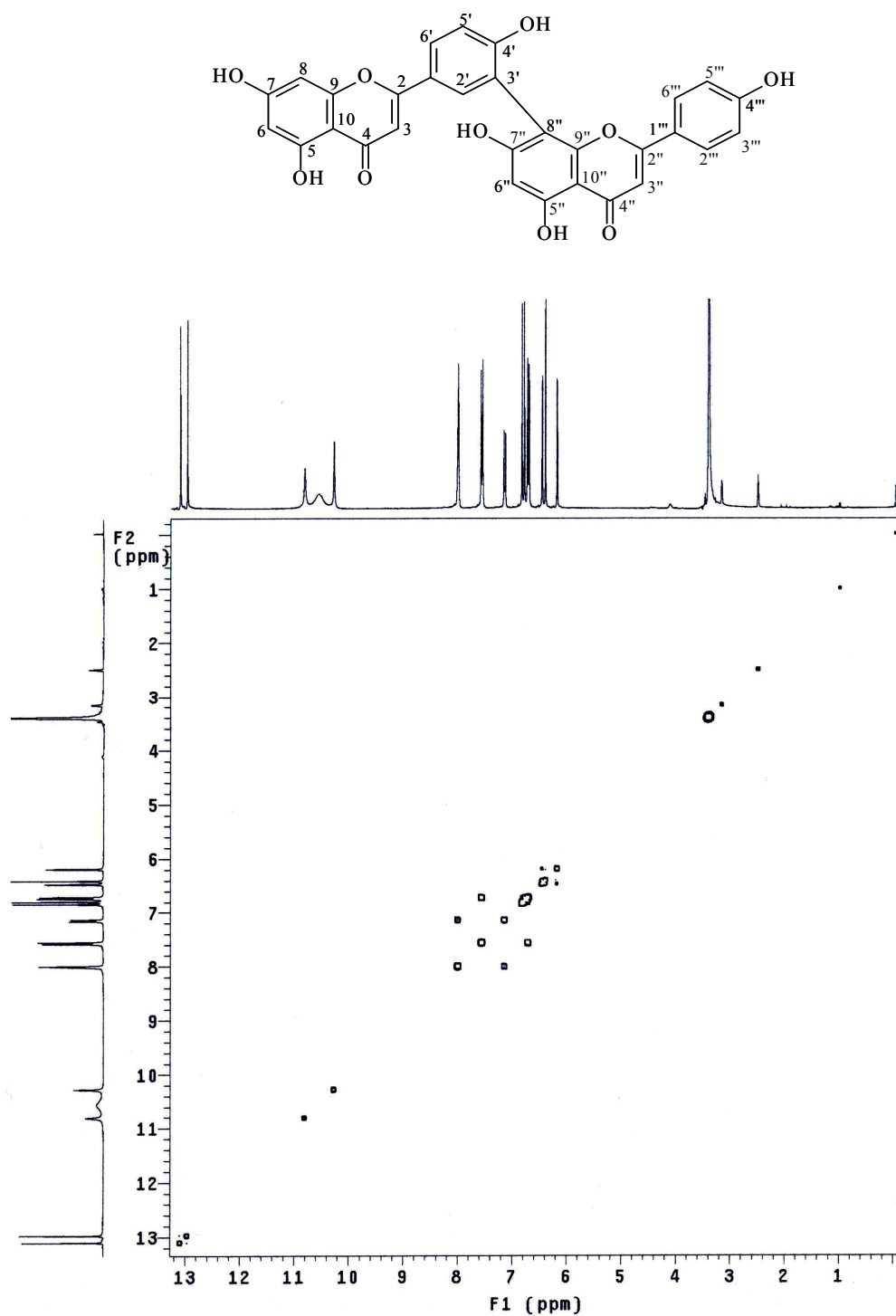


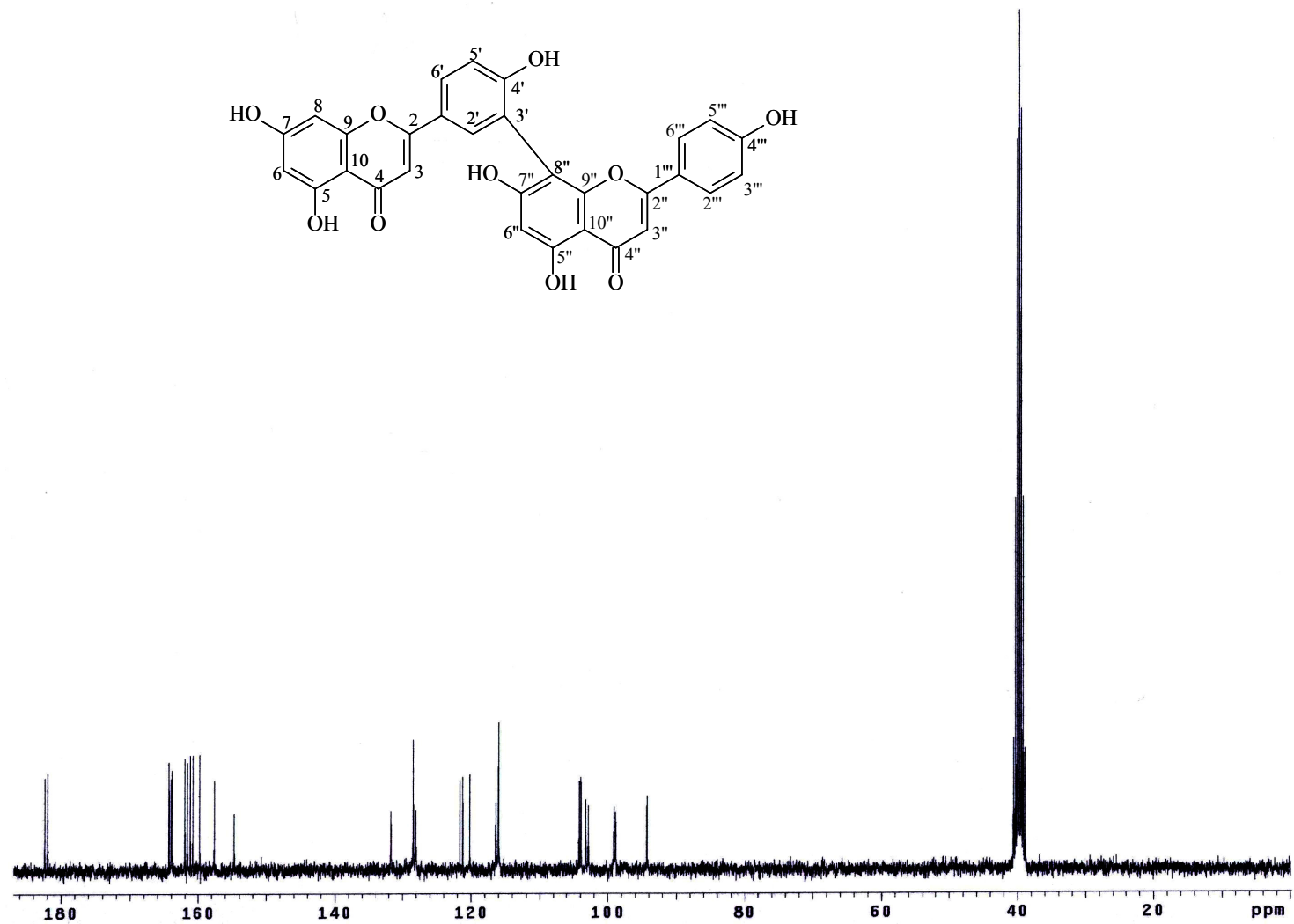
Figura 5: Detalhamento do espectro de RMN<sup>1</sup>H da substância F7.53 (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



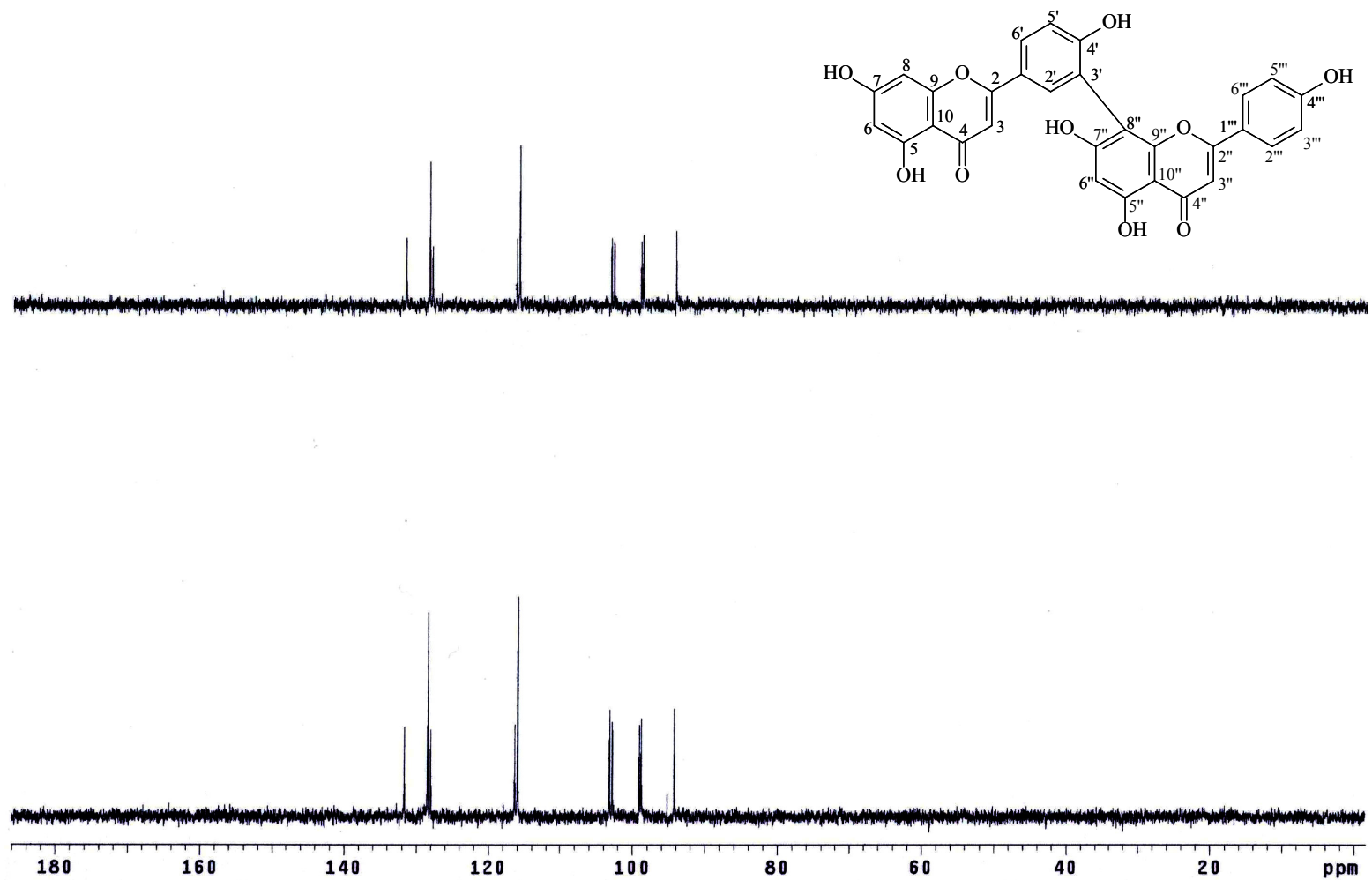
**Figura 6:** Detalhamento do espectro de RMN<sup>1</sup>H da substância F7.53 (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



**Figura 7:** Espectro de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $d_6$ ).



**Figura 8:** Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  da substância F7.53 (75,5 MHz, DMSO- $d_6$ ).



**Figura 9:** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  DEPT 90° e 135° da substância F7.53 (75,5 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

