

Nathalya Alexandre Portella

Atividade Leishmanicida de óleos comerciais de *Copaifera* spp.

Orientadora: Elvira Saraiva



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia e Imunologia).

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes
Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Portella, Nathalya Alexandre

Atividade Leishmanicida de Óleos Comerciais de *Copaifera* spp. Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG, 2010.

X, 63 f.: il.; 31 cm

Orientadora: Elvira Maria Saraiva

Dissertação: (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, 2010

Referências Bibliográficas: f. 58-63

1- óleo comercial 2- Copaíba 3- *Leishmania amazonensis* 4- Atividade leishmanicida 5- *Copaifera* spp.

I- Saraiva, Elvira II- Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de microbiologia Professor Paulo de Góes III- Atividade Leishmanicida de Óleos Comerciais de *Copaifera* spp.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, do Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, sob orientação da Profa. Elvira Maria Saraiva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as boas oportunidades que tem me proporcionado e por sempre estar iluminando e me guiando no meu caminho.

À minha querida mãe, por sempre acreditar em mim, pelo apoio e ensinamentos. Seu amor me dá forças para continuar a lutar pelos meus sonhos.

À minha querida irmã Georgiana e ao meu sobrinho Guilherme que estiveram mais perto durante esses dois anos de mestrado. A presença de vocês foi muito importante para me ajudar na realização deste trabalho.

Ao meu amor Marcelo pela infinita paciência nos momentos de ansiedade e por sempre estar disposto me ouvir.

À Professora Elvira Saraiva, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter permitido que eu fizesse parte da sua “grande família”, mesmo sem me conhecer. Serei eternamente grata a esse voto de confiança, por sua paciência e atenção.

Ao Dr. Antônio Siani e à Dra. Mônica por fornecer os óleos comerciais de copaíba e frações dos óleos e pela colaboração para realização deste trabalho.

Ao Deivid, por ter a paciência de me explicar todas as técnicas e pelo tempo dedicado às minhas dúvidas.

À todos os amigos que fiz no laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses pelos momentos de descontração e alegria.

Ao atual chefe, o Fiscal Federal Agropecuário Dr. Vital por compreender a importância da conclusão deste trabalho e pela ajuda nessa reta final.

Ao CNPq e FAPERJ pelo financiamento deste trabalho.

RESUMO

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ÓLEOS COMERCIAIS DE *COPAIFERA* SPP.

Nathalya Alexandre Portella

Orientador (a): Elvira Saraiva

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Neste trabalho investigamos a atividade leishmanicida de quatro óleos comerciais de *Copaifera* spp., chamados de C1, C2, C3 e C4, frações obtidas de C4 e a atividade de um componente isolado – β -cariofileno, usando *Leishmania amazonensis* como modelo experimental. A particularidade de nosso estudo é que testamos óleos de Copaíba quimicamente analisados a fim de correlacionar a atividade biológica com a composição química. Nossos resultados demonstraram que os óleos comerciais C2 e C3, onde diterpenos aparecem em altas proporções (59,4% e 50,2%), apresentaram melhor atividade anti-promastigota. Por outro lado, C1 e C4, ricos em sesquiterpenos (81,6% e 80,1%), principalmente em *trans*- β -cariofileno (57,5% e 29,7%), apresentam uma atividade estágio-específica e dose dependente contra amastigotas. O β -cariofileno (CAR), obtido comercialmente, também demonstrou excelente atividade dose-dependente contra os parasitos intracelulares. O IC₅₀ foi 2,9 μ g/ml, 2,3 μ g/ml e 1,3 μ g/ml, respectivamente para C1, C4 e CAR. A citotoxicidade destes componentes para as células de mamíferos foi avaliada através do método de XTT e o CC₅₀ foi de 85 μ g/ml, 92,4 μ g/ml e 63,6 μ g/ml, respectivamente. O CAR apresentou melhor índice de seletividade que os óleos comerciais C1 e C4, sendo 48,9, 29,3 e 40,1, respectivamente. Devido à maior atividade anti-amastigota de C4 e de sua menor toxicidade para as células hospedeiras, este óleo foi separado em fração rica em diterpenos (volátil) e fração rica em sesquiterpenos (não-volátil). Nossos resultados demonstraram que as frações foram menos ativas contra *L. amazonensis* e mais tóxicas para os macrófagos que o óleo comercial C4. A atividade anti-*Leishmania* dos óleos C1 e C4, assim como as frações de C4 e o cariofileno parece ser independente da ativação dos macrófagos, já que são incapazes de modular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratados. Nossos resultados apontam C4 como o óleo comercial com perfil químico potencial para futuro desenvolvimento de terapia contra as leishmanioses, assim como, o uso do sesquiterpeno cariofileno. Estes resultados fornecem novas perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos com atividade leishmanicida obtidos de produtos naturais.

Palavras chave: óleo comercial, *Copaifera* spp., Copaíba, *Leishmania amazonensis*, atividade leishmanicida, fração volátil, fração não volátil, *trans*- β -cariofileno.

ABSTRACT

LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF *COPAIFERA* SPP. COMMERCIAL OILS

Nathalya Alexandre Portella
Orientador (a): Elvira Saraiva

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

In this work we investigated the leishmanicidal activity of four commercial oils from *Copaifera* spp., named as C1, C2, C3 and C4, fractions obtained from C4 and the activity of an isolated compound – β -caryophyllene, using *Leishmania amazonensis* as experimental model. The uniqueness of our study is that we tested *Copaiba* oils chemically analyzed, aiming to correlate biological activity with chemical composition. Our results demonstrated that the commercial oils C2 and C3, where diterpenes appear in higher proportion (59.4% and 50.2%), have better anti-promastigote activity. On the other hand, C1 and C4, rich in sesquiterpenes (81.6% and 80.1%), specially β -caryophyllene (57.5% and 29.7%), present a stage-specific, and dose-dependent activity against the amastigotes. The isolated compound β -caryophyllene (CAR), commercially obtained, also demonstrated an excellent dose-dependent activity against intracellular parasites. The IC₅₀ was 2.9 μ g/ml, 2.3 μ g/ml and 1.3 μ g/ml, respectively for C1, C4 and CAR. The cytotoxicity of these compounds for mammalian cells was evaluated using XTT assay and the CC₅₀ was 85 μ g/ml, 92.4 μ g/ml and 63.6 μ g/ml, respectively. The selectivity index was 48.8, 40.1 and 29.3 for CAR, C4 and C1, respectively. Since C4 presented higher anti-amastigote activity and low toxicity to the host cells, it was fractionated in diterpenes rich (volatile) and sesquiterpenes rich (non-volatile) fractions for further tests. Our results demonstrated that the fractions were less active against *L. amazonensis* and more toxic for the macrophages than C4 oil. The anti-*Leishmania* activity of C3, C4 oils, as well as C4 fractions and caryophyllene appear to be independent of macrophage activation, since they were unable to modulate nitric oxide production by this cell. Our study point C4 as a commercial oil with potential chemical profile for further development for leishmaniasis therapy, as well as, the sesquiterpene caryophyllene. These results provide new perspectives on the development of novel drugs with leishmanicidal activity obtained from natural products.

Key words: commercial oil, *Copaiba*, *Copaifera* spp., *Leishmania amazonensis*, leishmanicidal activity, non volatile fraction, volatile fraction, *trans*- β -caryophyllene

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AmB: Anfotericina B
CAR: Cariófileno
CC₅₀: concentração citotóxica para 50% dos macrófagos
CTRL: controle
IC₅₀: concentração inibitória para 50% dos parasitas
DMSO: dimetilsulfóxido
FNV: fração não volátil
FV: fração volátil
IL-4: interleucina -4
IL-10: interleucina -10
IL-12: interleucina -12
IS: índice de seletividade
iNOs: óxido nítrico sintase induzida
IFN- γ : interferon gama
LCD: Leishmaniose cutânea difusa
LCL: Leishmaniose cutânea localizada
LMC: Leishmaniose mucocutânea
LmACR2: antimoniatu redutase 2 de *L. major*
LV: Leishmaniose visceral
MP: matriz peritrófica
MPRA: *multidrug-resistance protein A*
NO: óxido nítrico
OE: óleo essencial
OMS: Organização Mundial de Saúde
PNPMF: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PMS: Phenazine metho-sulfato
SbIII: antimoniais trivalentes
SbV: antimoniais pentavalentes
SFB: soro fetal bovino
TDR1: redutase dependente de tiol -1
TNF- α : fator de necrose tumoral - α
TGF- β : fator de transformação e crescimento- β

ÍNDICE

1– INTRODUÇÃO	10
1.1 – Leishmaniose: Taxonomia, Morfologia e Epidemiologia	10
1.2 – Ciclo de Vida	11
1.3 – Formas Clínicas da Doença	13
1.4 - Resposta Imune e a produção de óxido nítrico contra Leishmaniose	15
1.5 – Tratamento	16
1.5.1 – Antimoniais Pentavalentes	16
1.5.2 – Anfotericina B	18
1.5.3 – Pentamidina	20
1.5.4 – Paramomicina	21
1.5.5 – Miltefosina	21
1.5.6 – Sitamaquina	23
1.6 – Produtos Naturais	23
1.7 – Copaíba	27
2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	29
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 – Parasitas	30
3.2 – Obtenção dos óleos de <i>Copaífera</i> sp.	30
3.3 – Obtenção de macrófagos	34
3.4 – Atividade anti-promastigota	34
3.5 – Atividade anti-amastigota	34
3.6 – Citotoxicidade para macrófagos murinos	35
3.7 – Produção de óxido nítrico	36
3.8 – Capacidade de sequestrar óxido nítrico	36
3.9 – Análise estatística	36
4 – Resultados	37
4.1 – Óleos comerciais de copaíba	37
4.1.1 – Atividade anti-promastigota dos óleos comerciais de copaíba	37
4.1.2 – Atividade anti amastigota dos óleos comerciais de copaíba	38

4.1.3 – Produção de óxido nítrico	39
4.1.4 – Citotoxicidade para a célula hospedeira (ensaio com azul de Trypan):	40
4.1.5 – Citotoxicidades para a célula hospedeira (método de XTT)	41
4.2 – Frações do óleo comercial de Copaíba C4	43
4.2.1 – Atividade anti-promastigota das frações do óleo comercial C4	44
4.2.2 – Atividade anti-amastigota das frações do óleo comercial C4:	44
4.2.3 – Citotoxicidade das frações do óleo C4 para a célula hospedeira	45
4.2.4 – Produção de óxido nítrico	47
5 – Discussão	50
6 – Conclusões	55
7 – Referências Bibliográficas	56

1. Introdução

1.1 Leishmaniose: Taxonomia, Morfologia e Epidemiologia

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários que pertencem a Ordem Kinetoplastidae, a família Trypanosomatidae e são divididos em dois subgêneros (Fig.1): *Leishmania* subdividido em cinco complexos com espécies responsáveis por causar leishmaniose cutânea e visceral, e o complexo *Viannia*, formado por três complexos cujas espécies são capazes de provocar leishmaniose cutânea e mucocutânea (Mishra *et al.*, 2009).

As leishmanioses são zoonoses que permanecem como um severo problema em saúde pública, apresentando-se endêmicas em 88 países, atingindo principalmente regiões tropicais e subtropicais (Fig. 2). Esta doença afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e estima-se uma incidência anual de 1.5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral (Desjeux, 2004).

No Brasil, segundo os dados do Ministério da Saúde, a leishmaniose tegumentar atinge de 30 a 35 mil pessoas todos os anos e cerca de 3 mil casos de leishmaniose visceral são registrados anualmente por estabelecimentos médicos, em 19 Estados, apresentando maior prevalência no Maranhão, Tocantins, Piauí e Mato Grosso (www.saude.gov.br).

Doenças negligenciadas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam um forte entrave para o desenvolvimento do país. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de um milhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas no mundo. Como exemplo de doenças negligenciadas podemos citar: dengue, doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, tuberculose, esquistossomose, entre outras (Decit- Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde, 2010). No Brasil, os incentivos governamentais para pesquisas e desenvolvimento em doenças negligenciadas são crescentes, com investimentos em torno de 75 milhões por ano. O Brasil encontra-se no sexto lugar no ranking dos países que mais investem nesse seguimento

(www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao_em_pauta_6_doencas_negl.pdf). Embora exista financiamento em pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, novos métodos diagnósticos e novas vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atendida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (Decit- Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde, 2010).

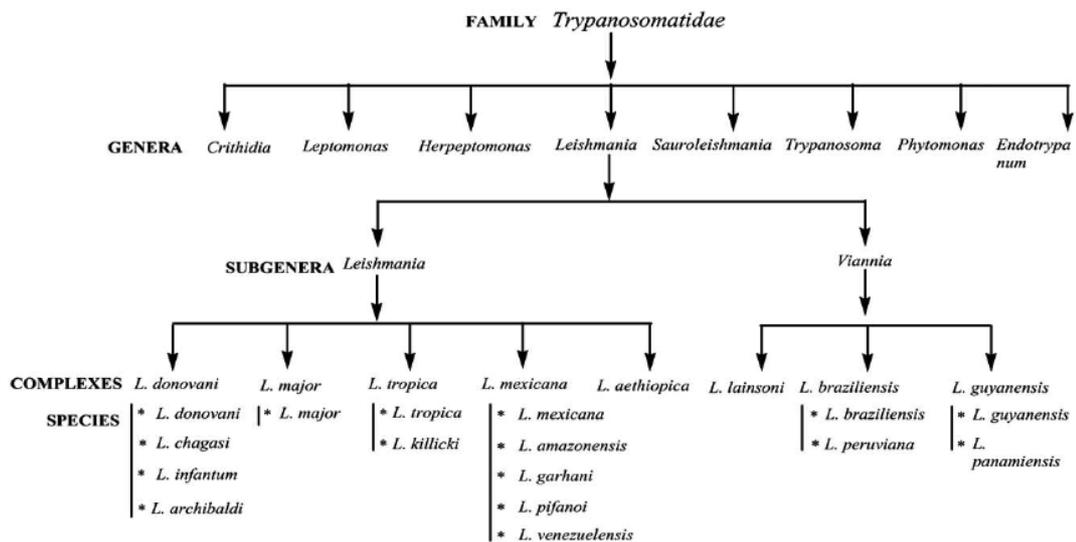


FIG.1: Classificação Taxonômica de *Leishmania* (Mishra *et al.*, 2009).