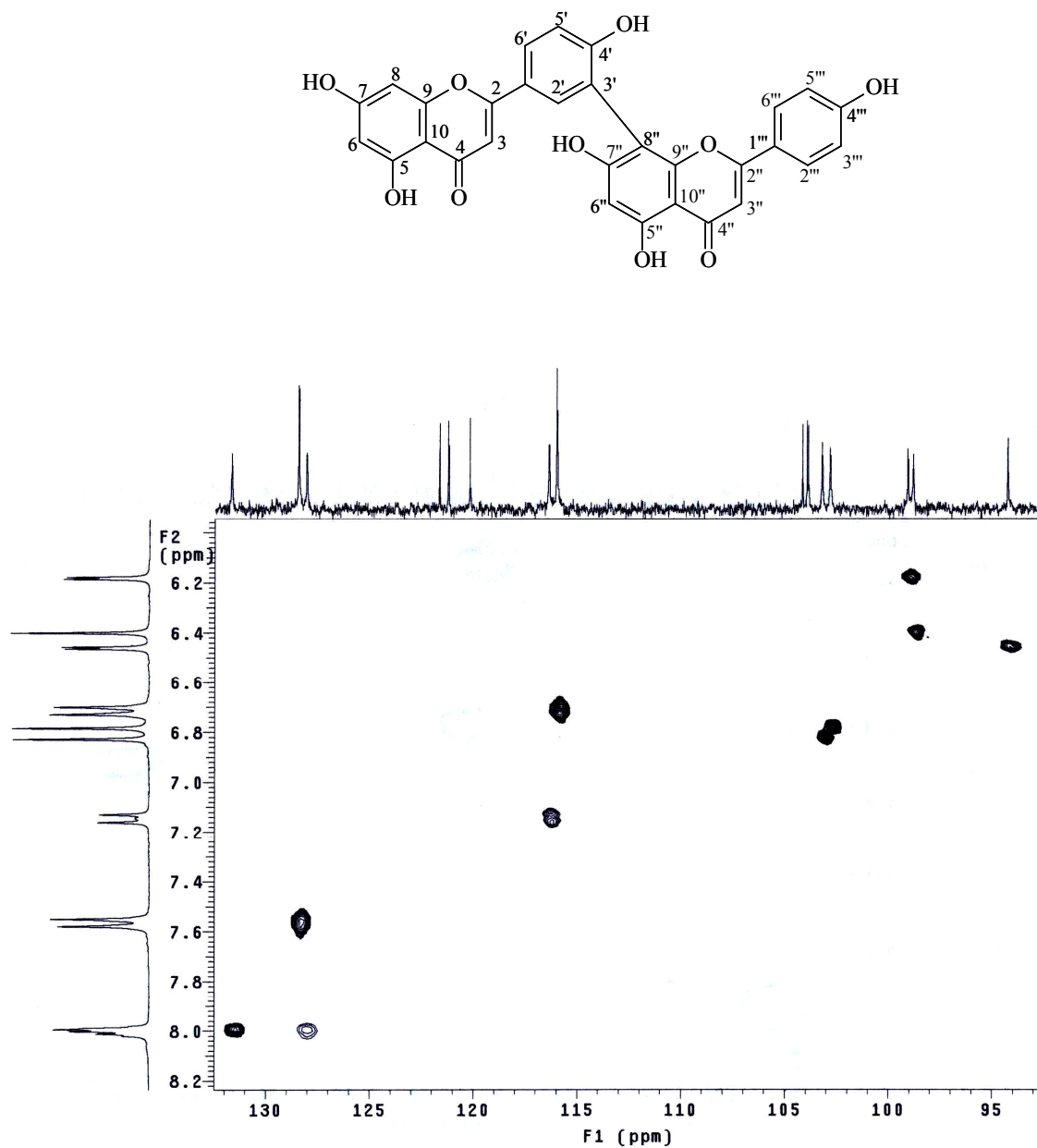
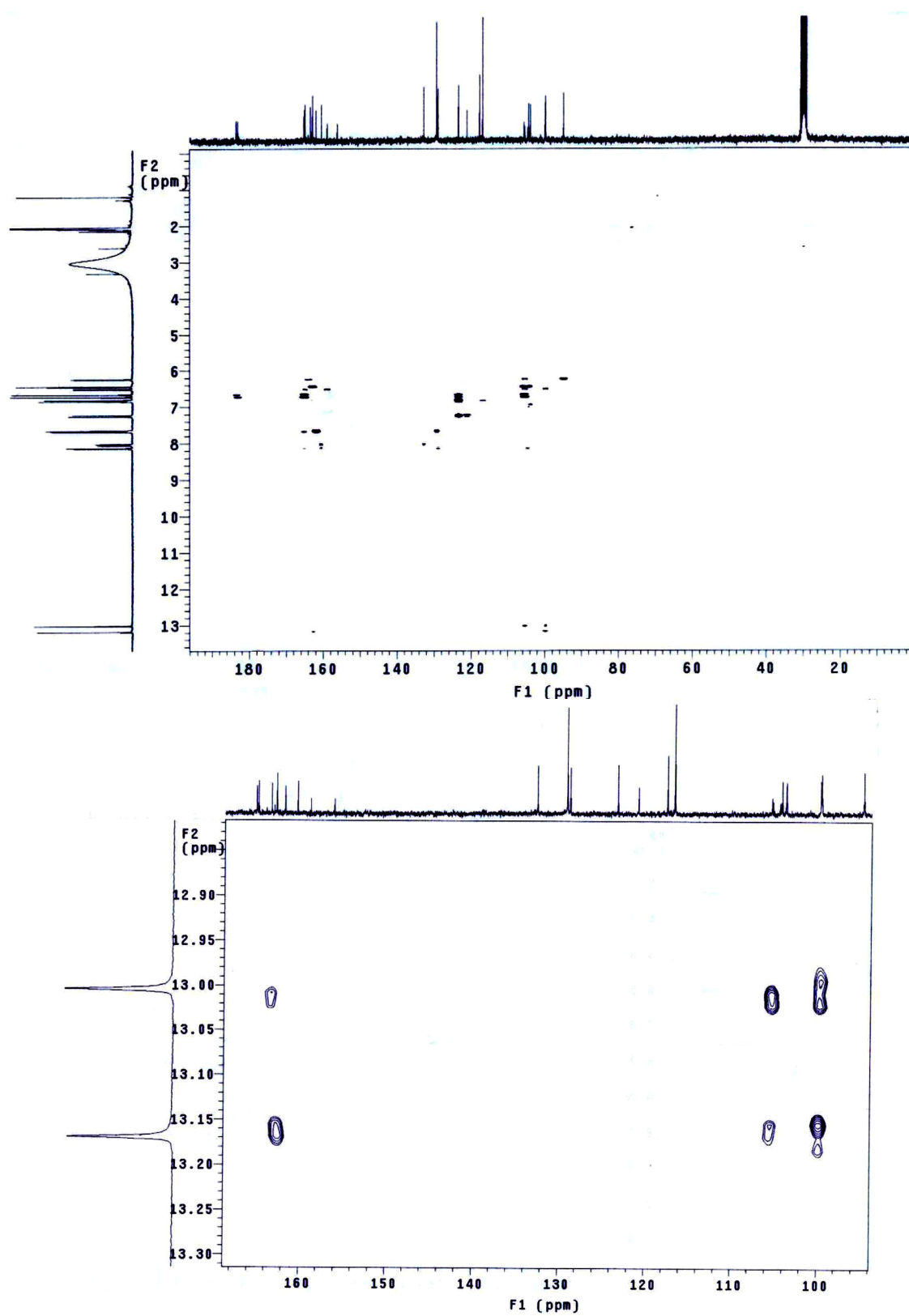


Figura 10: Espectro de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HSQC da substância F7.53 (300 MHz, DMSO- $d_6$ ).





**Figura 11:** Espectros de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC da substância F7.53 (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

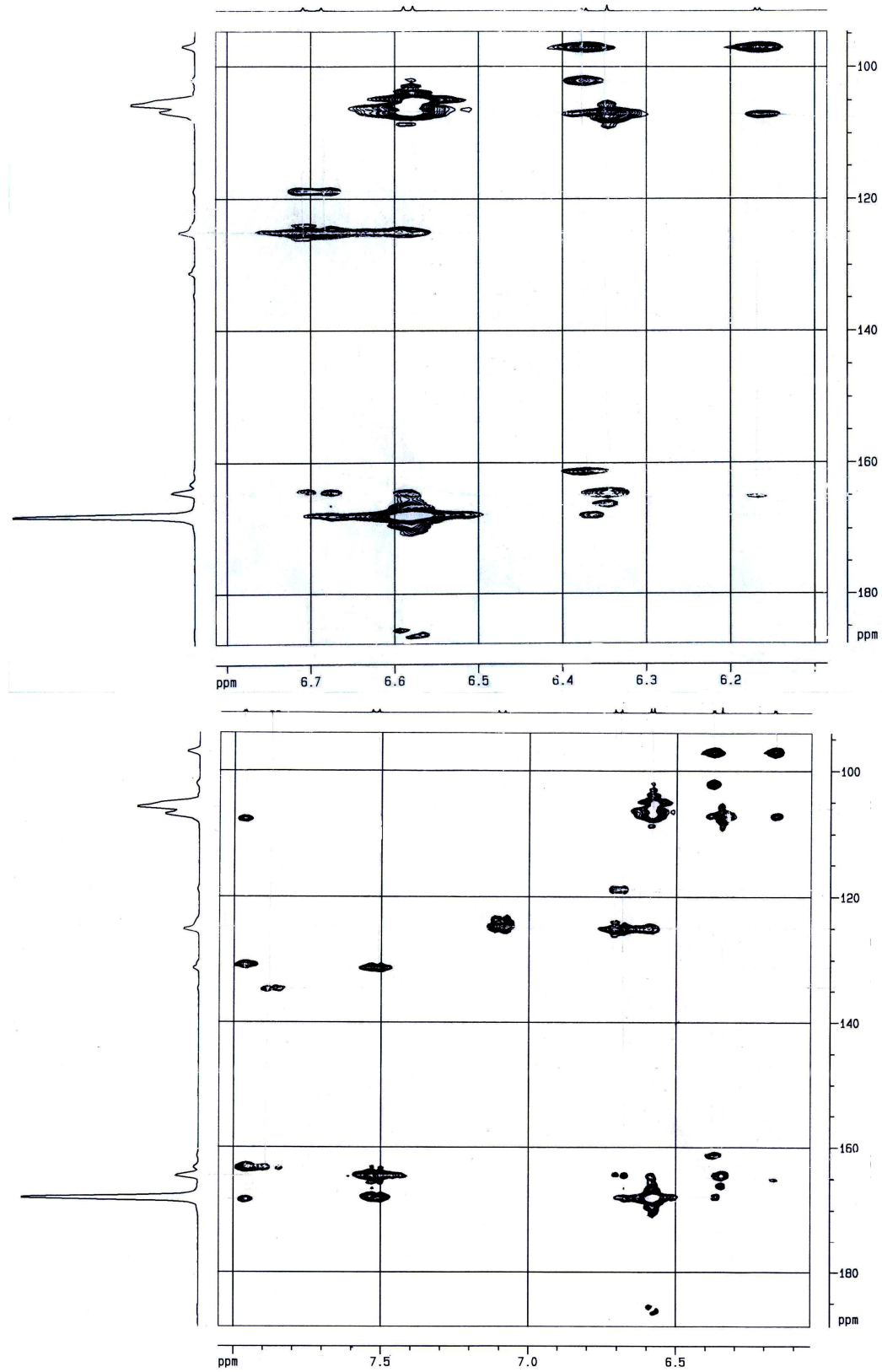
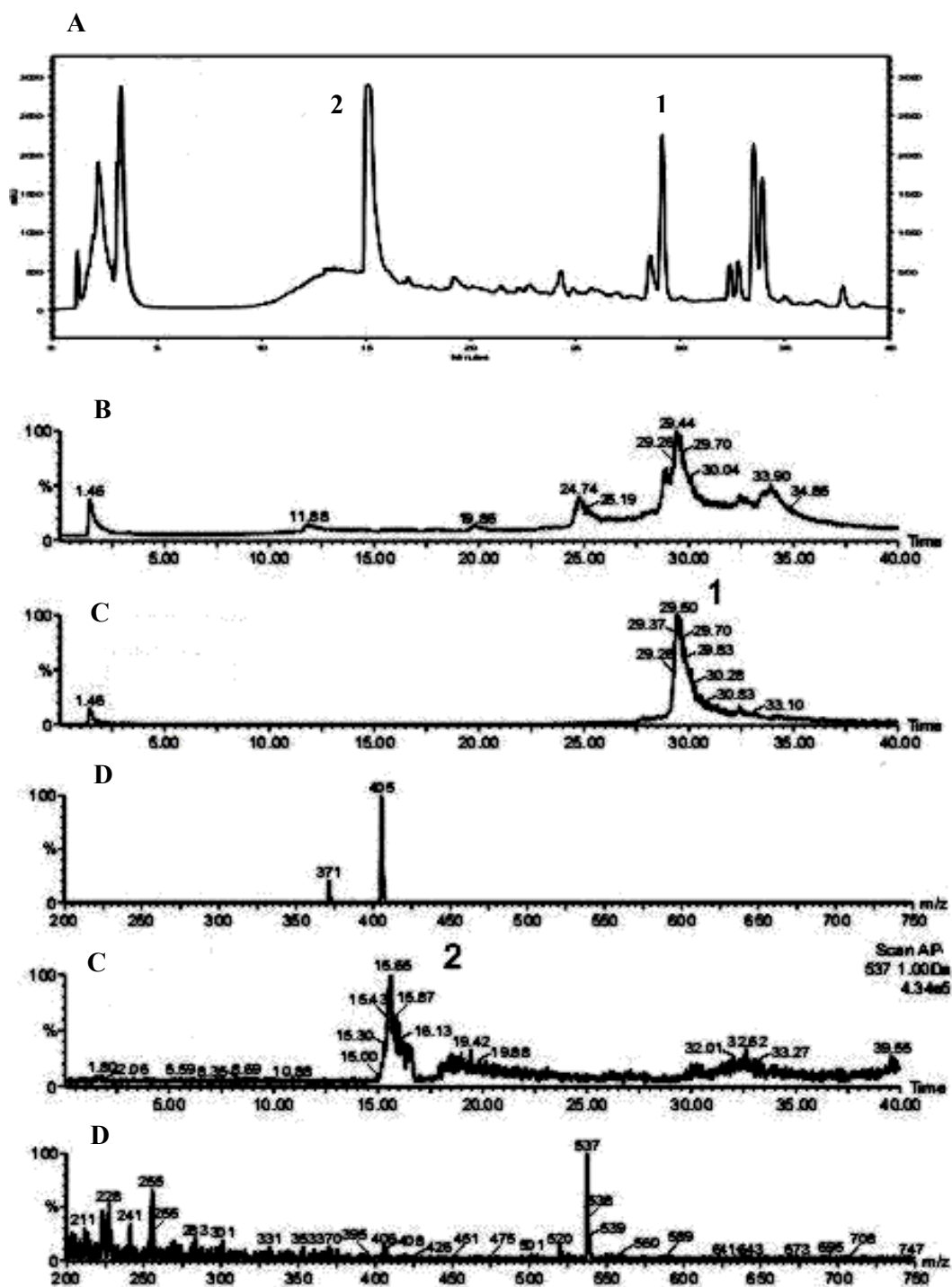


Figura 12: Espectros de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC da substância F7.53 (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).



**Figura 13:** A- cromatograma a 254 nm do extrato residual das folhas (RF) da *C. brasiliense* por CLAE (1) mammea A/BB (2) amentoflavona, B- cromatogramas de íons totais (TIC) do extrato RF, C- cromatograma dos íons extraídos (CIE) do extrato RF e D- espectros de massas por APCI no modo negativo.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.2.1 Estudo dos efeitos do *Calophyllum brasiliense* no crescimento das formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Os extratos brutos obtidos das folhas da *C. brasiliense*, bem como as substâncias isoladas foram avaliados quanto a sua atividade sobre o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas concentrações de 320 µg/mL a 0,125 µg/mL. A dose letal para 50% das formas promastigotas (DL<sub>50</sub>) foi calculada após 24h de tratamento do cultivo com os extratos e substâncias purificadas (Tabela 5, p. 102). O extrato liofilizado das folhas (**LF**) não demonstrou efeitos significativos na inibição do crescimento das formas promastigotas DL<sub>50</sub> > 320,0 µg/mL. No entanto, o extrato residual das folhas (**RF**), solúvel em diclorometano apresentou significante inibição do crescimento celular concentração-dependente com DL<sub>50</sub> = 59,8 µg/mL. Também foi observado que a adição de 320 e 160 µg/mL do extrato (**RF**) ao meio de cultura promoveu um efeito inibitório do crescimento de 100% após 24h de cultivo, já a adição das concentrações de 80 µg/mL e 40 µg/mL deste extrato ao meio inibiu, após 24h de incubação, 86% e 11% do crescimento dos protozoários, respectivamente (gráfico 1A, p. 103). Baseando-se na importante inibição do crescimento celular apresentada pelo extrato (**RF**) frente às formas promastigotas de *L. braziliensis*, este extrato foi estudado fitoquimicamente a fim de isolar e identificar a substância responsável pela atividade leishmanicida.

Desta forma, a partir do extrato residual das folhas (**RF**) foram isoladas e identificadas a substância (-) mamea A/BB (**F1.12**) e a amentoflavona (**F7.53**). A substância amentoflavona não apresentou efeitos significativos na inibição do crescimento das formas promastigotas DL<sub>50</sub> > 320,0 µg/mL. Já a substância (-) mamea A/BB apresentou

significante inibição do crescimento celular concentração-dependente, com  $DL_{50} = 23,95$   $\mu\text{g/mL}$  (Gráfico 1B, p. 103), também foi observado que a adição da substância (-) mammea A/BB ao meio de cultura nas concentrações de 320  $\mu\text{g/mL}$ , 160  $\mu\text{g/mL}$ , 80  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$  inibiu o crescimento celular em 97%, 90%, 74%, 65,5%, 45%, 18% e 1,7% respectivamente, após 24 horas de incubação (Gráfico 1B, p. 103).

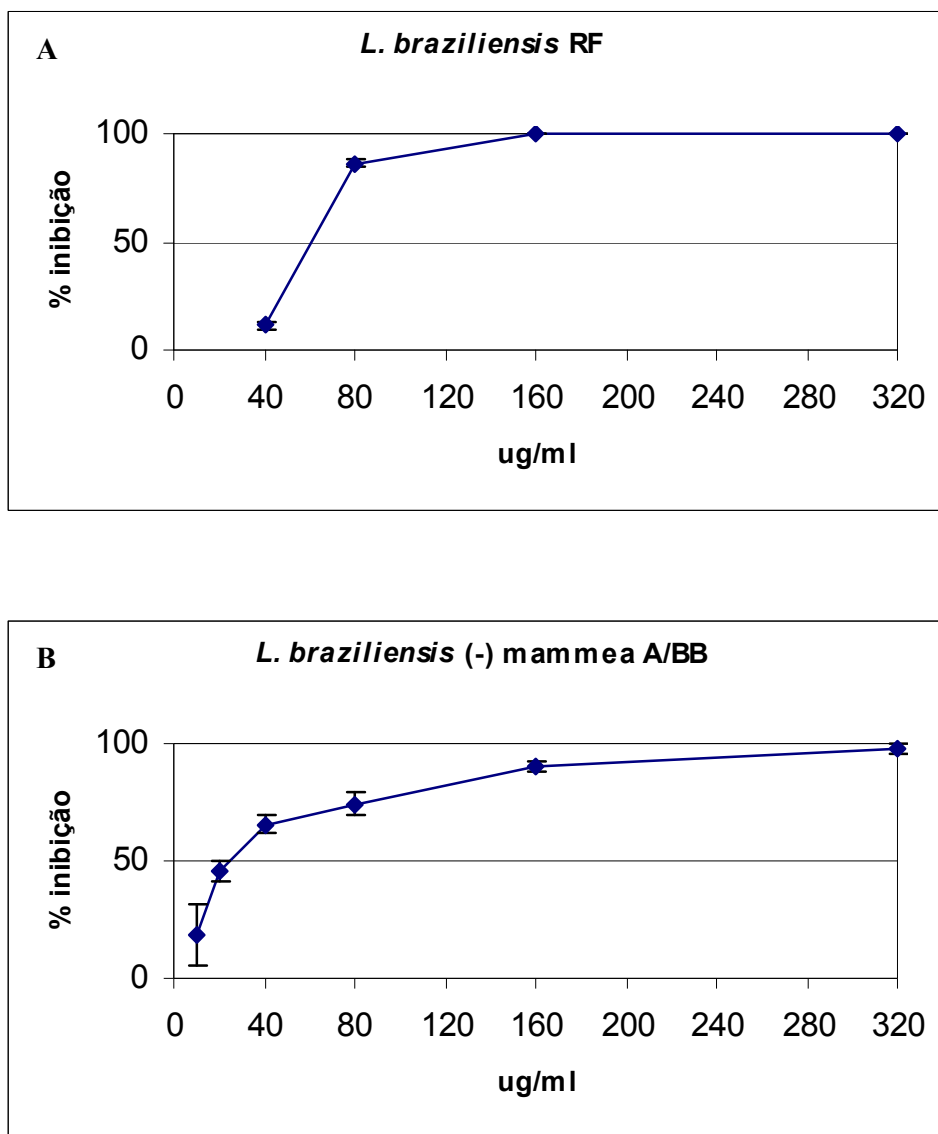
O crescimento do controle de protozoários tratados com no máximo 1,0% de DMSO foi idêntico ao controle sem qualquer tratamento em todos os experimentos, constatando que este solvente não influenciou na ação dos extratos e substâncias testadas.

Por fim, os experimentos evidenciaram que o fracionamento e a purificação da substância (-) mammea A/BB melhorou gradualmente a atividade antileishmania de modo que a  $DL_{50}$  após 24 horas de cultivo, foi de 59,8  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato bruto (**RF**) e de 23,95  $\mu\text{g/mL}$  para a substância purificada (-) mammea A/BB. Porém, o extrato bruto (**RF**) nas concentrações de 320 a 80  $\mu\text{g/mL}$  apresentou maior inibição do crescimento celular se comparado com a substância (-) mammea A/BB (Gráficos 1A e 1B, p. 103), isto pode ser devido a um efeito sinérgico entre substâncias presentes no extrato (**RF**). No entanto, nas concentrações menores que 40  $\mu\text{g/mL}$  observamos que a substância (-) mammea A/BB apresentou maior inibição do crescimento celular em relação ao extrato (**RF**) (Gráficos 1A e 1B, p. 103), isto pode estar relacionado com a depleção da(s) substância(s) ativa(s) do meio quando o extrato é utilizado em baixas concentrações, já que neste estão presentes muitas substâncias. Deste modo, este estudo foi o primeiro a evidenciar a importante atividade antileishmania do extrato da *C. brasiliense* e principalmente da substância pura (-) mammea A/BB.

**Tabela 5:** Efeito dos extratos e substâncias da *C. brasiliense* no crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Extratos e substâncias isoladas	DL <sub>50</sub> (µg/mL)
<b>LF</b>	> 320,0
<b>RF</b>	59,8
Amentoflavona	> 320,0
(-) mammea A/BB	23,95
pentamidina *	0,6

**LF** = extrato liofilizado das folhas da *C. brasiliense*; **RF**= resíduo do extrato etanólico solúvel em diclorometano. \* fármaco antileishmania de referência.