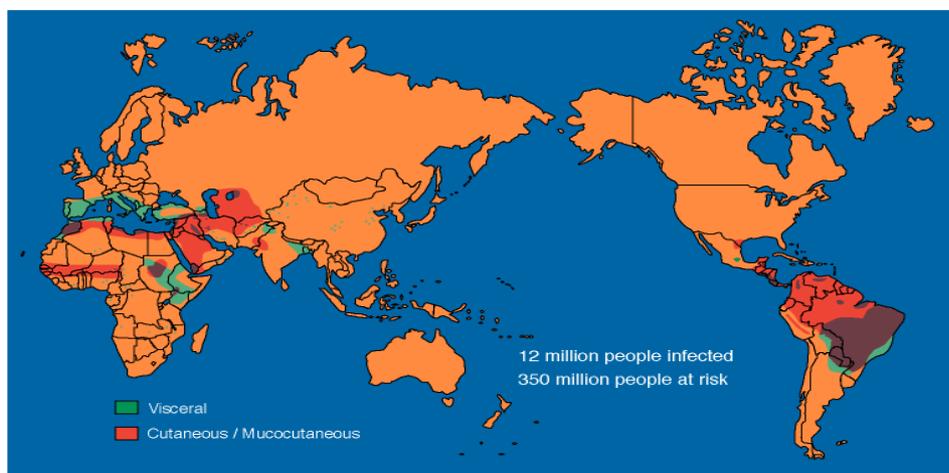


FIG 2: Distribuição mundial da leishmaniose cutânea (verde) e visceral (vermelha). Vannier-Santos *et al.*, 2002.

1.2 Ciclo de Vida

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida heteroxênico, necessitando de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado para completar seu ciclo de vida. A *Leishmania* pode se apresentar dois estágios de desenvolvimento distintos: promastigota, a qual apresenta um flagelo móvel e vive extracelularmente no trato alimentar do inseto vetor, e amastigota, que é a forma sem flagelo livre que vive intracelularmente nos fagolisossomas dos macrófagos de mamíferos. O protozoário é inoculado por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomyia* no Novo Mundo (Saha *et al.*, 2006, Mishra *et al.*, 2009).

A infecção é iniciada quando os flebótomos ingerem sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas, que é rapidamente envolvido pela matriz peritrófica (MP), estrutura formada por proteínas e quitina secretada por células do epitélio intestinal. Os amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicos, os quais se multiplicam e através de sua secreção de quitinase alcançam o epitélio intestinal onde se aderem através do flagelo e do lipofosfoglicano de superfície, o que impede sua expulsão quando os restos de sangue digerido são eliminados (Bates, 2007). A etapa de adesão ao epitélio é fundamental para a colonização do inseto vetor e para a posterior transmissão do parasito (Pimenta *et al.*, 1992; Beates & Rogers, 2004).

Os procíclicos se diferenciam em metacíclicos à medida que migram em direção a probóscide do inseto vetor. Ao serem inoculadas no mamífero, as formas metacíclicas se ligam às células do sistema fagocítico mononuclear, sendo endocitadas e no interior do fagolisossoma dessas células se transformam em amastigotas (Chang & Fong, 1983). Os amastigotas proliferam, causando a ruptura de macrófagos e sua liberação no meio extracelular, onde infectam macrófagos vizinhos. Ao realizar o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, o inseto vetor ingere fagócitos contendo a forma amastigota, reiniciando o ciclo de vida (Rasmusson & Descoteaux, 2004).

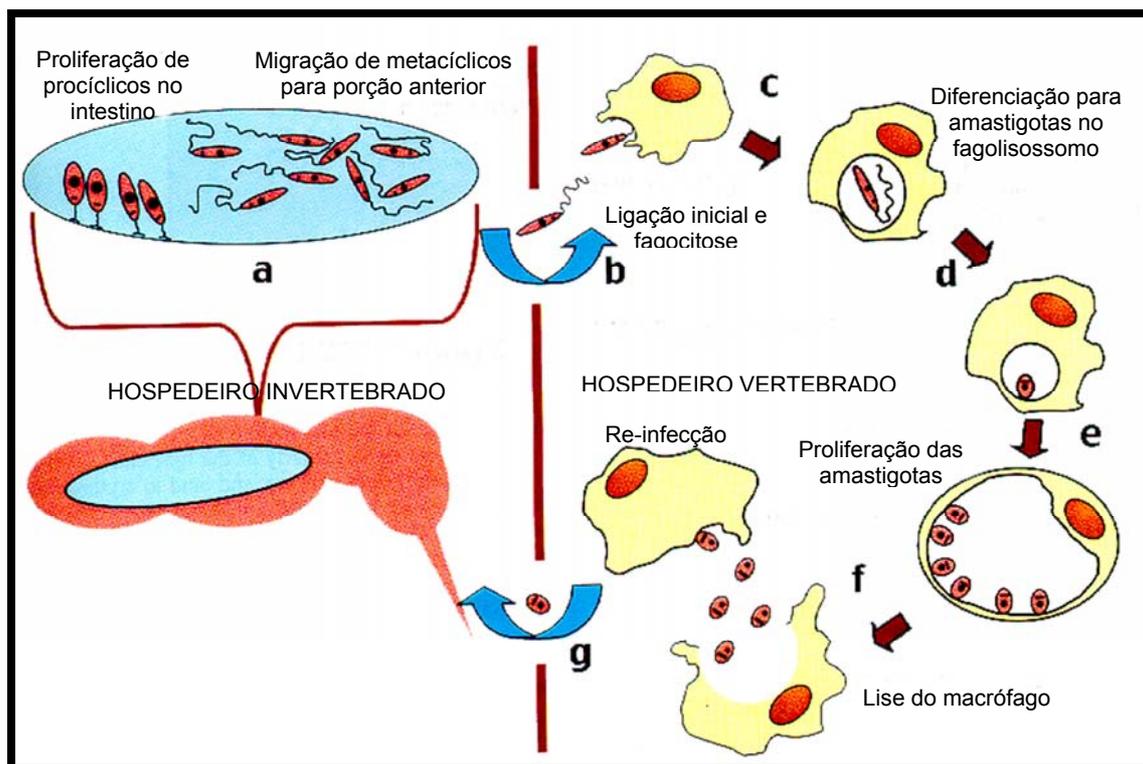


FIG. 3: Ciclo de vida da *Leishmania* (Vannier-Santos *et al.*, 2002).

1.3 Formas clínicas da doença

Em humanos, a doença pode apresentar quatro tipos de manifestações clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose muco-cutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (Desjeux, 2004; Reithinger *et al.*, 2007).

Leishmaniose visceral ou Kala-azar é causada por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no Velho Mundo e por *Leishmania chagasi* no Novo Mundo (Guerin *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008), e é a forma mais severa e fatal se não tratada (Desjeux, 2004). O nome Kala-azar foi originado na Índia, significando “febre-negra”, que se refere à hiperpigmentação da pele durante o curso da doença. Alternativamente, o termo pode ser derivado da palavra “Kal” significando “morte”, demonstrando a fatalidade da doença (Saha *et al.*, 2006). A Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar (PKDL) é uma dermatose que freqüentemente ocorre após a leishmaniose visceral causada por *L. donovani* e é caracterizada por erupções maculopapular e nodular. Inicia-se ao redor da boca, se espalhando por todo o corpo (Das *et al.*, 2009).

Os agentes da LV afetam principalmente o fígado e o baço, determinando hepatoesplenomegalia, e conseqüentemente perda de função dos órgãos afetados (Santos *et al*, 2008 a), além de causar outras alterações severas como febre, tosse, dor abdominal, diarreia, epistaxe, caquexia e pancitopenia (Roberts, Handman, Foote, 2001; Guerin *et al.*, 2002).

A leishmaniose cutânea é causada por membros dos complexos *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* no Velho Mundo e por membros dos complexos *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* e *L. mexicana* no Novo Mundo (Berman, 1997; Reithinger *et al.*, 2007). Esta forma é caracterizada pelo aparecimento de lesões únicas ou múltiplas, ulceradas ou não, em áreas do corpo expostas à picada do flebotomíneo, podendo apresentar ou não cura espontânea.

Leishmania amazonensis e *L. mexicana* nas Américas e *L. aethiopica* no Velho Mundo podem causar uma forma extremamente grave da doença que é a leishmaniose cutânea difusa (LCD). LCD se caracteriza pela formação de lesões difusas não ulceradas, contendo grande número de amastigotas. A multiplicidade das lesões é devido à metástase de parasitos de um sítio para outro através de migração de macrófagos infectados. A LCD está estreitamente associada a uma deficiência imunológica do paciente e caracteriza-se por um curso crônico e progressivo, não respondendo aos tratamentos convencionais (Neves *et al.*, 2005).

A leishmaniose muco-cutânea (LMC), também conhecida como espúndia, poder ser causada por *L. panamensis*, porém é mais frequentemente associada com *L. braziliensis*, ficando geralmente limitada a América do Sul (Berman, 2003). Esta forma da doença é caracterizada pela metástase do parasito para mucosas por via linfática ou hematogênica. A doença tipicamente começa com inflamação e edema nasal, seguido pela ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo. Em alguns casos, lábios, bochechas, palato mole, faringe ou laringe também são envolvidos. LMC nunca cura espontaneamente, é muito difícil de tratar e a associação com infecções bacterianas secundárias podem agravar o quadro, o que é potencialmente fatal (Reithinger *et al.*, 2007).

1.4 Resposta Imune e a produção de óxido nítrico na Leishmaniose

O resultado da infecção por *Leishmania* depende não somente da espécie que inicia a doença, mas também da competência imunológica para combater o crescimento do parasito e, principalmente, da predisposição genética do indivíduo (Alexander, Stoskar & Russell, 1999).

Estudos experimentais em modelos murinos de leishmaniose cutânea causada por *L. major* estabeleceram uma clara dicotomia entre a proteção mediada por uma resposta Th1, e a susceptibilidade à doença mediada por resposta Th2 (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Assim, camundongos C57BL/6, C3H e CBA, desenvolvem uma doença cutânea auto-limitante quando infectados por *L. major*. Nesses animais interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) desempenham um importante papel na cura da infecção (Awasthi, Mathur & Saha, 2004). Macrófagos ativados por estas citocinas têm sua produção de óxido nítrico (NO) estimulada, e este é um importante mediador capaz de matar os parasitos intracelulares (Liew, Wei & Proudfoot, 1997). O TNF- α tem uma ação sinérgica com o IFN- γ , aumentando a transcrição da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e, conseqüentemente, a produção de NO (Awasthi *et al.*, 2004).

Em contraste, camundongos susceptíveis, em particular BALB/c, desenvolvem uma resposta imune do tipo Th2, que é caracterizada pela produção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação e crescimento- β (TGF- β) (Tripathi, Singh & Naik, 2007). O efeito do TGF- β se baseia na sua habilidade em suprimir as funções efetoras das células NK e dos macrófagos, inibindo a produção de NO e superóxido. Já a IL-10 inibe a atividade leishmanicida de macrófagos estimulados por IFN- γ /TNF- α por inibir a expressão de iNOS e, conseqüentemente, inibir a produção de NO. Além disso, macrófagos ativados por IL-10, IL-4 e TGF- β apresentam um aumento da expressão de arginase1, enzima responsável por converter arginina em putrescinas que favorecem o crescimento intracelular do parasito. Desta forma, arginase 1 pode limitar a disponibilidade de arginina para a iNOS, reduzindo a produção de NO pelos macrófagos, favorecendo ainda mais a sobrevivência da *Leishmania* (Liu, *et al.*, 2005).

Óxido nítrico é uma importante molécula efetora contra parasitos intracelulares como *Leishmania*, e embora não seja o único mecanismo de controle na

leishmaniose, é um importante marcador para o estudo da polarização imune (Liew *et al.*, 1997).

1.5 Tratamentos

No Brasil, os fármacos de primeira escolha utilizados para o tratamento das leishmanioses ainda são os antimoniais pentavalentes, principalmente nas formas estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e como medicamentos de segunda escolha são usados a anfotericina B e a pentamidina. Entretanto, tais medicamentos apresentam alguns problemas, incluindo alto custo, alta toxicidade, indução de diversos efeitos colaterais, o que leva o paciente a se afastar do tratamento e favorece a emergência de cepas resistentes. Além disso, os medicamentos disponíveis são de administração parenteral, exigindo, em muitos casos, a internação e colaboração do paciente (Berman 2003; Santos *et al.*, 2008a).

1.5.1 Antimoniais Pentavalentes

O tratamento da leishmaniose foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Viana, em 1912, com o uso do antimonial tártaro emético (antimonial trivalente, Sb III), sendo a única arma terapêutica contra a doença durante muitos anos (Neves *et al.*, 2005). Pelo fato da formulação trivalente apresentar grande toxicidade e ser de difícil administração, em 1937 surge o primeiro agente antimonial pentavalente, o estibugluconato de sódio - SbV - (Pentostam[®]), obtendo redução dos efeitos colaterais e da toxicidade em comparação com a forma trivalente (Guerin *et al.*, 2002). Em 1945, outro antimonial pentavalente foi desenvolvido, o N-metil-glucamina (Glucantime[®]). Estes dois compostos se tornaram os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses e são utilizados até hoje (Amato *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi completamente determinado, mas é postulado que este medicamento interfere na atividade bioenergética do parasita, levando-o a morte (Amato *et al.*, 2008). Para ser ativo contra *Leishmania*, SbV tem que entrar na célula hospedeira, atravessar a membrana fagolisossomal e atuar contra os amastigotas intracelulares. Tem sido sugerido que a forma SbV seja um pré-composto que precisa ser convertido para a

sua forma trivalente (SbIII) para se tornar ativo (Oullette *et al.*, 2004). Contudo, detalhes sobre o sítio (macrófago ou amastigota) e o exato mecanismo de redução (enzimático ou não) permanecem não esclarecidos (Ashutosh *et al.*, 2007).

Denton e colaboradores (2004) descreveram que uma enzima específica do parasito denominada redutase dependente de thiol-1 (TDR1), a qual possui domínios similares a Ω -glutathion transferase, seria responsável pela conversão do antimonial pentavalente em antimonial trivalente, usando glutathion como redutor. Também foi demonstrado que a enzima antimoniato redutase 2 (LmACR2) de *L. major*, homóloga a enzima arsenato redutase presente em *Saccharomyces cerevisiae*, é capaz de catalisar a redução de SbV em SbIII, aumentando a sensibilidade dos parasitos a este composto (Ashutosh, Sundar & Goyal, 2007). Outro mecanismo possível é a conversão não enzimática, onde thiois específicos do macrófago, como a glicilcisteína, e da *Leishmania*, como a tripanotona, podem reduzir SbV em SbIII (Ferreira *et al.*, 2003).

Os antimoniais parecem interferir com a produção de energia em amastigotas de *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise como a β -oxidação de ácidos graxos, reduzindo os níveis de ATP e GTP, comprometendo assim a viabilidade da célula (Tracy & Webster Jr., 1996; Croft *et al.*, 2006). Também foi demonstrada a ocorrência de apoptose em amastigotas tratados com SbIII, envolvendo fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (Serenó *et al.*, 2001).

O surgimento de cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes é um sério problema que vem limitando o uso desse medicamento no tratamento das leishmanioses. Em linhagens resistentes aos antimoniais, o nível de tripanotona está freqüentemente aumentado e, conseqüentemente há um aumento da sua conjugação ao metal. O conjugado pode ser seqüestrado para dentro de uma organela através da ação da MRPA (*multidrug-resistance protein A*), uma proteína transportadora pertencente a família de transportadores ABC, ou ser expulso da célula através de um sistema de efluxo, possivelmente pela participação de outro transportador ABC (Oullette *et al.*, 2004).