**Gráfico 1:** Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* após 24 horas de incubação. **(A)** extrato residual solúvel em diclorometano **RF**, **(B)** substância (-) mammea A/BB. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 4.2.2 Estudo dos efeitos do *Calophyllum brasiliense* no crescimento das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

O extrato bruto residual das folhas da *C. brasiliense* (**RF**), a fração hexano (**F1**) e a substância pura (-) mammea A/BB obtidos a partir deste extrato foram avaliados quanto a sua atividade frente ao crescimento das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*, através da contagem do número de protozoários por mililitro de cultura nos tempos de 24, 48 e 72 horas após o tratamento, e o valor de  $CI_{50}$  foi considerado após 72 horas de tratamento.

As formas promastigotas foram tratadas com as concentrações de 160; 80; 40; 20; 10  $\mu\text{g/mL}$  do extrato residual solúvel em diclorometano (**RF**) e este apresentou  $CI_{50} = 40 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 6, p. 108), também observou-se que o extrato (**RF**) apresentou 90% de inibição do crescimento celular na concentração de 160  $\mu\text{g/mL}$  logo após 24 h de incubação e manteve um percentual de inibição próximo a 100% até 72h após a adição deste extrato. Na concentração de 80  $\mu\text{g/mL}$  o extrato (**RF**) apresentou, após 24h de incubação, um percentual de 80% de inibição de crescimento e este percentual aumentou para aproximadamente 95% de inibição até 72h de cultivo. Este extrato, ainda apresentou aproximadamente 50% de inibição na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  após 72h de tratamento, já na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  apresentou aproximadamente 20% de inibição até 48h de cultivo, porém este patamar diminuiu para 11% após 72h de incubação (Gráfico 2A, p.109), esta diminuição na inibição do crescimento durante o experimento pode estar relacionado com a depleção dos princípios ativos do meio. Baseando-se nestes resultados também foi realizado o tratamento das formas promastigotas com a fração hexano (**F1**) obtida a partir do extrato residual das folhas (**RF**) nas concentrações de 160; 80; 40; 20; 10  $\mu\text{g/mL}$  e esta apresentou  $CI_{50} = 17,08 \mu\text{g/mL}$  após 72h de incubação (Tabela 6, p. 108), também foi observado que a fração (**F1**) nas



concentrações de 160; 80 e 40  $\mu\text{g/mL}$  apresentou inibição do crescimento celular próximo a 90% após 24h de incubação e este patamar aumentou mantendo-se próximo a 100% até 72h de incubação. Na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  a fração **(F1)** promoveu inibição do crescimento entre 40% e 50% durante 48h de incubação e de 60% após 72h de incubação, já esta mesma fração na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  inibiu somente cerca de 30% do crescimento celular após 72h incubação (Gráfico 2B, p.109).

Deste modo, pôde-se observar uma maior eficácia da fração **(F1)** em relação ao extrato **(RF)** e, por conseguinte procedeu-se o fracionamento desta para a obtenção da substância biologicamente ativa. Desta forma, obteve-se a substância purificada (-) mammea A/BB, esta foi testada nas concentrações de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625  $\mu\text{g/mL}$  e apresentou uma importante atividade inibitória sobre o crescimento das formas promastigotas com  $\text{CI}_{50} = 3,0$   $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 6, p. 108), também observou-se que as concentrações de 40 e 20  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram uma inibição de crescimento dos protozoários próximo a 90%, logo após 24h de incubação, durante o experimento o crescimento celular foi nulo e o percentual de inibição manteve-se próximo a 100% até 72h de tratamento. Já nas concentrações de 10 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , a substância (-) mammea A/BB apresentou após 24h de incubação, inibição do crescimento das promastigotas de aproximadamente 81% e 73%, respectivamente e estes percentuais aumentaram para ambas as concentrações, apresentando aproximadamente 95% de inibição até 72h de incubação. Esta substância ainda apresentou cerca de 35% de inibição na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  após 72h de incubação e em menores concentrações os efeitos foram insignificantes. (Gráfico 2C, p.109).

Para avaliar a atividade da *C. brasiliense* frente às formas amastigotas axênicas, estas foram tratadas com as seguintes concentrações do extrato residual das folhas **(RF)** 160; 80; 40; 20; 10; 5; 1  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando  $\text{CI}_{50} = 3,69$   $\mu\text{g/mL}$ , também pôde-se observar que nas concentrações de 80 e 40  $\mu\text{g/mL}$  deste extrato apresentou efeitos líticos logo após 24h de

tratamento, apresentando respectivamente, aproximadamente 75% e 65% de inibição do crescimento, no entanto, para ambas as concentrações durante o experimento estes percentuais aumentaram e mantiveram-se próximos de 90% de inibição. Na concentração de 20 µg/mL o extrato **(RF)** apresentou logo após 24h de incubação, cerca de 60% de inibição, no decorrer do experimento este patamar manteve-se próximo a 90% de inibição. Porém, quando adicionou-se 10 µg/mL do extrato a inibição do crescimento foi de aproximadamente 50% após 24 horas de incubação, durante o experimento este percentual aumentou atingindo aproximadamente 80% de inibição. Já na adição de 5 µg/mL do extrato **(RF)** verificou-se um aumento na inibição do crescimento celular durante o experimento, e este atingiu um percentual próximo de 60% até 72h de incubação. No entanto, em concentrações menores a inibição do crescimento foi insignificante (Gráfico 3A, p. 110). Para avaliar a atividade da fração hexano **(F1)** utilizou-se as concentrações de 80; 40; 20; 10; 5; 1; 0,5 µg/mL, e esta fração apresentou  $CI_{50} = 3,25$  µg/mL, também verificou-se que a adição de 80 e 40 µg/mL desta fração ao meio de cultura apresentou efeitos líticos sobre os protozoários logo após 24h tratamento, com percentual de inibição de 85% e 72%, respectivamente e para ambas as concentrações, estes percentuais aumentaram para aproximadamente 100% de inibição do crescimento celular, durante o experimento. Na concentração de 20 µg/mL a inibição foi de 45% logo após 24h e este patamar aumentou durante o experimento atingindo aproximadamente 95% em 72h de incubação. Já na adição de 10 e 5 µg/mL verificou-se que houve inibição do crescimento celular de aproximadamente 45% após 24h e 48h de incubação, no entanto após 72h de incubação, estas concentrações da fração **(F1)** inibiram cerca de 73% e 60% do crescimento celular, respectivamente. Já a adição de apenas 0,625 µg/mL conferiu uma inibição próxima de 23% após 72h de incubação (Gráfico 3B, p. 110).

Finalmente, foi avaliada a atividade da (-) mammea A/BB frente às formas amastigotas utilizando-se as concentrações de 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 µg/mL. Esta

substância também apresentou uma importante atividade inibitória com  $CI_{50} = 0,88 \mu\text{g/mL}$  (Tabela 6, p. 108), no entanto pôde-se verificar também, que esta substância nas concentrações de 40; 20; 10 e 5  $\mu\text{g/mL}$  apresentou inibição do crescimento das formas amastigotas de aproximadamente 65% logo após 24h de tratamento, este percentual aumentou durante o experimento atingindo cerca de 85% em 48h e 93% em 72h de incubação. Ainda, a adição de 1,25  $\mu\text{g/mL}$  da (-) mammea A/BB ao meio conferiu uma inibição próxima de 50% após 48h de tratamento, tendo este percentual aumentado para aproximadamente 75% em 72h de incubação. Já na adição de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  da substância verificou-se que logo após 24h o percentual de inibição do crescimento foi próximo de 55% e este percentual aumentou atingindo cerca de 85% após 48h e 93% em 72h de incubação. Porém com a adição de 1,25  $\mu\text{g/mL}$  da (-) mammea A/BB ao meio de cultura, o crescimento dos protozoários foi inibido em aproximadamente 50% após 48h e 75% em 72h de tratamento. Ainda na concentração de 0,625  $\mu\text{g/mL}$  esta substância apresentou inibição do crescimento de aproximadamente 25% após 72h de incubação (Gráfico 3C, p. 110).

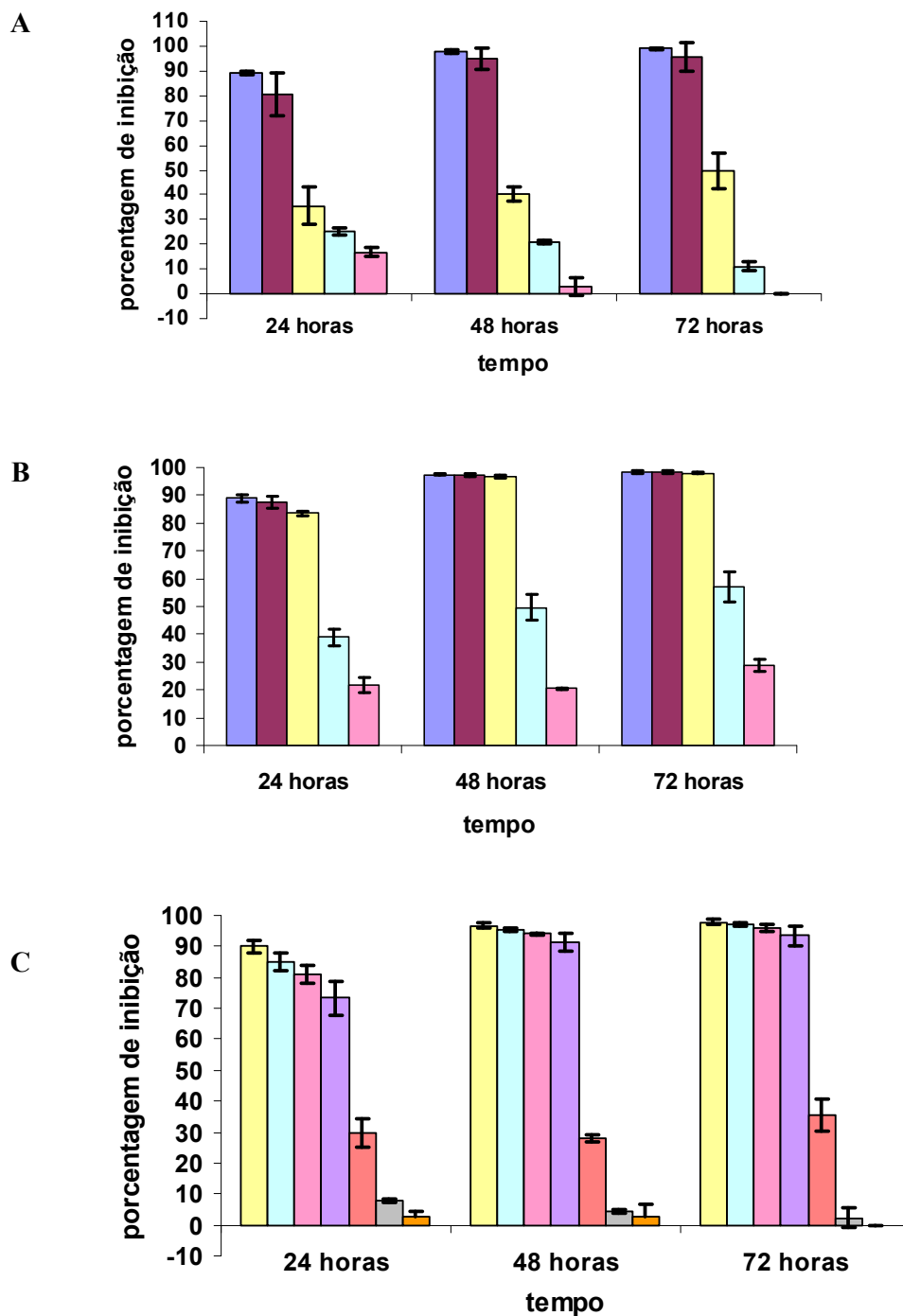
Com base em todos os resultados obtidos tanto para a avaliação da atividade frente ao crescimento das formas promastigotas quanto das formas amastigotas pôde-se observar que o efeito inibitório do extrato (**RF**), da fração (**F1**) e da substância (-) mammea A/BB foi concentração-dependente para todas as amostras testadas, como demonstrado pelos gráfico 2 A,B,C (p. 109) e gráficos 3 A,B,C (p. 110) respectivamente. Porém, em alguns experimentos, nas baixas concentrações das amostras ocorreu diminuição da atividade inibitória no decorrer do experimento, isto pode ser devido à depleção dos princípios ativos do meio. Os resultados também indicaram que o extrato (**RF**), a fração (**F1**) e a substância (-) mammea A/BB foram mais efetivos frente às formas amastigotas axênicas em comparação as formas promastigotas da *L. amazonensis*.

Por fim, os experimentos evidenciaram que o fracionamento e a purificação da substância (-) mammea A/BB melhorou gradualmente a inibição do crescimento das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, sendo este estudo o primeiro a evidenciar a importante atividade antileishmania da *C. brasiliense* frente a *L. amazonensis*, principalmente da substância (-) mammea A/BB.

**Tabela 6:** Efeito do extrato bruto, fração e substância pura da *C. brasiliense* no crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

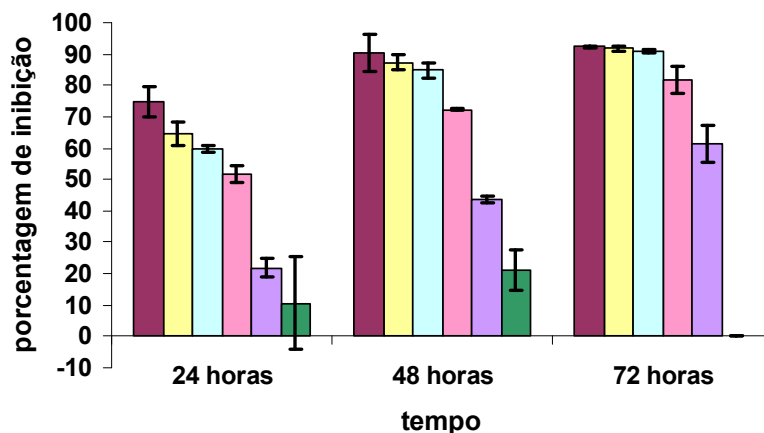
Extrato, fração e substância	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
	Promastigotas	Amastigotas
<b>RF</b>	40,0	3,69
<b>F1</b>	17,08	3,25
(-) mammea A/BB	3,0	0,88

**RF**= extrato residual das folhas da *C. brasiliense*, solúvel em diclorometano; **F1**= fração hexano; substância purificada (-) mammea A/BB.

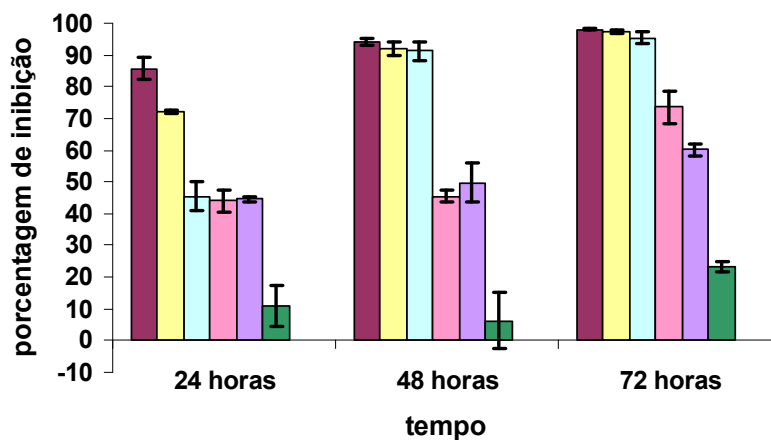


**Gráfico 2:** Porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* durante período de 72 horas. (A) extrato residual solúvel em diclorometano RF, (B) fração hexano F1 e (C) substância (-) mammea A/BB isolada a partir da fração hexano. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. ■ 160 µg/mL, ■ 80 µg/mL, ■ 40 µg/mL, ■ 20 µg/mL, ■ 10 µg/mL, ■ 5 µg/mL, ■ 2,5 µg/mL, ■ 1,25 µg/mL, ■ 0,625 µg/mL

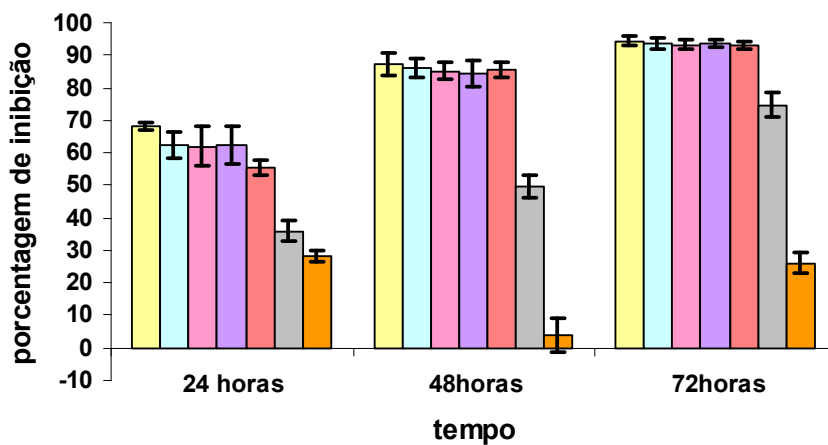
A



B



C



**Gráfico 3:** Porcentagem de inibição do crescimento de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* durante período de 72 horas (A) extrato residual solúvel em diclorometano RF, (B) fração hexano F1 e (C) substância (-) mammea A/BB isolada a partir da fração hexano. Os valores representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. ■ 80 µg/mL, ■ 40 µg/mL, ■ 20 µg/mL, ■ 10 µg/mL, ■ 5 µg/mL, ■ 2,5 µg/mL, ■ 1,25 µg/mL, ■ 1,0 µg/mL, ■ 0,625 µg/mL.

#### 4.2.3 Estudo da citotoxicidade da substância (-) mammea A/BB em macrófagos J774G8

Macrófagos da linhagem J774G8 foram tratados com concentrações de 1000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 1; 0,5  $\mu\text{g/mL}$  da substância (-) mammea A/BB obtida a partir do extrato das folhas da *C. brasiliense*. Após 48h de incubação, a citotoxicidade foi avaliada pelo método colorimétrico da sulforrodamina B e com base nos resultados a substância apresentou  $\text{CC}_{50} = 25,8 \mu\text{g/mL}$ . Desta forma, a toxicidade para macrófagos J774G8 e para os protozoários foi comparada utilizando-se o índice de seletividade (IS), que é a razão entre  $\text{CC}_{50}$  da substância para os macrófagos J774G8 e  $\text{CI}_{50}$  da substância para as formas promastigotas e amastigotas. Como foi observado a substância (-) mammea A/BB apresentou  $\text{CI}_{50} = 3,0 \mu\text{g/mL}$  frente às formas promastigotas e  $\text{CC}_{50} = 25,8 \mu\text{g/mL}$  para os macrófagos, desta forma foi possível calcular o IS que para as formas promastigotas foi de 8,6. Para as formas amastigotas a substância apresentou  $\text{CI}_{50} = 0,88 \mu\text{g/mL}$  e portanto o IS para as formas amastigotas foi de 29,3. Com este estudo observou-se que apenas as concentrações superiores àquelas que exercem ação tóxica sobre os protozoários são tóxicas para os macrófagos J774G8 portanto, concluí-se que a substância (-) mammea A/BB apresenta baixa toxicidade, sendo mais seletiva para os protozoários em relação aos macrófagos.

Os macrófagos são células nucleadas hospedeiras das formas amastigotas dos protozoários do gênero *Leishmania*, e constituem células do sistema imunológico do homem, sendo responsáveis por um dos mecanismos de defesa do organismo quando este entra em contato com um agente estranho. Uma droga ideal para o tratamento das leishmanioses seria aquela que conseguisse eliminar o protozoário intracelular ou inibir o seu crescimento sem danificar os macrófagos e também outras células do organismo, diminuindo assim a possibilidade de efeitos colaterais.

É necessário ressaltar que o estudo da toxicidade dos produtos naturais é de extrema importância, haja vista que recentemente, houve um aumento no interesse da população em terapias alternativas, principalmente o uso terapêutico de produtos derivados de planta, isto pode ser devido à ineficiência e aos efeitos colaterais da medicina convencional para o tratamento de algumas doenças. Considerando que grande parte da população mundial não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional, a medicina popular cria a falsa idéia de que os produtos naturais não apresentam efeitos colaterais (RATES, 2001). Porém, o uso tradicional não garante segurança a um produto (EDZARD, 1998) e, portanto é necessário que exista uma investigação rígida da atividade biológica e da toxicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo* utilizando animais e posteriormente ensaios clínicos em humanos para comprovar a verdadeira eficácia e segurança dos produtos naturais.



#### 4.2.4 Alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis* ao microscópio eletrônico de transmissão

Para evidenciar as alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis*, estas foram tratadas com  $CI_{50} = 3,0 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{90} = 5,0 \mu\text{g/mL}$  da substância (-) mammea A/BB por 72h e analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão. O controle de protozoários não tratados com a substância, também foi analisado e estes apresentaram membrana, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, cinetoplasto, flagelo e bolsa flagelar íntegros (Figura 14A, p. 116). No entanto, as formas promastigotas tratadas com  $3,0 \mu\text{g/mL}$  da substância (-) mammea A/BB apresentaram aparecimento de múltiplos vacúolos no corpo celular (Figura 14B, p. 116), promastigotas binucleadas (Figura 14B, p. 116) e evidente aumento da mitocôndria (Figuras 14B, C e D; p. 116) com a presença de algumas membranas concêntricas na matriz mitocondrial (Figura 14B e D, p. 116). Estudos anteriores mostraram alteração mitocondrial, quando formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com outros agentes leishmanicidas como: a coronaridina um alcalóide indólico isolado da *Peschiera australis* (DELORENZI et al., 2001); a diidroximetoxichalcona isolada da *Piper auduncum* (TORRES-SANTOS, et al., 1999); a lincochalcona A (ZHAI et al., 1995); o óleo essencial rico em linalol das folhas do *Croton cajucara* (ROSA et al., 2003); o óleo essencial rico em eugenol das folhas do *Ocimum gratissimum* (UEDA-NAKAMURA et al., 2006); o BPQ-OH um inibidor específico da síntese do esqualeno (RODRIGUES et al., 2005); e os derivados da diamina DB75 e DB569 (SOUZA et al., 2004). Outros estudos mostraram que os inibidores da síntese do ergosterol também afetam a morfologia da mitocôndria dos tripanosomatídeos, provocando aumento no volume, como cetoconazol e a terbinafina (VANNIER-SANTOS et al., 1995), o 22,26 azasterol (RODRIGUES et al., 2002) e outros azasteróis (MAGARACI et al., 2003; LORENTE et al., 2004). Alguns estudos

bioquímicos tem demonstrado que diferente das células dos mamíferos, as membranas mitocondriais dos tripanosomatídeos apresentam grandes quantidades de esteróis endógenos e exógenos, e a presença do ergosterol e seus análogos são essenciais para a manutenção da estrutura normal e da função da membrana mitocondrial destes (LAZARDI et al., 1990; VANNIER-SANTOS et al., 1995), com isto a mitocôndria seria um importante alvo para a quimioterapia das leishmanioses. Entretanto, a mitocôndria é uma organela importante para os tripanosomatídeos, sendo responsável pela respiração celular. Muitas drogas antiprotozoários influenciam no metabolismo energético dos parasitas, como o estilbogluconato de sódio (Pentostan) que inibi a fosforilação do ADP em ATP e o ciclo do ácido cítrico nas formas amastigotas da *L. mexicana* (BERMAN et al., 1987; BERMAN et al., 1989) e o isetionato de pentamidina que promove alterações nas mitocôndrias de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (CROFT; BRAZIL, 1982).