A dose de antimoniais pentavalentes recomendada pela OMS para o tratamento de leishmaniose cutânea é de 20mg/Kg/dia durante 20 dias e para o tratamento de leishmaniose visceral é indicada a mesma dose, porém por 28 dias,

ambas por via intramuscular ou parenteral (Berman, 2003; Reithinger *et al.*, 2007). Este fármaco é distribuído em altas concentrações no plasma, fígado e baço, sendo biotransformado para seu estado trivalente no fígado. Sua meia-vida plasmática é de 2 horas com rápida taxa de absorção e excreção através da urina, sendo que cerca de 50% da dose administrada é excretada dentro de 24 horas (Mishra, Saxena & Singh, 2007).

Os antimoniais apresentam algumas desvantagens que limitam seu uso, tais como: necessidade de permanência do paciente no hospital por 3 a 4 semanas para administração parenteral ou intramuscular; efeitos tóxicos como artralgia, náusea, dor abdominal, pancreatite química e cardiotoxicidade com possibilidade de arritmia fatal, alto custo, bem como recorrência após tratamento inadequado e emergência de parasitas resistentes (Guerin *et al.*, 2002).

A administração parenteral limita o tratamento com antimoniais pentavalentes e, por esta razão, estudos têm sido realizados na busca de alternativas para a solução deste problema. Demicheli e colaboradores (2004) demonstraram que a associação do antimoniato meglumina com β -ciclodextrina, um oligossacarídeo compostos de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, aumenta bastante a absorção do antimonial pela via oral em relação ao antimoniato administrado sozinho. Além disso, a concentração do antimoniato meglumina no plasma aumenta em três vezes quando este se encontra complexado com a β -ciclodextrina e apresenta eficácia semelhante ao antimoniato meglumina administrado por via intraperitoneal, tanto no que se refere a controle do crescimento da lesão quanto no controle da carga parasitária, porém usando apenas a metade da dose de antimonial.

1.5.2 Anfotericina B

Anfotericina B (AmB) é um agente antibiótico poliênico descoberto em 1956, originalmente produzido por certas cepas de *Streptomyces nodosus*, um actinomiceto obtido do solo do Rio Orinoco na Venezuela (Singh & Sivakumar, 2004; Mishra, Saxena & Singh, 2007), e vem sendo usado como droga de segunda escolha no tratamento da leishmaniose desde 1960 (Croft, Sundar & Fairlamb, 2006). Contudo, tal medicamento apresenta sérios problemas como toxicidade e necessidade de administração parenteral, limitando sua utilização. Sua baixa

absorção (<5%) impede sua administração por via oral; somente a infusão intravenosa atinge a concentração terapêutica no sangue. Além disso, mais de 95% da AmB se liga a proteínas do soro e, nos tecidos, tendendo a se concentrar principalmente no fígado, baço, pulmões e rins, o que limita a sua eficiência (Minodier *et al.*, 2003).

Anfotericina B apresenta diversos efeitos colaterais e tóxicos, tais como febre e calafrios, diminuição do hematócrito e nefrotoxicidade reversível. Toxicidades pulmonares e neurológicas também vêm sendo relatadas (Minodier *et al.*, 2003; Singh & Sivakumar, 2004).

O mecanismo de ação da Anfotericina B se baseia na sua ligação a esteróis 24 metilados, entre eles o episterol e o ergosterol na membrana do parasito, causando a formação de canais iônicos na membrana que permitem a perda de íons, resultando em disfunção e por fim lise celular (Mbongo *et al.*, 1998; Minodier *et al.*, 2003; Mishra, Saxena & Singh, 2007).

O mecanismo de resistência a anfotericina B baseia-se na substituição do ergosterol por seus precursores como colest-5,7,24-trien-3 β -ol, pelo qual a droga apresenta baixa afinidade, resultando em diminuição da ligação da AmB a esses esteróis modificados de membrana (Oullette *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que a administração intravenosa de 1mg/kg/dia de AmB durante 20 dias foi capaz de curar 99% dos pacientes infectados com *L. donovani*, sendo, por isso, um composto mais eficaz que os antimoniais, os quais necessitam de uma dose muito maior para apresentar a mesma taxa de cura (Minodier *et al.*, 2003; Singh & Sivakumar, 2004).

A anfotericina B deoxicolato tem sido substituída por formulações lipídicas pelo fato destas apresentarem maior eficácia e menor toxicidade (Minodier *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2007). Essas formulações incluem AmBiosome[®] (anfotericina lipossomal), Abecelt[®] (anfotericina incorporada em um complexo lipídico) e Amphocil[®] (anfotericina em dispersão coloidal). Estudos das várias formulações lipídicas de anfotericina B comprovam seu excelente potencial leishmanicida para o tratamento das leishmanioses (2mg/Kg/dia por 5 dias, com 96% de cura), mas apresenta um obstáculo frustrante que é o alto custo (50mg = US\$160 - 175) destes fármacos (Mishra *et al.*, 2007).

Estudo de associação da anfotericina B com miltefosina para tratamento de leishmaniose foi realizado por Ménez e colaboradores (2006), demonstraram que a co-administração de altas concentrações de Amb resulta em redução da permeabilidade paracelular induzida pela miltefosina. Portanto, co-administração de AmB e miltefosina resulta em um antagonismo farmacocinético. Porém a combinação não foi capaz de causar antagonismo ou sinergismo em suas atividades leishmanicidas.

1.5.3 Pentamidina

Pentamidina, uma diamidina aromática sintetizada no final de 1930 e originalmente usada no tratamento da tripanossomíase africana, vem sendo utilizada como alternativa para o tratamento da leishmaniose desde 1939 (Basselin *et al.*, 2002, Mishra *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que a pentamidina atua em ambas as formas, amastigota e promastigota da *Leishmania*, via processo mediado por transportadores de arginina ou poliaminas (Basselin *et al.*, 2002) e interfere na síntese de DNA do protozoário. Há ainda relatos de alterações na morfologia do cinetoplasto e fragmentação da membrana mitocondrial, levando o parasita à morte (Amato *et al.*, 2008). Foi também demonstrado que a mitocôndria de *Leishmania* spp. é um importante alvo para medicamentos catiônicos lipofílicos como a pentamidina (Verseci & Do Campo, 1992). Neste trabalho, os autores demonstram que a pentamidina é capaz de ser concentrada dentro da mitocôndria afetando as membranas mitocondriais, e causando alterações na fosforilação oxidativa nesses parasitos.

O regime de tratamento consiste de 4mg/kg três vezes por semana, por 3 a 4 semanas (10-12 injeções) (Mishra, Saxena & Singh, 2007; Singh & Sivakumar, 2004). A pentamidina causa diversos efeitos colaterais, sendo que os mais comuns são náusea e vômito, dor de cabeça, hipoglicemia, hipotensão durante a infusão da droga, síncope, aumento nos níveis da uréia e creatinina, diabetes, leucopenia, pancreatite e alterações eletrocardiográficas na onda T e no segmento ST. Seu uso é contra indicado durante a gravidez, para pacientes diabéticos e em casos de falha renal, hepática ou cardíaca (Amato *et al.*, 2008).

Outro fator que vem prejudicando o uso da pentamidina no tratamento da leishmaniose é o surgimento de cepas resistentes, o que já foi descrito em *L. donovani*, bem como para outras espécies de *Leishmania* (Basselin *et al.*, 2002). Em parasitas resistentes foi observado que devido à mudança no potencial de membrana mitocondrial, a pentamidina não entra na mitocôndria, permanecendo no citoplasma (Basselin *et al.*, 2002). Essa fração citoplasmática é expulsa da célula através de um transportador da família ABC, sendo o transportador PRP1 um possível candidato (Oullette *et al.*, 2004).

1.5.4 Paramomicina

Paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo usado originalmente para o tratamento de infecções bacterianas (Mishra *et al.*, 2007), que também possui ampla atividade antiparasitária não compartilhada por outros aminoglicosídeos (Singh & Sivakumar, 2004). Esse antibiótico vem sendo usado extensivamente no tratamento da leishmaniose cutânea, mas tem apresentado uso limitado no tratamento da forma visceral da doença (Croft *et al.*, 2006). A paramomicina é efetiva e tão bem tolerada quanto a anfotericina B, mas precisa ser administrada parenteralmente (Guerin *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação desse medicamento se baseia na perturbação da síntese macromolecular e na alteração das propriedades de membrana da *Leishmania* (Mishra, Saxena & Singh, 2007). Análise por citometria de fluxo revelou que a paramomicina induz desestabilização da membrana por estimular a reciclagem de lipídeos catabolizados, assim como a síntese de lipídeos polares na membrana e conseqüentemente resultando em permeabilidade de membrana e rigidificação (Mishra, Saxena & Singh, 2007). Apresenta toxicidade potencial para os rins e para o oitavo nervo cranial (Singh & Sivakumar, 2004).

A combinação de paramomicina com estibogluconato tem sido usada como terapia para as síndromes mais graves de doença cutânea difusa (Singh & Sivakumar, 2004).

1.5.5 Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), originalmente desenvolvida como um agente contra o câncer teve sua atividade leishmanicida demonstrada, tanto *in vitro*

quanto *in vivo*, sendo o primeiro composto aprovado para o tratamento oral contra leishmaniose visceral e, mais recentemente, para o tratamento da forma cutânea da doença (Croft, Snowdon & Yardley, 1996; Croft & Engel, 2006).

O regime de tratamento recomendado para miltefosina é de 2,5mg/kg/dia (Mishra *et al.*, 2007), preferencialmente dividida em duas doses ou uma única dose durante 28 dias (Palumbo, 2008).

Paris e colaboradores (2004) demonstraram que miltefosina induz em promastigotas de *L. donovani* morte celular semelhante a apoptose, com sinais característicos como diminuição do tamanho celular, degradação internucleossomal do DNA cromossômico e exposição de fosfatidilserina com preservação da integridade da membrana plasmática. Efeito inibitório na biossíntese de fosfatidilcolina também foi demonstrado para miltefosina (Lira *et al.*, 2001).

Wadhone e colaboradores (2009) demonstraram recentemente a importância do IFN- γ endógeno para a atividade leishmanicida da miltefosina em modelo de infecção por *L. donovani*. O estudo apresentou uma falha no tratamento com miltefosina em camundongos cujos macrófagos eram deficientes de IFN- γ ou quando os animais eram tratados com anti-IFN- γ . Miltefosina é capaz de promover a expressão de iNOs pelos macrófagos por promover a expressão de IL-12, IFN- γ e de seu receptor. Esses dados sugerem que a miltefosina age diretamente sobre o parasita e também pode agir indiretamente por potencializar os efeitos microbicidas dos macrófagos.

Esse composto comumente induz anorexia, náusea, vômito e diarreia. Contudo essas reações duram apenas um curto espaço de tempo e freqüentemente resolvem com a continuidade do tratamento (Murray, 2004). Algumas advertências sobre a miltefosina precisam ser mencionadas, tais como sua capacidade teratogênica, não podendo ser usada em mulheres grávidas e em mulheres em idade fértil a menos que contracepção seja realizada durante e até dois meses após o tratamento (Murray, 2004). Outro problema é seu potencial para desenvolvimento de resistência. Em laboratório, resistência a miltefosina pode ser gerada rapidamente nas formas em cultura. Um tratamento por 4 semanas pode deixar níveis sub-terapêuticos no sangue por algumas semanas pós-terapia, uma característica que pode propiciar o desenvolvimento de resistência (Berman *et al.*, 2006)

1.5.6 Sitamaquina

Sitamaquina (WR6026) é uma 8-aminoquinolina ativa por via oral, a qual foi originalmente usada para o tratamento da malária (Singh & Sivakumar, 2004; Guerin *et al.*, 2002), e tem se apresentado ativa contra *L. major*, *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. donovani* (Mishra, Saxena & Singh, 2007). Porém, seu desenvolvimento tem sido lento e pouco se sabe sobre sua eficácia e toxicidade (Mishra, Saxena & Singh, 2007).

Estudos realizados por Dueñas-Romero e colaboradores (2007) mostraram que a sitamaquina é capaz de causar uma redução de 60% no número de parasitos após um período de incubação de 6 horas e que provavelmente esse efeito ocorre devido à lise do parasita ao invés de inibição do crescimento. Além disso, os parasitas passaram a apresentar uma morfologia arredondada com motilidade reduzida. O mesmo grupo ainda descreveu que a ação da sitamaquina é irreversível já que a inibição da multiplicação do parasita persistiu mesmo em meio livre do composto.

1.6 Produtos Naturais

Plantas e seus extratos vêm sendo usados por muitos séculos no tratamento de diversas patologias, incluindo as infecções parasitárias, mas somente nos últimos trinta anos pesquisadores começaram a avaliar a efetividade e o modo de ação de produtos naturais. Menos de 10% das aproximadamente 250.000 espécies de plantas da flora mundial tem sido cientificamente investigadas quanto as suas propriedades farmacológicas, embora quase 25% dos compostos ativos dos medicamentos prescritos nos Estados Unidos e Inglaterra tenham sido isolados de plantas (Anthony, Fyfe & Smith, 2005).

A ausência de um medicamento efetivo para o tratamento das leishmanioses tem influenciado as pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes com melhor atividade leishmanicida, menor toxicidade e baixo custo (Iwu *et al.*, 1994). A avaliação científica de plantas medicinais tem provido a medicina moderna com agentes farmacêuticos eficazes para o tratamento de doenças causadas por protozoários (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001).

Estudos têm mostrado que vários óleos essenciais apresentam ação inibitória contra diversos parasitas humanos (Anthony *et al.*, 2005). Óleos essenciais (OEs) são misturas de diferentes compostos aromáticos voláteis, geralmente extraídos de plantas por arraste de vapor ou hidro-destilação (Oliveira *et al.*, 2008). São matérias-primas naturais profusamente empregadas na produção de fragrâncias para os setores de perfumaria, cosmética e higiene pessoal, bem como na aromatização de alimentos e bebidas (Santos *et al.*, 2006). Estes óleos essenciais são ricos em enxofre orgânico, aldeídos alcoóis e terpenos, sendo que esses últimos podem ocorrer na forma de triterpenos, diterpenos, tetraterpenos, bem como sesquiterpenos e hemiterpenos (Cowan, 1999)

Rosa e colaboradores (2003) estudaram a atividade leishmanicida de óleo essencial de *Croton cajucara* rico em Linalool e verificaram que esse álcool terpênico foi capaz de inibir o crescimento de promastigotas e amastigotas, sem, no entanto, apresentar toxicidade para a célula hospedeira. Essa atividade anti-leishmania deve-se a ação direta na forma promastigota, onde o composto foi capaz de causar rompimento da membrana flagelar, dilatação mitocondrial e desorganização da cromatina do núcleo do parasito. Dano nos parasitos também ocorreu devido a aumento na produção de óxido nítrico, cuja produção foi estimulada em macrófagos infectados com a forma amastigota da *L. amazonensis*.

Em estudo realizado para avaliar a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* foi demonstrado que *L. amazonensis* exposta ao óleo essencial na concentração correspondente ao IC₅₀ para promastigotas e amastigotas (135 e 100 µg/ml, respectivamente) foi capaz de causar interferência na divisão celular, com promastigotas apresentando dois ou mais flagelos e amastigotas apresentando dois ou mais núcleos, e alterações ultraestruturais na mitocôndria, tais como dilatação, desorganização da membrana interna e aumento no número de cristas. Além disso, a produção de óxido nítrico foi estimulada quando macrófagos peritoneais de camundongo foram tratados com 150 µg/ml desse óleo, tanto antes como após a infecção com o parasito (Ueda-Nakamura *et al.*, 2006). Recente estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2008) verificou que esse óleo também é capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi* de maneira dose dependente e causar alterações ultraestruturais semelhantes às aquelas observadas em promastigotas de *L. amazonensis*.

Atividade leishmanicida também foi demonstrada para o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* tanto contra as formas promastigotas quanto para as amastigotas de *L. amazonensis* (Monzote *et al.*, 2006) e *L. donovani* (Monzote *et al.*, 2007a), com pouca toxicidade para os macrófagos. Porém, o mecanismo pelo qual esse óleo essencial mata *Leishmania* ainda é desconhecido. Em 2007 (b), esse mesmo grupo comparou a atividade do óleo essencial de *C. ambrosioides* após administração intraperitoneal, oral e intralesional em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. O óleo essencial administrado por via intraperitoneal na concentração de 30 µg/ml foi capaz de reduzir o tamanho da lesão e reduzir a carga parasitária, enquanto que ao ser administrado por via oral na mesma concentração causou somente um retardo na infecção, quando comparado com camundongos não tratados. A administração por via intralesional não apresentou atividade. A cura completa dos animais tratados com o óleo essencial não foi alcançada, mas lesões menores e com menor carga parasitaria foram obtidas (Monzote *et al.*, 2007b).

Recentemente, Santin e colaboradores (2009) avaliaram a atividade leishmanicida de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e de seu principal componente, o monoterpeno citral. Foi observado que tanto o OE, quanto citral apresentaram atividade leishmanicida dose-dependente, com IC₅₀ 3,2 µg/ml e 25 µg/ml e CC₅₀ de 25 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente. Portanto, o OE de *C. citratus* e o citral são mais tóxicos para o parasito que para a célula hospedeira. Apesar da atividade leishmanicida observada no óleo essencial ser mantida no monoterpeno citral, sugere-se que a presença de outros componentes no OE possua um efeito sinérgico, tornando-o mais eficiente que o citral isolado. Na análise estrutural dos parasitas pode-se evidenciar a ocorrência de alterações em mitocôndrias, em flagelo, em bolsa flagelar, além do aparecimento de múltiplos vacúolos no citoplasma.

Entre os compostos isolados de produtos naturais que apresentam atividade anti-*Leishmania* estão alcalóides indólicos, isoquinolinas, quinolinas e terpenos (Wright & Phillipson, 1990; Iwu *et al.*, 1994; Kayser, Kiderlen & Croft, 2003; Rocha *et al.*, 2005). Alguns trabalhos recentemente publicados estão demonstrando a atividade leishmanicida e tripanosomicida de extratos de plantas contendo

compostos terpenóides (Tiuman, *et al*, 2005; Sen *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2008; Sülsen *et al.*, 2008).

Arruda e colaboradores (2008) avaliaram a atividade leishmanicida do limoneno, um monoterpene encontrado particularmente em óleos de limão, laranja, entre outros. Limoneno foi ativo contra promastigotas de *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. Além disso, em testes realizados *in vitro*, limoneno foi capaz de matar amastigotas de *L. amazonensis* e inibir o crescimento intracelular desta forma do parasito, apresentando baixa toxicidade para as células dos mamíferos. Em estudos *in vivo* foi observado que o tratamento tópico ou intrarretal de camundongos infectados com *L. amazonensis* foi capaz de inibir a progressão da lesão, reduzir a carga parasitária e induzindo a cura completa em 67 a 86% dos animais tratados.

Sesquiterpenos lactonas são componentes terpenóides característicos da família Asteraceae. Partenolídio, um sesquiterpeno lactona isolado de *Tanacetum parthenium*, possui grande atividade anti-*Leishmania amazonensis*, tanto contra forma promastigota ($IC_{50}=0,37\mu\text{g/ml}$) quanto contra a forma amastigota ($IC_{50}=0,81\mu\text{g/ml}$) do parasita, inibindo o seu crescimento. Na avaliação ultraestrutural dos promastigotas tratados com $1\mu\text{g/ml}$ pode-se observar alterações, tais como uma intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar, que aparece na forma de protrusões de corpo celular em direção a bolsa flagelar, e estruturas similares a lisossomas no citoplasma (Tiuman *et al.*, 2005). *Ambrosia tenuifolia*, outro membro da família Asteraceae, foi recentemente estudada e também apresentou atividade leishmanicida e tripanocida devido à presença de dois sesquiterpenos lactonas: Psilostachyne e Peruvian. Psilostachyne apresentou maior atividade contra as formas infectantes de *T. cruzi*. Já em *Leishmania*, ambos compostos apresentaram significativa atividade contra a forma promastigota do parasita (Sülsen *et al.*, 2008).

Artemisinina, um sesquiterpeno isolado da *Artemisia annua*, apresentou importante atividade contra as formas promastigota e amastigota de *L. donovani*, inibindo o crescimento do parasita de forma dose dependente e apresentando um IC_{50} de 160 e 22 μM , respectivamente. Além disso, observou-se que as formas promastigotas apresentavam externalização de fosfatidilserina, despolarização do potencial transmembrana da mitocôndria e fragmentação do DNA quando tratadas

com 160 μM de artemisinina, demonstrando que a atividade leishmanicida do composto ocorre via apoptose (Sen *et al.*, 2007).

Outros compostos como os diterpenos e seus derivados também possuem atividade contra tripanossomatídeos (Fokialakis *et al.*, 2006, Ambrósio *et al.*, 2008). diterpenos naturais e semi-sintéticos oriundos de *Cistus* sp. possuem atividade contra *L. donovani* (Fokialakis *et al.*, 2006). Diterpenos naturais e seus derivados obtidos da *Viguiera arenaria*, da família Astereceae, também demonstraram atividade contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Ambrósio *et al.*, 2008).

1.7 Copaíba

As espécies do gênero *Copaifera*, também conhecidas popularmente como “copaíba”, “copaíva” ou “pau-de-óleo” (Gomes *et al.*, 2007), são encontrada principalmente na bacia Amazônica e no cerrado, sendo adaptadas a uma grande variedade de ambientes. Existem cerca de 28 espécies catalogadas, das quais 16 são endêmicas do Brasil (Rigamonte-Azevedo, Wadt & Wadt, 2004).

A copaíba produz um óleo-resina muito utilizado popularmente devido suas propriedades medicinais e de interesse para a indústria química (cosméticos) e farmacêutica (Wadt *et al.*, 2007). Esse óleo-resina é composto por uma parte sólida (cerca de 50 a 60%), os ácidos diterpenos, diluídos em óleo essencial composto principalmente de sesquiterpenos. Já foram identificados 72 tipos diferentes de sesquiterpenos e 27 tipos de diterpenos em óleo-resina de copaíba (Veiga Júnior, Pinto, 2002). Os sesquiterpenos mais comumente encontrados em óleos de copaíba são o β -cariofileno, α -copaeno, zingibereno, β -bisaboleno e bergamoteno (Lima *et al.*, 2003). O β -cariofileno foi o sesquiterpeno majoritário encontrado em óleos de copaíba de diferentes espécies (Lima *et al.*, 2003; Veiga Junior *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008 b). Os principais diterpenos são os ácidos kaurenóico, kovalenico, hardwichiic, polialtico e copálico, sendo este último considerado um diterpeno característico do gênero *Copaifera* (Lima *et al.*, 2003). Estes sesquiterpenos e diterpenos encontrados nas copaíbas já demonstraram possuir atividades antiinflamatórias, analgésicas, antitumoral, larvicida, acaracida, antimicrobiana, entre outras (Lima *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005; Veiga Júnior *et al.*, 2007; Fernandes & Freitas, 2007; da Silva *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008 b).

A produção de óleo-resina por árvore é muito variável e ainda não se tem conhecimento sobre os fatores que a determinam. Alguns estudos avaliam o efeito das características físicas do solo, diâmetro da árvore e época do ano sobre a produção da copaíba, porém não há ainda nenhuma conclusão definitiva. Além disso, alguns estudos realizados no início do século passado indicam que há diferenças na produção das diversas espécies de copaíba e as estimativas de produção podem variar ainda em relação ao tipo de manejo para a retirada do óleo e o período entre extrações consecutivas (Rigamonte-Azevedo, Wadt & Wadt, 2004).

Os óleos de copaíba vêm sendo usados na medicina popular como antiinflamatório (Veiga Júnior *et al.*, 2007), analgésico (Carvalho *et al.*, 2005), antitumor (Lima *et al.*, 2003), antimicrobiano (Santos *et al.*, 2008 b), acaricida (Fernandes e Freitas, 2007), larvicida (da Silva *et al.*, 2007), gastro-protetor (Paiva *et al.*, 1998) e antinociceptivo (Gomes *et al.*, 2007). Ainda hoje, o “óleo de copaíba” é um dos mais usados na Amazônia brasileira, uma região onde a população rural tem pouco acesso aos produtos farmacêuticos industrializados e aos serviços convencionais de saúde (Cason & Gilbert, 2000). Os óleos de copaíba também são usados na indústria de cosméticos em loções capilares, xampus, sabonetes e espuma de banho (Veiga Júnior *et al.*, 2001).

Foi demonstrado recentemente que óleo essencial obtido de uma das espécies de copaíba, a *Copaifera reticulata*, foi capaz de inibir o crescimento de ambas as formas de desenvolvimento de *L. amazonensis*, apresentando forte efeito contra amastigotas intracelulares, com um valor de IC₅₀ de 20 µg/ml, sendo mais tóxica para o parasita que para a célula hospedeira. Óleo de *C. reticulata*, assim como os de outras espécies de copaíba apresentam grandes quantidades de sesquiterpenos e diterpenos em sua composição (Santos *et al.*, 2008 c).

A atual política de fármacos brasileira requer que medicamentos de origem natural possam ser quimicamente padronizados e evidências devem apresentar a eficácia e a segurança no seu uso. A análise e a padronização química dos óleo-resinas de diferentes espécies de *Copaifera* é claramente importante para relacionar a composição química com a atividade biológica e então permitir a validação como um fitomedicamento seguro e eficaz com controle de qualidade adequado (Gilbert *et al.*, 1997). Um produto para o mercado de fitomedicamentos com base no óleo de copaíba, portanto, deve garantir a reprodutibilidade e a eficácia dentro de um lote

usado industrialmente. É necessário que a este lote seja anexado um laudo sobre a composição química mínima para que o efeito desejado seja mantido. Nessa relação entre o perfil químico e ensaios farmacológicos repousa a confiança do consumidor na eficácia do produto (Tappin *et al.*, 2004).



FIG 4: *Copaifera* spp. (www.arvores.brasil.nom.br/esq.htm)

2. Justificativa e objetivos

Leishmania amazonensis é um dos agentes da leishmaniose cutânea no Novo Mundo e um dos principais causadores da forma difusa da doença, a qual frequentemente não responde aos tratamentos em uso até hoje. Além disso, o controle das leishmanioses permanece um problema, já que os tratamentos convencionais são de alto custo, potencialmente tóxicos, causando severos efeitos colaterais e necessitando administração parenteral ou intramuscular, requerendo, em muitos casos, internação do paciente. Todos estes fatores levam o indivíduo a se afastar do tratamento, o que favorece a emergência de cepas resistentes.

A ausência de um medicamento anti-*Leishmania* realmente eficaz torna necessária à busca de novos compostos terapêuticos com melhor atividade e com menor produção de efeitos colaterais. Plantas são fontes alternativas potenciais para a pesquisa de novos e seletivos agentes terapêuticos para o tratamento das leishmanioses.

Nesse contexto, temos por objetivo verificar a atividade leishmanicida de óleos comerciais de copaíba, de suas frações e dos compostos delas isolados em *Leishmania amazonensis*, buscando a identificação e a correlação entre os compostos majoritários presentes no óleo e a atividade leishmanicida.

Objetivos específicos:

- **Em promastigotas:** verificar a toxicidade desses OEs, de suas frações e dos compostos delas isolados, sobre os promastigotas, avaliando sua capacidade de sobrevivência.
- **Em amastigotas:** avaliar a atividade leishmanicida dos OEs, de suas frações e dos compostos delas isolados, sobre a forma amastigota determinando os IC_{50} *in vitro* utilizando macrófagos infectados.
- **Em macrófagos:** verificar a citotoxicidade dos óleos essenciais, de suas frações e dos compostos delas isolados para a célula hospedeira, avaliando a atividade mitocondrial através do XTT, a integridade de membrana com o Azul de Trypan, e a capacidade fagocítica dos macrófagos tratados com esses compostos. Estudaremos ainda se os OEs, suas frações e os compostos delas isolados são capazes de modular os mecanismos microbicidas dos macrófagos através da análise da produção de óxido nítrico por macrófagos tratados.

3. Materiais e Métodos

3.1 Parasitas

Promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa WHOM/BR/75/Josefa (isolada de um caso de leishmaniose cutânea humana cedida pelo DR. C.A. Cuba-Cuba, Universidade de Brasília), foram mantidos em “Schneider Insect Medium” (Sigma) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cripion) e 10 % de urina humana a 26°C (Howard *et al.*, 1991).

3.2 Obtenção dos Óleos de *Copaifera* spp.

Os óleos comerciais de copaíba foram comprados na Central de Cooperativas de Rio Branco, tendo sido coletados entre 1999 – 2000 em Tarauacá, Acre, sendo mantidos em vidro âmbar a 20 – 22°C. As amostras foram doadas e analisadas pelos Drs. Mônica Freiman de S. Ramos (Fac. Farmácia - Dep. Medicamentos – UFRJ) e Antônio C. Siani (Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, RJ).

O perfil químico das amostras foi periodicamente avaliado, apresentando-se inalterado e a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa foi realizada, obtendo-se a composição dos óleos comerciais, os quais foram denominados como C1, C2, C3 e C4. A composição dos óleos comerciais de copaíba estudados pode ser observada nas tabelas 1 e 2. As frações do óleo comercial C4 foram separadas de acordo com seu conteúdo de sesquiterpenos e diterpenos, sendo denominados como fração volátil, a qual contém exclusivamente sesquiterpenos, e fração não volátil, que é composta exclusivamente por diterpenos.