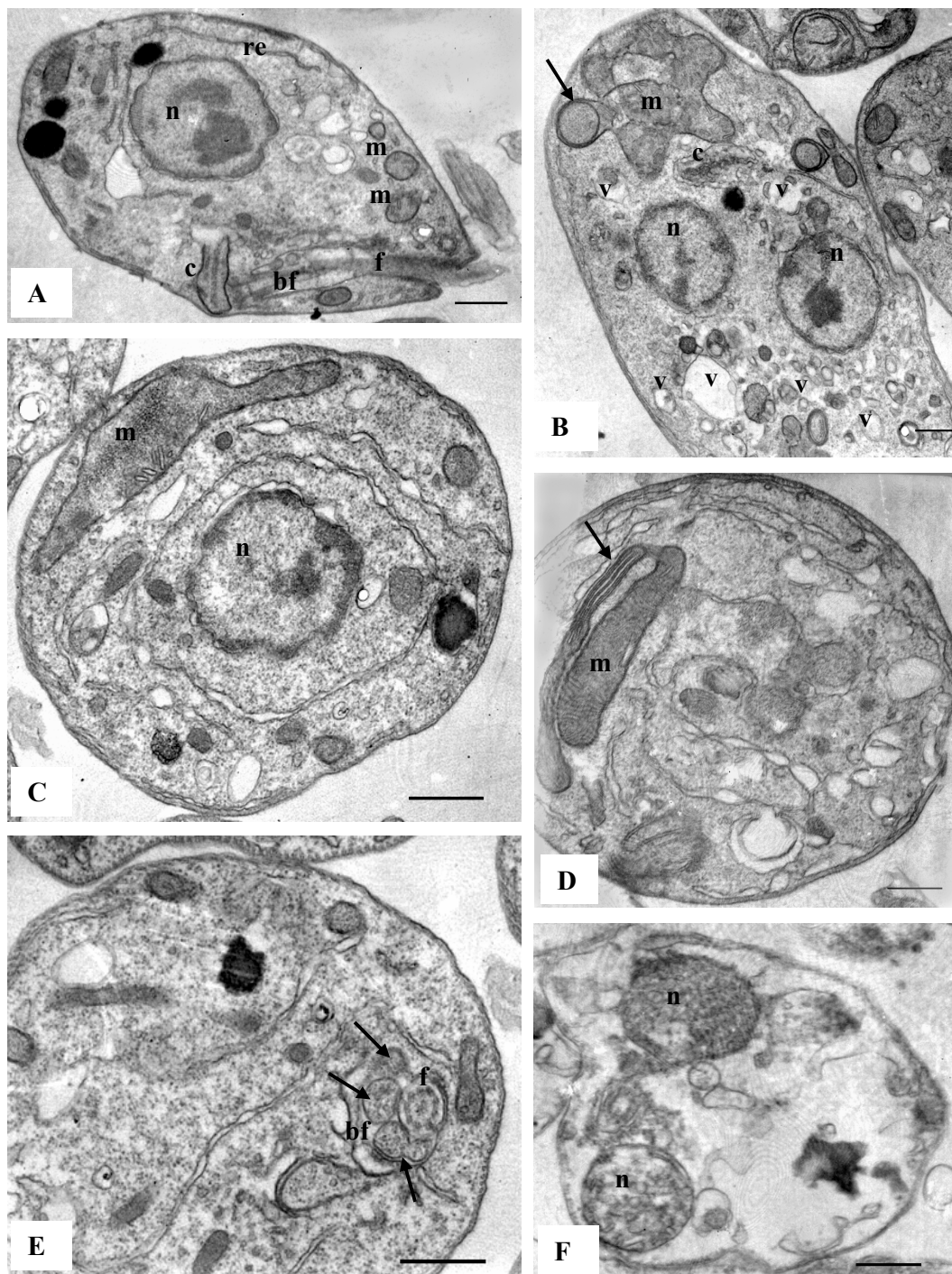
Uma intensa atividade exocítica também foi verificada nas formas promastigotas tratadas com 3,0 µg/mL da substância (-) mammea A/BB, com o aparecimento de vesículas na bolsa flagelar (Figura 14E, p. 116) indicando uma mudança na plasticidade da membrana que permitiu a formação de vesículas de exocitose do corpo celular em direção à bolsa flagelar. Desta forma, protusões foram formadas pela membrana plasmática e foram liberadas do corpo celular com uma porção do citoplasma, isto pode ser devido a um intenso processo de secreção com o aparecimento de várias estruturas membranosas dentro da bolsa flagelar (Figura 14E, p. 116). A bolsa flagelar constitui uma região altamente diferenciada da superfície dos tripanosomatídeos que facilita a internalização de macromoléculas do hospedeiro para o parasita e a secreção de substâncias do metabolismo do protozoário, sendo o principal sítio de endocitose e exocitose (McCONVILLE et al., 2002; WEBSTER; RUSSEL, 1993). Estudos anteriores demonstraram que quando as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com inibidores da síntese do ergosterol como: 22,26 azasterol

(RODRIGUES et al., 2002) e outros azasteróis (MAGARACI et al., 2003; LORENTE et al., 2004) foi observada uma intensa atividade exocítica, com o aparecimento de estruturas membranosas na bolsa flagelar, sugerindo a possibilidade deste processo ser devido a secreção de lipídeos anormais nesta região, os quais foram acumulados em decorrência da ação destas drogas. Em um estudo realizado por Tiumam et al., 2005 as formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o partenolídeo isolado das partes aéreas do *Tanacetum parthenium*, também apresentaram intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar, devida a um processo de produção exacerbada de cisteína proteinase pelos protozoários na tentativa de sobreviver.

Desta forma, o mecanismo de intensa exocitose observado nas formas promastigotas tratadas com a substância (-) mammea A/BB, pode significar um processo de defesa na tentativa do protozoário eliminar moléculas prejudiciais que estavam no meio e entraram na célula ou mesmo a exclusão de moléculas produzidas exacerbadamente pelo parasita para sua proteção, e ou a exclusão de moléculas acumuladas no corpo celular em decorrência da ação da substância.

As formas promastigotas tratadas com 5,0 µg/mL da substância (-) mammea A/BB apresentaram células com a maioria das organelas destruídas e algumas com dois núcleos (Figura 14F, p. 116).

A análise das alterações ultraestruturais nas formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a substância (-) mammea A/BB contribuiu para o início do estudo do mecanismo de ação desta substância, sendo importantes as alterações encontradas, porém outros estudos precisam ser realizados a fim de comprovar o mecanismo ação, já que esta substância pode ser considerada como uma droga em potencial no tratamento da leishmaniose.



**Figura 14:** Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Controle (A), promastigotas cultivadas na presença de 3,0  $\mu\text{g/mL}$  (B-E) e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  (F) da substância (-) mammea A/BB após 72 horas de incubação. n, núcleo; f, flagelo; bf, bolsa flagelar; c, cinetoplasto; m, mitocôndria; re, retículo endoplasmático; v, vacúolo. As setas demonstram em: (B e D) membranas concêntricas na matriz mitocondrial; (E) intensa atividade exocítica do protozoário. Barras = 1  $\mu\text{m}$ .

Considerando a problemática da leishmaniose, que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma doença prevalente e endêmica em muitos países, bem como no Brasil, onde é encontrada em todos os estados, sendo responsável por altas taxas de mortalidade e constituindo um grave problema de saúde pública (GENARO, 1998a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001a). Os resultados obtidos neste trabalho a cerca da atividade antileishmania demonstram que o extrato bruto e a fração obtidos a partir das folhas da *C. brasiliense* assim como a substância (-) mammea A/BB isolada a partir destes apresentaram importante atividade antileishmania tanto frente à *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* podendo ser utilizados futuramente como uma alternativa na terapêutica da leishmaniose, já que os principais medicamentos recomendados para o tratamento das leishmanioses cutâneas e viscerais foram introduzidos na terapêutica há mais de 50 anos (derivados dos antimoniais pentavalentes) (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT et al., 2005; GENARO, 1998a). Entretanto, estes fármacos são de administração parenteral, necessitam de longo período de tratamento (CROFT, 1988), e apresentam principalmente toxicidade cardíaca e renal, isto os torna intolerantes para muitos pacientes. Outros agentes antileishmania necessitam ser descobertos, pois a resistência aos antimoniais é freqüente, (BERMAN, 1988, 1996; GREVELINK; LERNER, 1996) mais de 50% dos casos de leishmaniose não respondem ao tratamento utilizando estes fármacos (SERENO, 2000; JEBBARI; DAVIDSON, 1998). Contudo, a crescente incidência da leishmaniose bem como a crescente resistência aos fármacos disponíveis para a terapêutica tem tornado crescente o interesse na pesquisa de novos agentes terapêuticos mais baratos, mais efetivos, que reduza a duração do tratamento, drogas não parenterais e menos tóxicos que possam substituir os atuais (BERMAN, 1997).

Neste contexto, a importância dos produtos naturais na terapêutica é marcante, visto que a diversidade molecular que a natureza oferece é incalculável. A utilização das plantas

medicinais como matéria-prima para o isolamento de substâncias com atividade leishmanicida ou mesmo a utilização destas como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos pode representar o surgimento de um novo grupo de substâncias para a utilização na intervenção farmacológica. Neste contexto, o Brasil possui uma flora riquíssima, sendo necessário um conhecimento científico bastante sólido para a transformação das plantas medicinais em produtos industrializados.

Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho acerca das propriedades antileishmania do extrato bruto, da fração hexânica do extrato e principalmente da substância pura (-) mammea A/BB, podem ser considerados promissores sobre a ótica da química medicinal que procura compostos bioativos, oriundos de plantas que possam servir de molécula protótipo para a síntese de análogos mais potentes, mais seletivos, menos tóxicos e de baixo custo. Para isto tornam-se interessantes a elucidação do mecanismo de ação desta substância, bem como estudo da atividade antileishmania *in vivo*.

## 5 CONCLUSÃO

- A partir do extrato residual solúvel em diclorometano das folhas da espécie vegetal *C. brasiliense*, foram isoladas e identificadas duas substâncias, um enantiômero levógiro da mammea A/BB e o biflavonóide amentoflavona, já descritos na literatura.
- O perfil cromatográfico obtido por CLAE-EM para o extrato (RF) permite sua padronização, para fins de controle de qualidade, contribuindo para a futura utilização deste extrato bruto no tratamento da leishmaniose como alternativa a utilização da substância (-) mammea A/BB, já que este apresentou importante atividade antileishmania.
- A substância isolada do *C. brasiliense* (-) mammea A/BB apresentou importante atividade antileishmania *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*  $DL_{50} = 23,95 \mu\text{g/mL}$ , apresentando também importante atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*  $IC_{50} = 3,0 \mu\text{g/mL}$  e frente às formas amastigotas axênicas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*  $IC_{50} = 0,88 \mu\text{g/mL}$ .
- O processo de fracionamento até o isolamento da substância F1.12 ((-) mammea A/BB) aumentou gradativamente a atividade antileishmania *in vitro* frente às formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, bem como frente às formas promastigotas de *L. braziliensis*.