O óleo comercial C4 foi fracionado por arraste a vapor. Brevemente, uma massa de cerca de 100 g de C4 foi transferida para balão de 1 L contendo 500 mL de água destilada, que foi aquecido por manta de aquecimento. A fração volátil foi obtida por arraste do vapor por 8h, empregando o aparato modificado de Clevenger (Gottlieb, 1960). As frações obtidas foram denominadas como fração volátil, a qual contém exclusivamente sesquiterpenos, e fração não volátil, que é composta exclusivamente por diterpenos. Os óleos e as frações foram diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO - Sigma) para os ensaios. A maior concentração de DMSO (0,5%) obtida na maior concentração usada dos óleos foi sempre usada como controle. O Cariofileno, sesquiterpeno predominante encontrado na porção volátil do óleo, foi obtido comercialmente (Sigma-Aldrich).

Tabela 1: Constituintes caracterizados no óleo comercial de copaíba C1 e C4:

Constituintes	Abundância relativa %	
	C1	C4
sesquiterpenos		
	C1	C4
δ-elemeno	0,3	0,7
α-cubebeno	0,2	0,6
α-copaeno	2,7	7,6
β-elemeno	1,0	1,3
cyperene	0,3	-
<i>trans</i> -β-cariofileno	57,5	29,7
α-bergamoteno	1,5	6,4
α-humuleno	9,5	4,6
β- humuleno	-	1,1
allo aromadendreno	-	0,5
δ-muuroleno	1,1	2,4
germacreno D	1,3	12,0
β-selineno	0,5	-
α-selineno	0,6	0,7
Bicyclogermacrene	-	1,1
α-muuroleno	-	1,4
β-bisaboleno	1,6	1,2
δ-amorpheno	-	1,5
δ-cadineno	1,3	5,1
δ-bisabolene(E)-isso	0,2	-
germacreno B	1,1	-
álcool cariofilenílico	0,6	-
óxido de cariofileno	traços	-
NI	-	1,3
torreyol	0,3	1,2
diterpenos		
epurato de metila	-	0,6
copalato de metila	4,8	9,3
danielato de metila	2,7	-
pinifoliato de metila	0,4	-
agatilato de metila	2,3	-
agalato de metila	-	1,4
hidroxi-copalato de metila	0,7	1,0
acetoxi-copalato de metila	4,1	4,9
	C1	C4
Total de sesquiterpenos	81,6	80,1
Total de diterpenos	15,0	17,2
Total identificado	96,6	97,3

Abundância relativa obtida pela análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa.

NI: não identificado

Tabela 2: Constituintes caracterizados nos óleos comerciais de copaíba C2 e C3:

Constituintes	Abundância relativa %	
	C2	C3
sesquiterpenos		
	C2	C3
α -cubebeno	-	1,7
α -copaeno	-	13,9
β -elemeno	0,2	1,6
Cypereno	0,2	0,3
<i>trans</i> β -cariofileno	9,5	4,0
α -bergamoteno	8,1	1,4
α -humuleno	1,8	0,9
δ -muuroleno	1,1	1,1
allo aromadendreno	-	1,2
germacreno D	-	0,3
<i>trans</i> - β -farneseno	1,0	-
β -selineno	1,0	3,6
α -selineno	1,6	2,2
<i>cis</i> - α -bisaboleno	1,0	-
β -bisaboleno	1,6	3,3
δ -cadineno	0,6	3,6
δ -bisaboleno(E)-isso	0,8	0,2
óxido de cariofileno	-	0,4
torreyol	-	0,5
diterpenos		
9,12-linoleato de metila	0,2	0,2
Epurato de metila	2,9	3,2
NI	4,0	7,0
copalato de metila	3,7	0,3
caurenoato de metila	-	7,6
cauranoato de metila	-	7,7
NI	1,7	-
danielato de metila	40,2	10,6
hardwickicato de metila	1,2	13,2
pinifoliato de metila		
	C2	C3
Total de sesquiterpenos	28,6	40,2
Total de diterpenos	59,4	50,2
Total identificado	87,0	90,4

Abundância relativa obtida pela análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa.

NI: não identificado

3.3 Obtenção de macrófagos

Camundongos BALB/c foram inoculados com 1,5 ml de tioglicolato 3% por via intraperitoneal e no quarto dia após a estimulação, os macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal com meio 199, pH 6,8 a 4°C. As células foram incubadas em lamínula de vidro de 13 mm² em placas de 24 poços e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ por pelo menos uma hora e meia. Em seguida, as culturas foram lavadas com PBS (0,1M tampão fosfato – 0,85% salina) a 37°C para remoção de células não aderentes e incubadas durante a noite em meio 199 suplementado com 10% de SFB, nas mesmas condições acima descritas.

3.4 Atividade anti-promastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* (10⁶) foram incubadas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10% de urina humana 26°C, na presença ou ausência de 50µg/ml dos óleos comerciais, frações e compostos isolados, que foram adicionados no primeiro dia de cultivo. A sobrevivência foi estimada através da contagem dos parasitas viáveis/móveis em câmara de Neubauer durante cinco dias consecutivos.

3.5 Atividade anti-amastigota

Os macrófagos aderidos nas lamínulas foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (fase estacionária) em uma proporção de 10 parasitas por macrófago e incubados por 2 horas a 35°C em 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para remover os parasitas livres e incubadas em meio 199 suplementado com 10% de SFB por 24 horas a 35°C em 5% de CO₂. No dia seguinte os macrófagos foram tratados ou não com os óleos comerciais de copaíba, frações ou compostos isolados em diferentes concentrações (0,1, 1 e 10 µg/ml) ou com Anfotericina B (1 µg /ml, AmB, Cristalia, Brasil) e incubados por mais 24 horas. Após esse tempo, as monocamadas foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas com metanol, coradas com Giemsa, desidratadas em soluções de acetona-xilol e montadas com Entelan. Os experimentos foram feitos em duplicata e pelo menos 200 células por lamínula foram contadas. As lamínulas foram observadas em microscopia óptica de campo claro, sendo determinados a porcentagem de macrófagos infectados, o número de amastigotas por macrófago e o produto destes

dois números forneceu o índice de infectividade. Somente experimentos com índice de infectividade igual ou superior a 50 foram considerados válidos. Os índices de sobrevivência e de inibição da sobrevivência foram calculados a partir da comparação entre os índices de infectividade obtidos com e sem tratamento.

3.6 Citotoxicidade para macrófagos murinos

A citotoxicidade dos óleos comerciais, frações e compostos isolados foram testados em macrófagos murinos utilizando dois métodos: Azul de Trypan, que avalia a integridade de membrana, e XTT que avalia a atividade mitocondrial.

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (2×10^6 /poço) obtidos conforme descrito e foram incubados em placas de 24 poços sem lamínula por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. No dia seguinte, as células foram tratadas com 50, 75 ou 100 µg/ml dos óleos comerciais, frações ou compostos isolados e incubadas por mais 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Após esse período, foi adicionado ao meio uma solução 0,3% de Azul de Trypan e o número de células viáveis foi determinado em microscópio invertido.

Para realização do XTT, macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c (2×10^6 /poço) estimulados com tioglicolato 3% obtidos como acima foram dispensados em placas de 96 poços e tratados com os óleos comerciais, frações e compostos isolados em diferentes concentrações por 24 horas. A viabilidade das células foi avaliada usando-se XTT (2,3-Bis [2-Methoxy -4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt, Sigma) na concentração de 1mg/ml e PMS (Phenazine metho-sulfato, Sigma), em concentração de 0,025mM, e o produto dessa reação foi lido em 450nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de sobrevivência em relação aos controles não tratados. Azida sódica a 1% foi usada como controle positivo da reação.

A toxicidade para macrófagos e a atividade contra o protozoário foram comparadas usando o índice de seletividade (IS), o qual é obtido através da proporção entre CC₅₀ para macrófagos murinos/IC₅₀ para protozoário (Santin *et al*, 2009).

3.7 Produção de Óxido Nítrico

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, estimulados com tioglicolato, foram aderidos em placas de 24 poços (2×10^6 /poço) e após 24 horas a 37°C em 5% de CO₂, as monocamadas foram ativadas ou não com 100ng/ml de lipopolissacarídeo (LPS-L3755- de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6; Sigma) ou 100ng/ml de IFN- γ e tratadas ou não com 10 μ g/ml dos óleos comerciais, frações ou compostos isolados, sendo mantidas a 37°C em 5% de CO₂ por mais 48 horas. A concentração de nitrito dos sobrenadantes foi mensurada pela reação de Greiss, usando como referência uma curva padrão de nitrito de sódio. As placas foram lidas a 550nm em espectrofotômetro e os resultados em triplicata são expressos em μ M da concentração de nitrito.

3.8 Capacidade de sequestrar Óxido Nítrico:

Para avaliar a capacidade de C4, da fração volátil e da fração não volátil em sequestrar óxido nítrico, foi usado um teste livre de célula. S-nitroson-acetyl DL-penicillamine (SNAP, Sigma), em solução libera óxido nítrico no meio, que se transforma em nitrito. A adição de rutina, um sequestrador de óxido nítrico, à solução de SNAP resulta em redução na acumulação de nitrito no sobrenadante. Usando este protocolo, 10 μ g/ml de C4, de fração volátil ou de fração não volátil foram incubados com 1mM de SNAP. Rutina (1mM, Sigma), foi usada como controle positivo. Após 6 horas de incubação, uma alíquota do sobrenadante foi removida para quantificar a presença de nitrito utilizando a reação de Greiss. Resultados foram expressos em mM de nitrito, calculado em comparação com a curva padrão de nitrito de sódio.

3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste t de Student para comparação de dois grupos ou análise de variância (one-way ANOVA) para mais de dois grupos. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad. O valor de p foi considerado significativo quando menor ou igual a 0.05.

4. RESULTADOS

4.1 Óleos comerciais de copaíba

4.1.1 Atividade anti-promastigota dos óleos comerciais de copaíba:

Os nossos resultados demonstraram que os compostos C1 e C4, na concentração de 50 µg/ml, parecem não interferir no crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, não apresentando diferença estatística significativa quando comparados com os parasitas não tratados (controle). Por outro lado, foi observada uma diminuição do número de parasitas viáveis a partir do terceiro dia de cultura, quando estes foram tratados com 50 µg/ml dos óleos comerciais C2 e C3. O Cariofileno (CAR), uma substância pura disponível comercialmente, e que também está presente nos óleos de copaíba, não foi capaz de reduzir o crescimento dos promastigotas na concentração de 50 µg/ml, apresentando um resultado semelhante aos óleos comerciais C1 e C4 (Fig. 4).

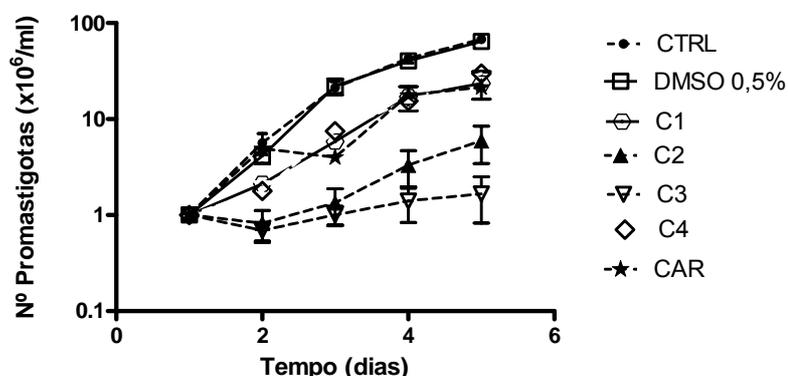


FIG. 5: Efeito dos óleos C1, C2, C3, C4 e de cariofileno (CAR) no crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Promastigotas (1×10^6 /ml) foram cultivados na presença ou na ausência de 50 µg/ml de cada composto. A atividade anti-promastigota foi determinada através da contagem dos parasitas viáveis durante 5 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Os resultados mostrados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de 5 experimentos para C1, C2, C3 e C4 e de 2 experimentos para CAR, realizados em duplicata. * $p < 0,05$.

4.1.2 Atividade anti-amastigota dos óleos comerciais de copaíba:

Para avaliarmos a atividade anti-amastigota dos óleos comerciais, macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com *L. amazonensis* por 24 horas foram tratados com 1 µg/ml dos óleos C1, C2, C3 e C4 e de CAR por mais 24 horas. Os óleos comerciais C1, C4 e CAR foram os que apresentaram maior atividade anti-amastigota. Por este motivo estes óleos foram selecionados para dar continuidade aos nossos experimentos (dados não mostrados).

Uma atividade anti-amastigota dose-dependente foi observada quando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* foram tratados com diferentes concentrações de C1, C4 e CAR. O óleo comercial C1 nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/ml foi capaz de inibir a sobrevivência dos parasitas intracelulares em 16,7%, 29,6%, 58,7%, respectivamente. Já o óleo C4, nas mesmas concentrações foi capaz de inibir a sobrevivência dos amastigotas em 21,9%, 35,4%, 58,8%, respectivamente. A concentração capaz de inibir 50% dos parasitas intracelulares (IC₅₀) foi de 2,9 e 2,3 µg/ml, respectivamente para C1 e C4, sendo C4 mais ativo contra as formas amastigotas do parasita que C1. Ao compararmos a atividade de CAR com C1 e C4 podemos observar que CAR possui uma maior atividade anti-amastigota que os óleos comerciais. Nas concentrações 0,1, 1 e 10 µg/ml CAR foi capaz de matar, respectivamente, 19,1%, 46,79% e 69,3% dos amastigotas intracelulares e apresentou uma IC₅₀ de 1,3 µg/ml (Fig. 5).

Quando comparamos a atividade de C1, C4 e CAR com Anfotericina B (Fig 5), observamos que esses compostos na concentração de 10 µg/ml foram capazes de inibir o crescimento dos amastigotas de forma semelhante à concentração de 1 µg/ml da Anfotericina B.

A atividade anti-amastigota de DMSO 0,5%, substância utilizada como diluente dos óleos C1 e C4, do CAR e da Anfotericina B, também foi avaliada. DMSO 0,5 % não possui atividade anti-amastigota estatisticamente significativa, indicando que a morte do parasita ocorre devido à ação das substâncias testadas e não pela ação deste diluente.

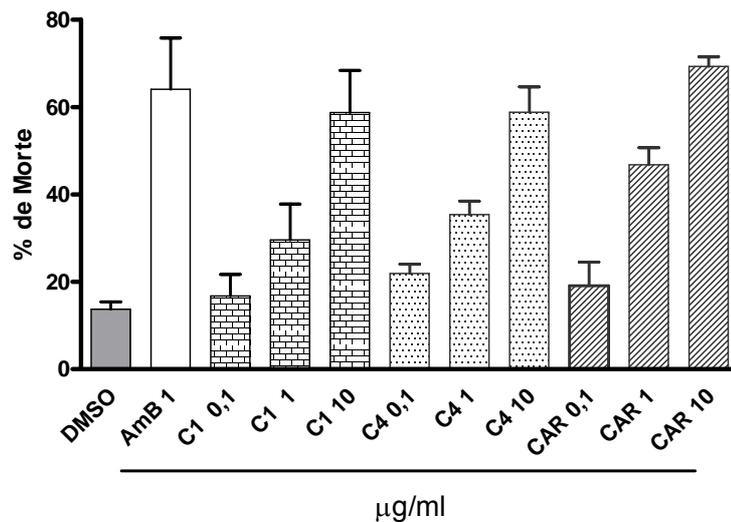


FIG. 6: Efeito inibitório dos óleos C1 e C4 e do cariofileno (CAR) na sobrevivência de amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas por 24 horas foram tratados com as concentrações indicadas dos óleos C1, C4, da substância pura CAR ou com 1 µg/ml de Anfotericina B (AmB) durante 24 horas. A atividade anti-amastigota do DMSO 0,5% também foi avaliada. Dados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de cinco experimentos realizados em duplicatas.

4.1.3 Produção de Óxido Nítrico:

Como o óxido nítrico (NO) é uma importante substância produzida por macrófagos ativados a qual é capaz de matar as formas intracelulares do parasita, decidimos avaliarmos a capacidade de C1, C4 e CAR em estimular a produção de NO, utilizando, para isto, o método de Griess (Fig. 6).

Nossos resultados demonstram que macrófagos tratados com 10 µg/ml de C1, C4 ou CAR produzem a mesma quantidade de nitrito que os macrófagos não tratados, ou seja, as células tratadas não tiveram o padrão de produção de NO alterado quando comparadas aos controles não tratados (Fig. 6). A produção de óxido nítrico aumentou significativamente em macrófagos ativados com LPS, quando comparados aos controles não ativados e não tratados (CTRL). A adição de 10 µg/ml de C1, C4 ou CAR às células ativadas foi incapaz de potencializar o efeito do LPS, não havendo diferença estatística significativa na produção de nitrito entre as células que foram somente ativadas por LPS e as células que foram ativadas com LPS e tratadas com C1, C4 ou CAR (Fig. 6).

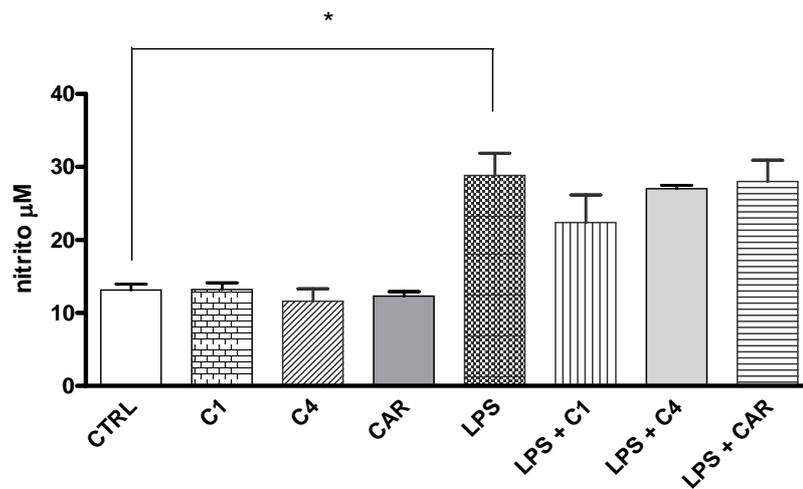


FIG. 7: Produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais ativados ou não com LPS que foram tratados ou não com 10 µg/ml de C1, C4 e o cariofileno (CAR). Após 48 h de cultivo o sobrenadante foi recolhido e a produção de nitrito mensurada pelo método de Griess. Controle (CTRL) são macrófagos não ativados e não tratados; macrófagos ativados com LPS (LPS); macrófagos ativados com LPS e tratados com C1 (LPS+C1), C4 (LPS+C4) e CAR (LPS+CAR). Os resultados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes feitos em triplicatas. *p=0.0075.

4.1.4 Citotoxicidade para a célula hospedeira (ensaio com azul de Trypan):

Para avaliar a citotoxicidade dos óleos comerciais C1 e C4 e do Cariofileno (CAR) para as células hospedeiras, realizamos o teste de exclusão de Azul de Trypan, o qual verifica se esses compostos são capazes de causar danos à membrana da célula hospedeira.

Nossos resultados mostram que na concentração de 50 µg/ml aproximadamente 100% das células continuam viáveis após o tratamento com C1, C4 ou com o CAR, quando comparadas aos controles não tratados (Fig. 7). No entanto, a concentração de 75 µg/ml de C1, C4 ou de CAR já foi capaz de causar uma redução significativa no número de células viáveis. Além disso, podemos observar que entre as três substâncias avaliadas, o óleo C1 foi o que mais reduziu a viabilidade das células quando estas foram tratadas com a concentração de 75 µg/ml. C1 foi capaz de reduzir a viabilidade dos macrófagos em 67% quando utilizamos 75 µg/ml e de causar uma redução de 92,6% quando utilizamos uma concentração de 100 µg/ml. Ao tratarmos os macrófagos com C4, houve uma redução no número de células viáveis em 18,6% com 75 µg/ml e em 74,8 % ao

tratarmos os macrófagos com uma concentração de 100 µg/ml. Células tratadas com CAR apresentaram uma redução de 27,6% e de 90,7% na sua viabilidade das células quando utilizamos as concentrações de 75 µg/ml e 100 µg/ml da substância, respectivamente.

DMSO 0,5%, substância utilizada como diluente para os óleos comerciais e para o cariofileno, não foi capaz de causar dano a membrana dos macrófagos, indicando que o dano causado a célula é devido à ação das substâncias testadas e não pela ação deste diluente.

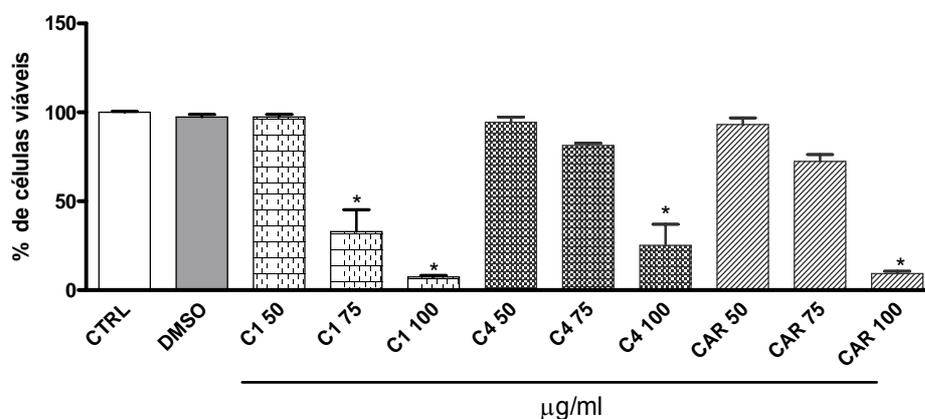


FIG. 8: Citotoxicidade dos óleos C1, C4 e cariofileno (CAR) em macrófagos. Macrófagos peritoneais foram incubados durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂ nas concentrações indicadas e a viabilidade foi medida através do teste de exclusão do corante azul de Trypan. A atividade citotóxica de DMSO 0,5% também foi avaliada. Dados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos realizados em duplicatas. *p<0.05 para C1, C4 e cariofileno nas diferentes concentrações vs controle.

4.1.5 Citotoxicidade para a célula hospedeira (método de XTT):

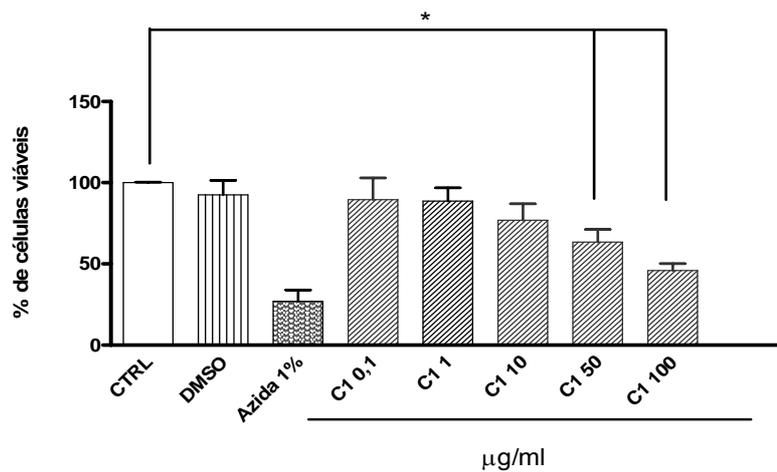
A citotoxicidade dos óleos comerciais C1 e C4 também foi avaliada através do método de XTT, que mede a viabilidade das células pela atividade de desidrogenases mitocondriais.

Nossos resultados demonstram que C1, C4 e CAR nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/ml não afetam a viabilidade das células (Fig. 8). Contudo, ao tratarmos as células com 50 µg/ml de C1 (Fig. 8A) ou de CAR (Fig. 8C) já foi possível observar uma redução significativa no número de células viáveis, que foi de 36,5% para C1 e de 42,3% para CAR. C4 somente foi capaz de causar uma redução significativa na

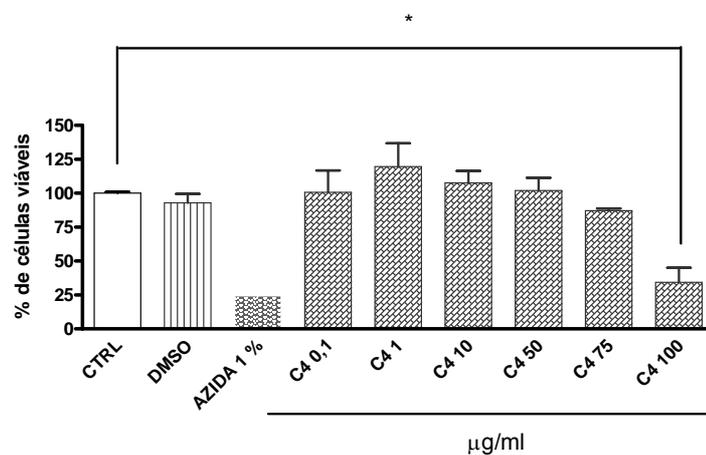
viabilidade das células hospedeiras em 12,8% quando tratamos os macrófagos com C4 na concentração de 75 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 8B). Novamente, entre as três substâncias avaliadas, C4 foi a que demonstrou menor toxicidade para as células hospedeiras. A concentração tóxica para 50% dos macrófagos (CC_{50}) foi de 85 $\mu\text{g/ml}$ para C1, de 92,4 $\mu\text{g/ml}$ para C4 e de 63,6 $\mu\text{g/ml}$ para CAR.

A toxicidade para os macrófagos e a atividade contra os protozoários foi comparada pelo uso do índice de seletividade (IS). O resultado do IS para as formas amastigotas mostrou que o CAR é 48,9 vezes menos tóxico para o macrófago do que para o parasita intracelular. Os óleos comerciais C1 e C4 apresentaram IS de 29,3 e 40,1, respectivamente, também apresentando maior seletividade contra os amastigotas do que contra as células dos mamíferos (tabela 3).

A



B



C

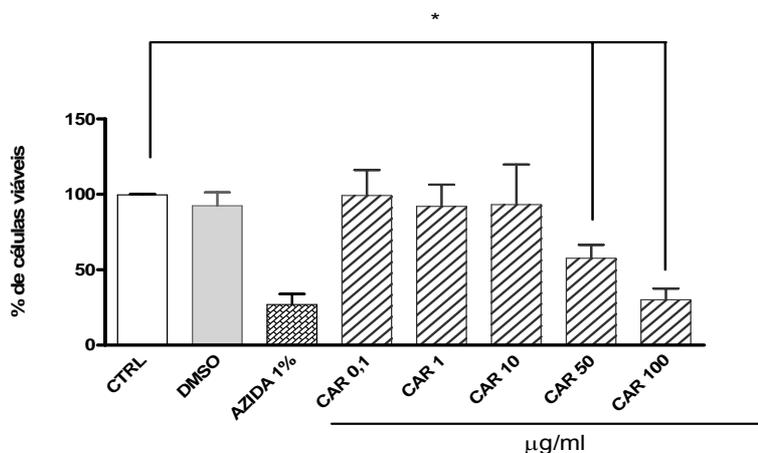


FIG. 9: Citotoxicidade dos óleos C1, C4 e de Cariofileno (CAR) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. A viabilidade foi medida utilizando o método de XTT. Culturas foram incubadas com as doses indicadas dos óleos C1 (A), C2 (B) e de CAR (C) por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. Azida a 1% foi utilizada como controle positivo. A citotoxicidade do diluente DMSO 0,5% também foi avaliada. Dados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de 5 experimentos para C1, 6 para C2 e 3 para CAR realizados em triplicatas. Em A e B * p<0,0001, e em C * p= 0.0002.

Tabela 3: Obtenção do índice de seletividade (IS) através da proporção entre CC₅₀ e o IC₅₀:

Compostos	CC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (μg/ml)	IS
C1	85,0	2,9	29,3
C4	92,4	2,3	40,1
CAR	63,6	1,3	48,9

CC₅₀: concentração citotóxica para 50% dos macrófagos

IC₅₀: concentração capaz de inibir 50% dos amastigotas

IS: índice de seletividade

4.2 Frações do óleo comercial de Copaíba C4:

Como óleo comercial de copaíba C4 foi o que apresentou maior atividade anti-amastigota e menor toxicidade para os macrófagos, decidimos avaliar a atividade das frações volátil (rica em sesquiterpenos) e não volátil (rica em diterpenos) do óleo comercial C4 sobre as formas promastigota e amastigota do parasita, bem como avaliar seu efeito sobre a célula hospedeira.

4.2.1 Atividade anti-promastigota das frações do óleo comercial C4:

Nossos resultados demonstraram que tanto a fração volátil (FV) quanto a fração não volátil (FNV) na concentração de 50 µg/ml não interferiram no crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* (Fig. 9), não havendo diferença estatística significativa quando comparados com os parasitas não tratados (controle), resultado semelhante ao observando com o óleo comercial C4 não fracionado (Fig. 4).

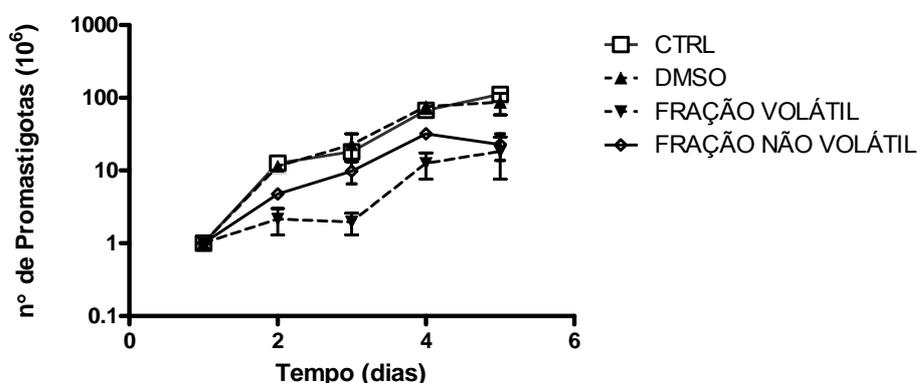


FIG. 10: Efeito das frações volátil (rica em sesquiterpenos) e não volátil (rica em diterpenos) no crescimento de promastigota de *L. amazonensis*. Promastigotas (1×10^6 /ml) foram cultivados na presença ou na ausência de 50 µg/ml de cada fração, e do DMSO 0,5 %. A atividade anti-promastigota foi determinada através da contagem dos parasitas viáveis durante 5 dias consecutivos em câmara de Neubauer. Resultados representam a média \pm SEM de 2 experimentos, realizados em duplicata.