- Os ensaios de citotoxicidade da substância (-) mammea A/BB em macrófagos J774G8 demonstraram que as concentrações tóxicas para os macrófagos foram muito superiores àquelas para as formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Desta forma, esta substância apresenta baixa toxicidade frente aos macrófagos.
- As formas promastigotas da *L. amazonensis* tratadas com 3,0 µg/mL da substância (-) mammea A/BB apresentaram significantes alterações ultraestruturais como o aparecimento de células binucleadas, múltipla vacuolização citoplasmática, intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar e aumento no volume da mitocôndria com a presença de membranas concêntricas na matriz mitocondrial.
- O presente trabalho demonstrou pela primeira vez que o extrato (**RF**), a fração (**F1**) e principalmente a substância isolada (-) mammea A/BB exercem um importante efeito leishmanicida *in vitro* frente a *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, sendo que esta substância apresenta baixa citotoxicidade para os macrófagos J774G8 e promove significantes alterações ultraestruturais em formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- Os resultados obtidos neste trabalho para a espécie vegetal *C. brasiliense* Camb. acerca do isolamento e identificação da substância bioativa e a importante atividade biológica encontrada constituem o primeiro passo para a utilização desta droga vegetal.



## 6 REFERÊNCIAS

ALBIERO, A. L. M. **Estudo farmacognóstico de *Sapindus saponaria* L.** 1994. 169 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Fukuoka, v.27, no. 1, p. 141-143, Jan. 2004.

BANERJEE, T.; VAN DER VLIET, A.; ZIBOH, V. A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 66, no. 5-6, p. 485-492, 2002.

BEACH, D. H.; GOAD, L. J. HOLZ JUNIOR. G.G. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 31, no. 2, p. 149-162, 1988.

BENNETT, J. E. Fármacos antimicrobianos (continuação): fármacos antifúngicos. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill, 1996. cap. 49, p. 864-875.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 10, no. 3, p. 560-586, May-Jun. 1988.

BERMAN, J. D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14, no. 5, p. 519-522, 1996.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 24, no. 4, p. 684-703, Apr. 1997.

BERMAN, J. D.; GOAD, L. J.; BEACH, D. H.; HOLZ Jr., G. G. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 20, no. 1, p. 85-92, 1986.

BERMAN, J. D.; HOLZ JUNIOR., G. G.; BEACH, D. H. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes culture. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.12, no. 1, p. 1-13, 1984.

BERMAN, J. D.; EDWARDS, N.; KING, M.; GROGL, M. Biochemistry of pentostan resistant Leishmania. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 40, p. 159-164, 1989.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostan) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, p. 197-201, 1987.

BRITO, A. R.M.S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 39, no. 1, p. 53-67, 1993.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal moderna**. Chapecó:Ed. Argos, 2001. parte II, cap.8 , p. 297-315.

CARDONA, M. L.; FERNÁNDES, I.; PEDRO, J. R.; SERRANO, A. Xanthones from *Hypericum reflexum*. **Phytochemistry**, New York, v. 29, no. 9, p. 3003-3006, 1990.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras**. Recomendações Silviculturais, Potencialidades e uso da Madeira. Brasília: EMBRAPA – CNPF, 1994. 640 p.

CHANG, K. P.; HENDRICKS, L. D. Laboratory cultivation and maintenance of Leishmania. In: CHANG, K. B.; BRAY, R.S. **Leishmaniasis**. Amsterdam: Elsevier Science, 1985, cap. 13, p. 213-244.

CHECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-103, 1998.

COHEN, B. E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of twomchannels. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 162, no. 1-2, p. 95-106, 1998.

COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. New Chromanone Acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. **Journal of Natural Products**, Zurich, v. 67, p. 537-541, Feb. 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, v. 3, p. 388, 1978.

CREAGH, T.; RUCKLE, J. L.; TOLBERT, D. T.; GILTNER, J.; EIZNHAMER, D. A.; DUTTA, B.; FLAVIN, M. T.; XU, Z. K. Safety and Pharmacokinetics of Single Doses of (+)-Calanolide A, a Novel, Naturally Occurring Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, in Healthy, Human Immunodeficiency Virus-Negative Human Subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, no. 5, p. 1379-1386, May, 2001.

CROFT, S. L.; BRAZIL, R. P. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 76, p. 37-43, 1982.

CROFT, S. L. Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 9, no. 10, p. 3776-381, Oct. 1988.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.19, no. 11, p. 502-508, Nov. 2003.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v.21, no.11, p. 508-512, Nov. 2005.

CROMBIE, L.; GAMES, D.E.; MCCORMICK, A. Extratives of *Mammea americana* L. Part II. The 4-Phenylcoumarins. Isolation and Structure of Mammea A/AA, A/A cyclo D, A/BA, A/AB, and A/BB. **Journal Chemical Society**, v. (C), p. 2553-2559, 1967.

CROMBIE, L.; JONES, R. C. F.; PALMER, C. J. Synthesis of the *Mammea* Coumarins. Part 1. The Coumarins of the *Mammea* A, B and C Series. **Journal Chemical Society**, v. 26, p. 317-331, 1987.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981, p. 337-340.

CURRENS, M. J. ; GULSKOWSKI, R. J.; MARINER, J.M.; MORAN, R. A.; BUCKEHEIT Jr., R. W.; GUSTAFSON, R. K.; McMAHON, J. B.; BOYD, M. R. Antiviral activity and mechanism of action of Calanolide A against the Human Immunodeficiency Virus Type-1. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Maryland, v.279, no. 2, p. 645-651, 1996.

DA SILVA, K. L.; DOS SANTOS, A. R. S.; MATTOS, P. E. O.; YUNES, R. A.; DELLEMONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Therapie**. v. 56, p. 431-434, 2001.

DELORENZI, J.C., ATTIAS, M.; GATTASS, C.R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A. C.; HENRIQUES, A. T.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. B. Antileishmanial activity of indol alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, no. 5, p. 1349-1354, 2001.

DHARMARATNE, H. R. W.; MAYURI SAJEEVANI, J. R. D.; MARASINGHE, G. P. K.; SHANTHA EKANAYAKE, E. M. H. G. Distribution of Pyranocoumarins in *Calophyllum cordato-oblongum*. **Phytochemistry**, New York, v. 49, no. 4, p. 995-998, 1998b.

DHARMARATNE, H. R. W.; TAN, G. T.; MARASINGHE, G. P. K.; PEZZUTO, J. M. Inhibition of HIV-1 Replication by *Calophyllum* Coumarins and Xanthones. **Planta Medica**. v. 68, p. 86-87, 2001.

DHARMARATNE, H. R. W.; WANIGASEKERA, W. M. A. P.; MATA-GREENWOOD, E.; PEZZUTO, J. M. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase activity by Cordatolides Isolated from *Calophyllum cordato-oblongum*. **Planta Medica**. v. 64, p. 460-461, 1998a.

DHARMARATNE, H. R. W.; WIJWSINGHE, W. M. N. M.; THEVANASEM, V. Antimicrobial activity of xanthones from *Calophyllum* species, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 66, p. 339-342, 1999.

EDITORIAL. Pharmaceuticals from plants: great potential, few funds. **The Lancet**. Boston, v. 343, no. 8912, p.1513-1515, Jun. 1994.

EDZARD, E. Harmless Herbs? A review of the recent literature. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 104, no. 2, p. 170-178, 1998.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. 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**. 5. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis:UFSC, 2003. cap.16, p. 91-103.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 75, no. 2-3, p. 141-164, 2001.

EMENDORFER, F.; EMENDORFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V. F.; NIERO, R. CECHINEL-FILHO, V. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated quinea-pig ileum and rat duodenum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.8, no.1, p. 63-68, 2005.

ERNST, M. D. E. Harmless Herbs? A review of the recent literature. **The American Journal of Medicine**, v. 104, p. 171-178, Feb. 1998.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S. L. Sensitives of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, Basel, v. 81, no. 2, p. 151-157, 2002.

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. Anti-leishmanial acitivity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, 2004.

FUGH-BERMAN, A. Herb-drug interactions. **The Lancet**, Boston, v. 355, no. 9198, p. 134-138, Jan. 2000.

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](http://www.funasa.gov.br/epi/pdfs/casos_conf_por_uf_1980_2001.pdf)>. Acesso em: 27 jan. 2004.

GASPAROTTO-JUNIOR, A; BRENZAN, M. A.; PILOTO, I. C.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 28, no.4, p. 575-578, agosto, 2005.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998a. cap. 7, p. 41-60.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998b. cap. 9, p. 64-81.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, no.1, p.71-80, jan-fev, 2003.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. St. Louis, v. 34, no.2, p. 257-272, Feb. 1996.

GUILLET, D.; HÉLESBEUX, J. J.; SÉRAPHIN, D.; SÉVENET, T.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Novel Cytotoxic 4-Phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 64, p. 563-568, Apr. 2001b.

GUILLET, D.; SÉRAPHIN, D.; RONDEAU, D.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Citotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. **Phytochemistry**, New York, v. 58, p. 571-575, 2001a.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between Phytochemistry and Medicine. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, no. 12, p. 3864-3874, 1991.

HANSEN, R. S.; PAULSEN, I.; DAVIES, M. Determinants of amentoflavone interaction at the GABA<sub>A</sub> receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 519, p. 199-207, 2005.

HART, D. T.; LAUWERS, W. J.; WILLEMSSENS, G.; BOSSCHE, H. V.; OPPERDOES, F. R. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 33, no. 2, p. 123-134, 1989.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, Boston, v. 354, no. 9185, p. 1191-1199, Oct. 1999.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M. C.; LOZADA, L. JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, México, v.27, no. 6, p. 916-920, 2004.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M. C.; ABE, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, no. 9, p. 1471-1475, Sept. 2004.

ISAIAS, D. E.; NIERO, R.; NOLDIN, V. F.; CAMPOS-BUZZI, F. YUNES, R. A.; DELLEMONACHE, F. CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological and phytochemical investigation os different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). **Pharmazie**, v. 59, no.11, p. 879-881, Nov. 2004.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliensis*: Structure of Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 66, p. 368-371, 2003.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; MUKAIANAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliensis*: Structure Elucidation of Seven New and Their Cancer Chemopreventive Activity. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 65, p. 267-272, 2002.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MIYAMOTO, Y.; RAO, K. S.; TAKAYASU, J.; OKUDA, Y.; MUKAIANAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. A New Biflavonoid from *Calophyllum paniciflorum* with antitumor-Promoting Activity. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 62, p. 1668-1671, Nov. 1999.

IWU, M. M.; JACKSON, J. E.; SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 10, no. 2, p. 65-68, 1994.

JEBBARI, H.; DAVIDSON, R. Recent advances in leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 11, no. 5, p. 535-539, Oct. 1998.

KANG, S. S.; LEE, J. Y.; CHOI, Y. K.; SONG, S. S.; KIM, J. S.; JEON, S. J.; HAN, Y. H.; SON, K. H.; HAN, B. H. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 3588-3591, 2005.

KASHMAN, Y.; GUSTAFSON, K. R.; FULLER, R. W.; CARDELLINA, J. H.; MCMAHON, J. B.; CURRENS, M. J.; BUCKHEIT, R. W.; HUGHES, S. H.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. The Calanolides, a Novel HIV-Inhibitory Class of Coumarin Derivatives from the Tropical Rainforest Tree, *Calophyllum lanigerum*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 2735-2743, 1992.

KAWAZU, K.; OHIGASHI, H.; MITSUI, T. The piscicidal constituents of *Calophyllum inophyllum* Linn. **Tetrahedron**, United Kingdom, v. 19, p. 2383-2385, 1968.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais. 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**. 5. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis:UFSC, 2003. cap.11, p. 183- 198.

LAZARDI, K.; URBINA, J. A., SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.34, p. 2097-2105.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Ed. Unicamp, 1997. p. 45-57, cap. 3.

LORENTE, S. O.; RODRIGUES, J. C. F.; JIMÉNEZ, C. J.; JOYCE-MENEKSE, M.; RODRIGUES, C.; CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; LUCA-FRANDLEY, K.; RUIZ-PÉREZ, L. M.; URBINA, J.; SOUZA, W.; PACANOWSKA, D. G.; GILBERT, I. H. Novel azasterols as potential agents for treatment of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, no. 8, p. 2937-2950, Aug. 2004.