4.2.2 Atividade anti-amastigota das frações do óleo comercial C4:

Uma importante atividade dose-dependente contra formas amastigotas foi observada quando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações de fração volátil ou com CAR. A fração volátil nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/ml foi capaz de promover uma inibição da sobrevivência dos parasitas intracelulares de 22,7, 32,2% e 50,3%, respectivamente, e o cariofileno, nas mesmas concentrações, foi capaz de inibir a sobrevivência em 0%, 52,4%, 64,5. Não houve diferença significativa na inibição da sobrevivência das formas amastigotas quando os macrófagos infectados foram tratados com 0,1 ou 1,0 µg/ml da fração não volátil,

provocando, respectivamente, uma morte de 18,1 % e 20,3 % dos protozoários. Já a concentração de 10 µg/ml foi capaz matar 48,2% dos parasitas (Fig. 10).

Nesse experimento, a AmB na concentração de 1 µg/ml demonstrou ser mais ativa contra o parasita intracelular que os compostos usados, sendo capaz de causar a morte de 83,77% dos amastigotas presentes (Fig. 10).

A atividade anti-amastigota de DMSO 0,5%, substância utilizada como diluente dos óleos C1 e C4, do CAR e da Anfotericina B, também foi avaliada. DMSO 0,5 % não possui atividade anti-amastigota estatisticamente significativa, indicando que a morte do parasita é devido à ação das substâncias testadas e não pela ação deste diluente (Fig.10).

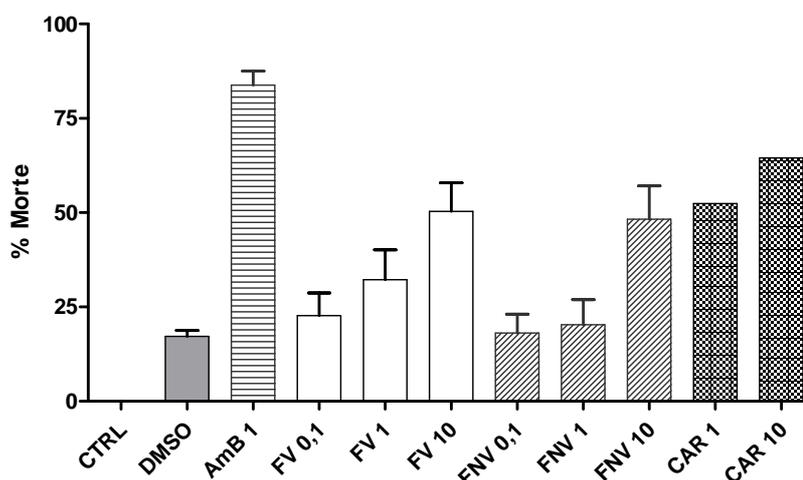


FIG. 11: Efeito inibitório das frações volátil e não volátil e do CAR na sobrevivência de amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com promastigotas por 24 horas foram tratados com as concentrações indicadas das frações volátil (FV), não volátil (FNV) ou da substância pura CAR ou com 1 µg/ml de Anfotericina B (AmB) durante 24 horas. A atividade anti-amastigota do DMSO 0,5% também foi avaliada. Dados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de dois experimentos realizados em duplicatas.

4.2.3 Citotoxicidade das frações do óleo C4 para a célula hospedeira:

Observamos através do método de exclusão de azul de Trypan, que a concentração de 50 µg/ml das frações volátil e não-volátil não foram tóxicas para os macrófagos (Fig. 11). No entanto, na concentração de 75 µg/ml, foi possível observar uma redução da viabilidade dos macrófagos, que foi mais acentuada para

a fração volátil do que para a fração não-volátil. O tratamento da célula hospedeira com 75 µg/ml da fração volátil e da fração não-volátil reduziu a viabilidade celular em 83,5% e 19,7%, respectivamente (Fig. 11).

A citotoxicidade dos compostos também foi avaliada usando o método do XTT, onde a concentração de 50 µg/ml tanto da fração volátil quanto da fração não-volátil foi capaz de reduzir a viabilidade das células (Fig. 12). Em concordância com os resultados com o azul de Trypan, a fração não-volátil foi menos tóxica para os macrófagos do que a fração volátil, apresentando uma CC_{50} 77,5 µg/ml e 65,5 µg/ml, respectivamente (Fig.12).

Ao compararmos a capacidade citotóxica das frações volátil e não-volátil de C4 com o óleo comercial de Copaíba C4, de onde as frações foram obtidas, observamos que C4 é menos tóxico para a célula hospedeira do que as suas frações isoladas (Fig. 8B e Fig.12). Porém, comparando as frações com o composto isolado comercialmente disponível CAR, a citotoxicidade desses compostos é semelhante (Fig. 8C e Fig. 12).

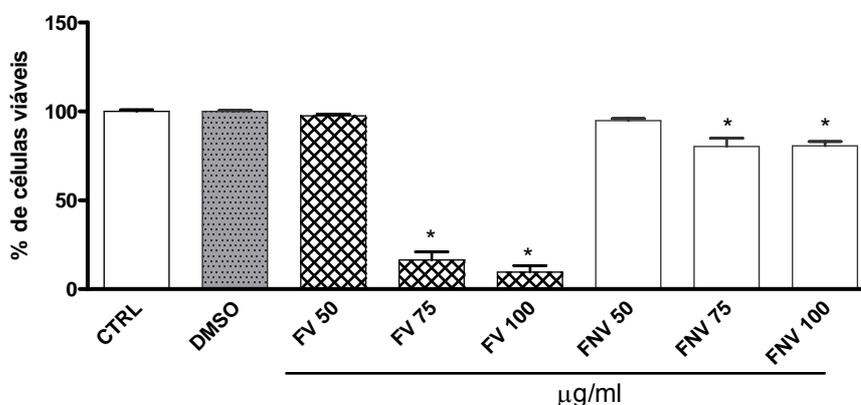


FIG. 12: Citotoxicidade das frações do óleo C4 em macrófagos peritoneais. Macrófagos foram incubados durante 24 horas a 37 °C, 5% CO₂ nas concentrações indicadas de fração volátil (FV), fração não-volátil (FNV) e do diluente DMSO 0,5%. A viabilidade foi medida através do teste de exclusão do corante azul de Trypan. Os resultados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos realizados em duplicatas. * p<0.0001.

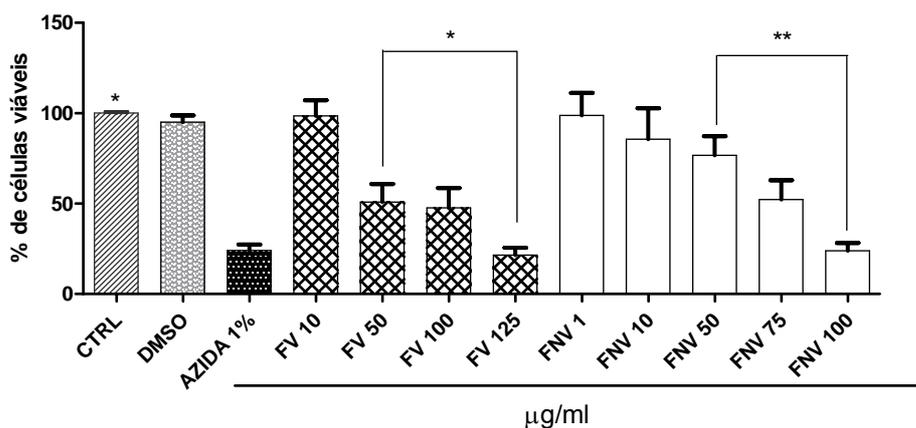


FIG.13: Citotoxicidade das frações volátil e não volátil do óleo C4 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. A viabilidade foi medida utilizando o método de XTT. Culturas foram incubadas com as concentrações indicadas da fração volátil (FV), da fração não volátil (FNV). Azida a 1% foi utilizada como controle positivo. A citotoxicidade do diluente DMSO 0,5% também foi avaliada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de cinco experimentos realizados em triplicatas. * $p=0.04$ e ** $p=0.0017$.

4.2.4 Produção de óxido nítrico:

Em nosso estudo, também avaliamos se a fração volátil e a fração não volátil do óleo comercial C4 seriam capazes de modular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos através do método de Greiss. Nossos resultados demonstraram que as células tratadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ da fração volátil e/ou 10 $\mu\text{g/ml}$ da fração não volátil produziram a mesma quantidade de nitrito que as células não tratadas. Novamente observamos que o C4 e o Cariofileno também não foram capazes de estimular a produção de NO, quando comparados aos controles não tratados (Fig.6 e Fig.13).

A produção de óxido nítrico aumentou significativamente em macrófagos ativados com IFN- γ , quando comparados aos controles não ativados e não tratados (CTRL). Ao adicionarmos 10 $\mu\text{g/ml}$ da fração volátil e/ou da fração não volátil às células ativadas observamos uma redução na produção de óxido nítrico (Fig. 13). Células ativadas com IFN- γ e tratadas com C4 ou com Cariofileno também apresentaram uma redução na produção de NO (Fig. 13).

Para avaliar se os compostos testados estariam realmente atuando na via de síntese de óxido nítrico, impedindo sua produção, ou se a redução de sua produção era resultante do seqüestro de NO pelas substâncias testadas, nós utilizamos um

meio livre de célula onde o SNAP é um doador de NO e a rutina é uma substância capaz de seqüestrar óxido nítrico liberado no meio em que o SNAP foi adicionado. Ao adicionarmos SNAP ao meio na presença de 10 µg/ml da fração volátil, da fração não volátil ou de C4, podemos observar que não houve um seqüestro do óxido nítrico liberado pelo SNAP, pois a quantidade de nitrito presente no meio é semelhante à observada no meio onde só houve a adição de SNAP (Fig. 14).

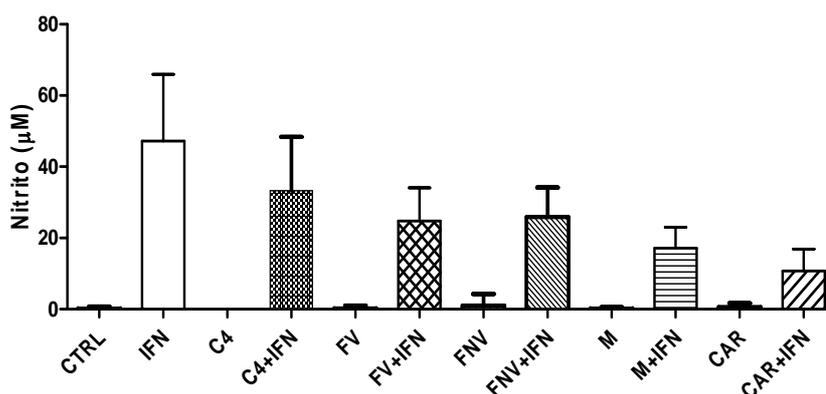


FIG. 14: Produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais ativados ou não com IFN- γ que foram tratados ou não com 10 µg/ml de frações volátil (FV), não-volátil (FNV), mistura (FV+FNV), o óleo C4 e o cariofileno (CAR). Após 48 h de cultivo o sobrenadante foi recolhido e a produção de nitrito mensurada pelo método de Griess. Controle (CTRL) são macrófagos não ativados e não tratados; macrófagos ativados com IFN- γ ; macrófagos tratados com FV, FNV, M, C4 e CAR; macrófagos ativados com IFN- γ e tratados com FV (IFN- γ +FV), FNV (IFN- γ + FNV), Mistura (IFN- γ +M), C4 (IFN- γ +C4) e CAR (IFN- γ +CAR). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes feitos em triplicatas.

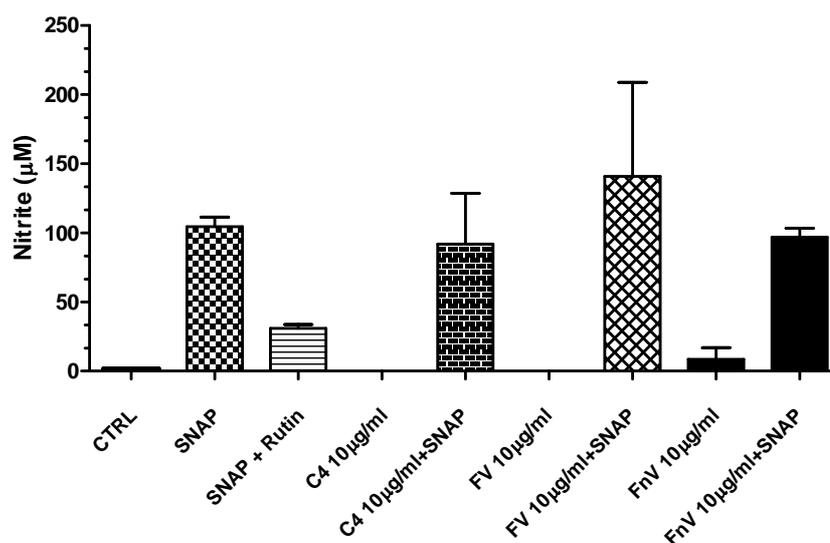


FIG. 15: Sequestro de óxido nítrico pelas frações volátil (FV), não-volátil (FNV) e o óleo C4. Os compostos, na concentração de 10 µg/ml, foram incubados com 1 mM de SNAP. Após 6h de incubação o sobrenadante foi recolhido e a produção de nitrito mensurada pelo método de Griess. Controle (CTRL) é somente o meio, SNAP é o controle negativo e rutina é o controle positivo. Os resultados representam a média ± erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes.

5. Discussão

Os fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses apresentam diversos problemas que limitam seu uso, tais como: alto custo, severos efeitos colaterais, difícil administração, surgimento de cepas resistentes (Berman, 2003; Santos *et al.*, 2008). Estes problemas vêm incentivando pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes com atividade leishmanicida, que sejam mais eficientes, menos tóxicos e de mais fácil administração (Faghihi & Kia, 2003, Demicheli *et al.*, 2004).

Durante muito tempo a medicina popular utilizou plantas e seus extratos para o tratamento de diversas patologias e, mais recentemente, a avaliação científica de plantas medicinais tem introduzido na medicina moderna agentes terapêuticos eficazes para o tratamento de doenças infecciosas, parasitárias, tumorais e imunossupressoras (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001). Plantas e seus derivados têm sido fontes em potencial de novos agentes com atividade leishmanicida (Iwu *et al.*, 1994).