LORENZI, H. *Calophyllum brasiliense* In: LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 352p.

MAGARACI, F.; JIMENEZ, C. J.; RODRIGUES, C.; RODRIGUES, J. C. F.; BRAGA, M. V.; YARDLEY, V.; LUCA-FRADLEY, K.; CROFT, S. L.; SOUZA, W.; RUIZ-PEREZ, L. M.; URBINA, J.; PACANOWSKA, D. G.; GILBERT, I. H. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* Species and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, p. 4714- 4727, Sep. 2003.

MARKHAM, K. R.; SHEPPARD, C.; GEIGER, H. <sup>13</sup>C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. **Phytochemistry**, Britain, v. 26, no.12, p. 3335-3337, 1987.

MATOS, F. J. A. **O Formulário Terapêutico do Professor Dias da Rocha**. UFC Edições; Fortaleza, 1997, p. 13.

MCCONVILLE, M. J.; MULLIN, K. A.; ILGOUTZ, S. C.; TEASDALE, R. D.; Secretory pathway of Trypanosomatid parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 6, no.1, p. 122-154, Mar. 2002.

MCKEE, T. C.; COVINGTON, C.D.; FULLER, R.W.; BOKESCH, H. R.; YOUNG, S.; CARDELLINA II, J. H.; KADUSHIN, M.R.; SOEJARTO, D. D.; STEVENS, P. F.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. Pyranocoumarins from Tropical Species of the Genus *Calophyllum*: A Chemotaxonomic Study of Extracts in the National Cancer Institute Collection. **Journal of Natural Products**, Ohio. v. 61, p. 1252-1256, Aug. 1998.

MCKEE, T. C.; RICHARD, W. F.; CONNI, D. C.; CARDELLINA, J. H.; GULAKOWSKI, R. J.; KREPPS, B. L.; MCMAHON, J. B.; BOYD, M. R. New Pyranocoumarins Isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. **Journal of Natural Products**. v. 59, p. 754-758, Aug. 1996.



MESÍA-VELA, S.; SÁNCHEZ, R. I.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; ALAVEZ-SOLANO, D.; TORRES-SOSA, C.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; KAUFFMAN, F. C. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: Novel inhibitors of sultransferases, SULT1A and SULT2A. **Phytomedicine**, v. 8, no. 6, p. 481-488, 2001.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998, cap.6, p. 34-40.

MOREL, C.; SÉRAPHIN, D.; TEYROUZ, A.; LARCHER, G.; BOUCHARA, J. P.; LITAUDON, M.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. New and Antifungal Xanthones from *Calophyllum caledonicum*. **Planta medica**, Stuttgart, v. 68, p. 41-44, 2002.

NIELSEN, M.; FROKJAER, S.; BRAESTRUP, C. High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors *in vitro*. **Biochemical Pharmacology**, v.37, no. 17, p. 3285-3287, 1988.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITTH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 257-266, 2004.

PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K.A.; KORTSARIS, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, p. 151-158, 1997.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; EGGLESTON, D. S.; HALTIWANGER, R. C.; BEAN, M. F.; TAYLOR, M. J. C.; BREEN, A. L.; BARTUS, H. R.; JOHNSON, R. K.; HETZBERG, R. P.; WESTLEY, J. W. The Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 36, no. 26, p. 4131-4138, Dec. 1993.

PENG SUPARP, T.; SERIT, M.; HUGHES, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M. Specific Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Mediated by Soutattrolide, a Coumarin Isolated from the Latex of *Calophyllum teysmannii*. **Journal of Natural Products**. v. 59, p. 839-842; Aug. 1996.

PRETTO, J. B.; CECHINEL-FILHO, V.; NOLDIN, V. F.; SARTORI, M. R.; ISAIAS, D. E.; CRUZ, A. B. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Journal Naturforsch**, v. 59, no. 9-10, p. 657-662, Sep-Oct. 2004.

PRISTA, L. N.; CORREIA, A. A.; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975. v. 1, 1220 p.

RADHAKRISHNAN POTTI, G.; KURUP, P. A. Antibacterial principle of the root bark of *Calophyllum inophyllum*: isolation & antibacterial activity. **Indian Journal of Experimental Biology**, Bombain, v. 8, p. 39-40, Jan. 1970.

RAVELONJATO, B.; KUNESCH, N.; POISSON, J. E. Neoflavonoids from the Stem Bark of *Calophyllum verticillatum*. **Phytochemistry**, New York. v. 26, no. 11, p. 2973-2976, 1987.

RAVELONJATO, B.; LIBOT, F.; RAMIANDRASOA, F.; KUNESCH, N.; GAYRAL, P.; POISSON, J. Molluscicidal Constituents of *Calophyllum* from Madagascar: Activity of Some Natural and Synthetic Neoflavonoids and Khellactones. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 58, p. 51-55, 1992.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, Oxford, v. 39, no. 5, p. 603-613, 2001.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. 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**. 3. ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFSC/UFRS, 2001, p. 41-62.

REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; APAN, T. R.; AMEKRAZ, B.; AUMELAS, A.; JANKOWSKI, C. K.; VÁZQUEZ-TORRES, M. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. **Life Sciences**, México, v. 75, p. 1635-1647, 2004.

REYES-CHILPA, R.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; ESTRADA-MUÑIZ. Antifungal Xanthenes from *Calophyllum brasiliense* Heartwood. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, no. 7, p. 1901-1911, 1997.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Introdução à Farmacognosia In: ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacotecnologia**. São Paulo: Ed. Premier, 1997, cap. 1, p. 1-16.

RODRIGUES, J. C. F.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, 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**, Washington, v. 46, no. 2, p. 487-499, Feb. 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.

ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Ed. Unicamp, 1997. p. 95-115, cap. 6.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUEZ, I. A.; SOARES, R. M. A. SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a Linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, no. 6, p. 1895-1901, June, 2003.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 19, no. 3, p. 195-200, 1986.

SAKAGAMI, Y.; KAJIMURA, K.; WIJESINGHE, W. M. N. M.; DHARMARATNE, H. R. W. Antibacterial Activity of Calozeyloxanthone Isolated from *Calophyllum* Species Against Vancomycin-Resistant *Enterococci* (CRE) and Synergism with Antibiotics. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 68, p. 541-543, 2002.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p.1-6, 2005.

SARTORI, N. T.; CANAPELLE, D.; DE SOUSA JR, P. T.; MARTINS, D. T. O. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliensis* Camb. Bark on experimental gastric lesions in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 67, p. 149-156, 1999.

SAVOIA, D.; ALLICE, T.; TOVO, P. A. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 92-94, 2005.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 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**. 5. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis:UFSC, 2003. cap.15, p. 371-400.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LESMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, Basel, v. 74, no. 1, p. 25-31, 2000.

SHU-GENG CAO; XIAO-HUA, W.; KENG-YEOW, S.; TAN, B. H. K.; VITTAL, J. J.; PEREIRA, J. T.; SWEE-HOCK, G. Minor Coumarins from *Calophyllum teysmannii* var. *Inophylloide* and Syntesis of Cytotoxic Calanone Derivatives. **Helvetica Chimica Acta**. v. 81, p. 1404-1416, 1998.

SHU, Y. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 61, no. 8, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, G. L.; CHAI, H.; GUPTA, M. P.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, D. A. Ccytotoxic biflavonoids ffrom *Selaginella willdenowii*. **Phytochemistry**, Britain, v. 40, no.1, p. 129-134, 1995.

SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; TEODORO, U.; LONARDONI, M. V. C.; ROBERTO, A. C. B. S.; RAMOS, M.; SOBRINHO, A. N.; ISHIKAWA, E.; SHAW, J. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4, p. 413-423, 1999.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, p. 1-44, 1998.

SOUZA, E. M.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; WILSON, W. D.; HU, Q.; BOYKIN, D. W.; BATISTA, M. M.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; SOEIRO, M. N. C. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 593-600, 2004.

STEVENS, P. F. a revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). **J. Arnold Arboretum**, v. 61, p. 117-699, 1980 apud MESÍA-VELA, S.; SÁNCHEZ, R. I.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; ALAVEZ-SOLANO, D.; TORRES-SOSA, C.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; KAUFFMAN, F. C. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: Novel inhibitors of sultransferases, SULT1A and SULT2A. **Phytomedicine**, v. 8, no. 6, p. 481-488, 2001.

STILL, W. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, Easton, v. 43, p. 2923-2924, 1978.

SUZUKI, A.; KIMIHIRO, M.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y., OHIZUMI, Y. Properties of amentoflavone, a potent caffeine-like  $\text{Ca}^{+2}$  releaser in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **European Journal of Pharmacology**, v. 372, p. 97-102, 1999.

TAKAHASHI, M.; FUCHINO, H.; SATAKE, M.; AGATSUMA, Y.; SEKITA, S. *In Vitro* screening of Leishmanicidal activity in Myanmar Timber extracts. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tsukuba, v. 27, no. 6, p. 921-925, Jun. 2004.

TAYLOR, P. B.; CULP, J. S.; DEBOUCK, C.; RANDALL, K. J.; PATIL, A. D.; WOOLF, D. J.; BROOKS, I.; HETZBERG, R. P. Kinetic and Mutational Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Inhibition by Inophyllums, a Novel Class of Non-nucleoside Inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, no. 9, p. 6325-6334, 1994.

TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, no. 1, p. 176-182, Jan. 2005.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Seletive effect of 2', 6'- dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.43, no. 5, p. 1234-1241, May, 1999.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, in press, disponível on line: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com). Acesso em 20 janeiro 2006.

VANNIER-SANTOS, M. A.; URBINA, J. A.; MARTINY, A.; NEVES, A.; SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 42, no. 4, p. 337-346, 1995.

VICHENEWSKI, W. Cromatografia por adsorção. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Ed. Unicamp, 1997. p. 59-70, cap. 4.

ZEMBOWER, D. E.; LIAO, S.; FLAVIN, M. T.; XU, Z. Q.; STUP, T. L.; BUCKHEIT, R. W.; KHILEVICH, A.; MAR, A. A.; SHEINKMAN, A. K. Structural Analogues of the Calanolide Anti-HIV Agents. Modification of the *trans*-10,11-Dimethyldihydropyran-12-ol Ring (Ring C). **Journal Medicinal Chemistry**. v. 40, p. 1005-1017, Feb. 1997.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent lincochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, no. 12, p. 2742-2748, Dec. 1995.

YAMAGUCHI, L. F.; VASSÃO, D. G.; KATO, M. J.; DI MASCIO, P.; Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potential protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2238-2247, 2005.

YASUNAKA, K.; ABE, F.; NAGAYAMA, A. OKABE, H.; LOZADA-PÉREZ, L.; LÓPEZ-VILLAFRANCO, E.; MUNIZ, E. E.; AGUILAR, A. REYES-CHILPA, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 293-299, 2005.

WAGNER, H. **Plant Drug Analysis**. New York: Springer-Verlag, 1984, p. 320.

WEBSTER, P.; RUSSEL, D. G. The flagellar pocket of tripanosomatids. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 9, no. 6, p. 201-206, 1993.

WOO, E. R.; LEE, J. Y.; CHO, I. J.; KIM, S. G.; KANG, K. W. Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in macrophages. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 539-546, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: geographical distribution**. In: WHO. Communicable Diseases Surveillance and Response. Geneva: WHO, ©2001a. Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>>. Acesso em 14 abr. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: the disease and its impact**. In: WHO. Communicable Diseases Surveillance and Response. Geneva: WHO, ©2001b. Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html>>. Acesso em 14 abr. 2003.

WRIGHT, C. W.; PHILLIPSON, J. D. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. **Phytotherapy Research**, London, v. 4, no. 4, p. 127-139, 1990.