Atualmente a WHO/TDR, o G8 (grupo dos 7 países mais ricos do mundo e a Rússia), o programa Iniciativa de Medicamentos para doenças negligenciadas (Drugs for Neglected Diseases Initiative - DNDi) e várias fundações filantrópicas têm estimulado a descoberta de fármacos para doenças de países em desenvolvimento, incluindo pesquisas de fármacos e fitoterápicos baseados em produtos naturais contra infecções parasitárias (Nwaka & Hudson, 2006). Em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que tem como umas de suas diretrizes fomentar linhas de pesquisas em plantas medicinais e fitoterápicos. O panorama atual suporta e influencia o estudo de óleos essenciais para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou compostos para terapia de leishmanioses.

Recentemente a atividade anti-*Leishmania* de óleos essenciais de plantas ou substâncias isoladas destes óleos foi demonstrada (Rosa *et al.*, 2003; Monzote *et al.*, 2006; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006; Monzote *et al.*, 2007a, b). Estes estudos apontam os óleos essenciais como uma fonte alternativa para obtenção de substâncias ou fitoterápicos para terapia de leishmaniose, o que nos estimulou a estudar a atividade leishmanicida de óleos comerciais obtidos de *Copaifera*.

Os sesquiterpenos são os componentes mais comuns dos óleos de copaíba, sendo quase sempre os mesmos nas diferentes espécies de copaíba, mudando apenas a composição quantitativa, mas mantendo a sua composição qualitativa (Lima *et al.*, 2003). Alguns estudos demonstraram que o β -Cariofileno é o principal sesquiterpeno presente nos óleos de copaíba (Cason & Gilbert, 2000; Lima *et al.*, 2003; Veiga Junior *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008 c) e que este sesquiterpeno é o principal componente com atividade, tais como anestésica local, antiinflamatório, antimicrobiano e agente anti-oxidante. (Ghelardini *et al.*, 2001, Veiga Junior *et al.*, 2007). Já a composição da fração diterpênica, por outro lado, difere um pouco entre as espécies de copaíba (Cason & Gilbert, 2000; Lima *et al.*, 2003).

Recentemente, Santos e colaboradores (2008 c) avaliaram a atividade leishmanicida do óleo obtido de diferentes espécies de Copaíba, e *Copaifera reticulata* foi a que apresentou melhor atividade contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e menor toxicidade para as células hospedeiras. Este trabalho, bem como diversos outros que avaliam a atividade de óleos obtidos de outras espécies de plantas, optou por um controle botânico, associando a atividade

farmacológica de um óleo a uma determinada espécie. Porém, a produção de óleo-resina por copaíba é muito variável. Características físicas do solo, diâmetro da árvore, época do ano, bem como outros fatores podem interferir nas características do óleo produzido (Rigamonte-Azevedo, Wadt & Wadt, 2004). Tais variáveis podem dificultar a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Além disso, os óleos de copaíba disponíveis no mercado são extraídos de várias árvores sem o controle botânico de quais espécies estão sendo usadas na extração.

Em nosso trabalho, optamos por padronizar o perfil químico do óleo comercial de copaíba, uma vez que as amostras obtidas no mercado e utilizadas pela população são oriundas de várias espécies presentes na área, extraídas sem a prévia identificação da espécie. A padronização do perfil químico do óleo comercial de copaíba permitirá a identificação e a correlação entre os compostos majoritários presentes no óleo e a atividade leishmanicida, bem como a baixa toxicidade para as células hospedeiras. Assim, acreditamos contribuir tanto para a identificação de fitoterápicos com atividade leishmanicida, bem como identificar compostos responsáveis por esta atividade nos óleos, permitindo sua purificação e uso como fármaco.

Neste trabalho, avaliamos a atividade leishmanicida de quatro óleos comerciais de copaíba que foram denominados de C1, C2, C3 e C4 e de um componente isolado, o β -cariofileno. Entre os óleos testados, C1 e C4 foram os que apresentaram uma promissora atividade anti-amastigota dose-dependente, com um IC_{50} de 2,9 $\mu\text{g/ml}$ e 2,3 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Essa atividade anti-amastigota parece estar relacionada com o percentual de sesquiterpenos presentes nesses óleos, uma vez que C1 e C4 possuem um maior percentual destas substâncias (81,6 e 80,1, respectivamente) que os óleos comerciais C2 e C3 (28,6% e 40,2%, respectivamente). Os óleos comerciais C2 e C3, que possuem um maior percentual de diterpenos em sua composição (59,4% e 50,2%, respectivamente), apresentaram uma maior atividade anti-promastigota.

β -cariofileno comercial também apresentou um importante efeito anti-amastigota, dose-dependente, com um IC_{50} de 1,3 $\mu\text{g/ml}$. É importante observar que os óleos comerciais que obtiveram melhor atividade anti-amastigota, C1 e C4, também foram aqueles que apresentaram maior quantidade de *trans*- β -cariofileno em sua composição (57,5% e 29,7%), sugerindo que a quantidade deste composto

pode influenciar na maior ou menor atividade leishmanicida do óleo de copaíba. Vale ressaltar que o composto isolado apresentou maior atividade contra os parasitas intracelulares que os óleos comerciais C1 e C4.

Diferentemente do que pode ser observado em outros óleos estudados, os quais apresentaram tanto uma atividade anti-promastigota quanto uma atividade anti-amastigota (Rosa *et al.*, 2003, Ueda-Nakamura *et al.*, 2006, Monzote *et al.*, 2006), C1 e C4 apresentam uma melhor atividade anti-amastigota, sugerindo um efeito estágio-específico dos óleos comerciais nas formas intracelulares, que são as responsáveis pela manutenção da infecção nos hospedeiros vertebrados. A mesma atividade estágio-específica pode ser observada no glucantime, que só é ativo em amastigotas.

A atividade anti-amastigota de C1, C4 e CAR nos levou a estudar se esses óleos poderiam estar potencializando os mecanismos microbicidas dos macrófagos, sem possuir um efeito direto sobre o parasito. Avaliamos a capacidade dos óleos comerciais C1 e C4 e do composto isolado em estimular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, uma importante substância capaz de promover a destruição dos parasitos intracelulares (Sacks & Anderson, 2004). Nossos resultados demonstraram que diferentemente dos óleos de *Croton cajucara* e *Ocimum gratissimum* (Rosa *et al.*, 2003; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006), a morte dos amastigotas intracelulares induzida por C1, C4 e CAR não se deve a um aumento da produção de NO, uma vez que foram incapazes de alterar a produção de NO pelos macrófagos, bem como de potencializar a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados por LPS. A não modulação da atividade microbicida dos macrófagos sugere que o efeito direto de C1, C4 e CAR deve ser estudado, uma vez que já foi demonstrado que óleos essenciais são capazes de causar lesões na mitocôndria núcleo e flagelo de promastigotas de *Leishmania* sp., bem como alterar sua divisão celular (Rosa *et al.*, 2003; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006; Santin *et al.*, 2009).

O óleo comercial C4, além de possuir uma maior atividade anti-amastigota que o C1, também apresentou uma menor citotoxicidade para as células hospedeiras, com um CC₅₀ de 92,4 µg/ml para C4 e 85 µg/ml para C1. O composto isolado (CAR) foi o que apresentou maior citotoxicidade, com um CC₅₀ de 63,9 µg/ml. Contudo, o composto isolado (CAR) foi o que apresentou maior índice de seletividade (IS), sendo 48,9 vezes menos tóxico para as células hospedeiras do que para o parasita,

enquanto que os óleos comerciais C1 e C4 apresentaram um índice de seletividade de 29,3 e 40,1, respectivamente.

Apesar da maior quantidade de *trans*- β -cariofileno, o óleo comercial C1 apresentou menor atividade anti-amastigota e maior toxicidade para os macrófagos que o óleo comercial C4. Os óleos são misturas de substâncias e, portanto, diferenças qualitativas e/ou quantitativas das substâncias encontradas nesses óleos podem justificar a maior toxicidade do óleo comercial C1 ou a possibilidade de um efeito sinérgico ou aditivo entre o cariofileno e outras substâncias encontradas no óleo comercial C4, mas esta suposição precisa ser melhor explorada.

Pelo fato do óleo comercial C4 apresentar maior atividade leishmanicida e menor toxicidade para os macrófagos, decidimos continuar nossos estudos utilizando a amostra C4, obtendo, a partir desta, duas frações: a fração volátil (FV) é a fração que contém os sesquiterpenos e a fração não volátil (FNV), a qual contém os ácidos diterpênicos.

As frações volátil e não volátil apresentaram menor atividade contra os amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* que o óleo comercial C4. Em estudo realizado por Lima e colaboradores (2003) também observou que o fracionamento do óleo de copaíba resultou em frações sesquiterpênica e diterpênica com menor atividade que o óleo de copaíba bruto, sugerindo que a mistura de sesquiterpenos e diterpenos possam apresentar um efeito sinérgico (Lima *et al.*, 2003, Veiga Júnior *et al.*, 2007).

As frações volátil e não volátil também demonstraram ser mais tóxicas para os macrófagos que o óleo comercial C4, de onde foram obtidas, apresentando uma CC_{50} de 65,6 $\mu\text{g/ml}$, 77,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente contra 92,4 $\mu\text{g/ml}$ do óleo C4. Porém, a citotoxicidade das frações foi semelhante a encontrada para o composto isolado cariofileno (63,6 $\mu\text{g/ml}$). As frações, bem como o óleo comercial C4 e o composto isolado cariofileno, somente passaram a interferir na integridade de membrana das células hospedeiras quando estas foram tratadas com uma concentração de 75 $\mu\text{g/ml}$.

Assim como o óleo comercial C4 e o composto isolado cariofileno, as frações volátil e não volátil de C4 não foram capazes de estimular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos tratado, sendo capaz de diminuir a produção de NO pelos macrófagos que foram estimulados por IFN- γ . Veiga Júnior e colaboradores (2007),

em um estudo comparativo utilizando três espécies diferentes de copaíba – *Copaifera cearensis* Huber ex Ducker, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera multijuga* Hyane – também demonstraram que os três óleos de copaíba testados apresentam um significativo efeito inibitório na produção de NO pelos macrófagos. Este resultado sugere que a morte do parasita não se deve ao aumento da produção de substâncias microbidas pelos macrófagos tratados, mas aponta para um possível efeito direto dessas substâncias nos amastigotas intracelulares.

Entretanto mais estudos devem ser realizados para explorar o mecanismo de ação do óleo C4 e do cariofileno responsáveis pela morte do parasita.

Em resumo, nossos estudos apontam o óleo C4 com perfil químico potencial para posterior desenvolvimento de fitomedicamento para leishmaniose, bem como o sesquiterpeno cariofileno, usado para a padronização dos óleos, possui potencial para o desenvolvimento de um composto leishmanicida.

6. CONCLUSÕES:

- Os óleos comerciais C2 e C3, os quais possuem maior percentagem de diterpenos, demonstraram uma melhor atividade contra as formas promastigotas, enquanto que os óleos comerciais C1 e C4, os quais possuem maior percentagem de sesquiterpenos, em particular do composto trans- β -cariofileno, apresentaram um efeito anti-*Leishmania amazonensis* dose dependente e específico para amastigotas.
- Entre os óleos comerciais estudados, o C4 foi aquele que apresentou maior atividade contra as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e menor toxicidade para os macrófagos.
- As frações volátil e não volátil obtidas de C4 apresentaram menor atividade leishmanicida e maior citotoxicidade, sugerindo que a mistura de sesquiterpenos e diterpenos pode possuir um efeito sinérgico ou aditivo na morte do parasito, bem como diminuir a toxicidade para os macrófagos.
- O efeito anti-*Leishmania amazonensis* dos óleos comerciais C1 e C4, bem como as frações de C4 e o cariofileno é independente da produção de NO, sugerindo que a morte dos amastigotas intracelulares

é devido à uma ação direta dessas substâncias sobre os amastigotas intracelulares.

- O óleo comercial C4 apresenta perfil químico com potencial para o desenvolvimento de um fitomedicamento para terapia anti-leishmania, uma vez que foi capaz de resultar em um importante efeito anti-*Leishmania amazonensis* apresentando, ao mesmo tempo, uma menor toxicidade para as células hospedeiras.
- O β -Cariofileno isolado apresentou excelente atividade anti-amastigota dose-dependente, sendo mais tóxico para os parasitas intracelulares que para as células dos mamíferos, sendo um composto em potencial para desenvolvimento e produção de um fármaco com atividade leishmanicida.

Referências Bibliográficas:

ALEXANDER, J., SATOSKAR, A.R., RUSSELL, D.G. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. J. Cell Sci., **112**: 2993

AMATO, V.S., TUON, F.F., BACHA, H.A., NETO, V.A. NICODEMO, A.C. 2008. Mucosal leishmaniosis Current scenario and prospects for treatment. Acta Trop., **105**: 1.

AMBRÓSIO, R. A., ARAKAWA, N. S., ESPERANDIUM V. R., DE ALBUQUERQUE, S., DA COSTA, F. B. 2008. Tripanocidal Activity of Pimarane Diterpenes from *Viguiera arenaria* (Asteraceae). Phytother. Res. **22**: 1413.

ANTHONY, J-P., FYFE, L. SMITH, H. 2005. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? Trends in Parasitol., **21**: 462.

ARRUDA, D.C., MIGUEL, D.C., YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U., KATZIN, A.M. ULIANA, S.R.B. 2009. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. Biomed. Pharmacoth., **63**:643

ASHUTOSH, SUNDAR, S. GOYAL, N. 2007. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. J.Med. Microbiol., **56**: 143.

AWASTHI, A., MATHUR, R.K., SAHA, B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J. Med. Res, **119**: 238.

BERMAN, J. D. 1997. Human Leishmaniasis: clinical and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis., **24**: 684.

BERMAN, J.D. 2003. Current treatment approaches to leishmaniasis. Curr. Opin. Infect. Dis., **16**: 397.

BERMAN, J. D. 2005. Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. Expert Opin. Investig., **14**: 1337.

- BERMAN, J. BRYCESON, A.D.M., CROFT, S., ENGEL, J., GUTTERIDGE, W., KARBWANG, J., SINDERMAN, H., SOTO, J., SUNDAR, S., URBINA, J.A. 2006. Miltefosine: issues to be addressed in the future. The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **100**: 41.
- BASSELIN, M., DENISE, H., COOMBS, G.H. BARRETT, M. 2002. Resistance to Pentamidine in *Leishmania mexicana* Involves Exclusion of Drug from Mitochondrion. Antimicrob. Agents and Chemother., **46**: 3731.
- BATES, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigote by phlebotomine sand flies. Int. J. Parasitol., **37**: 1097.
- BATES, P.A. & ROGERS, M.E. 2004. New insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. Current Molecular Medicine, **4**: 601.
- BOGDAN, C, RÖLLINGHOFF, M. 1997. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. Int. J. Parasitol **28**: 121.
- CARVALHO, J.C.T., CASCON, V., POSSEBON, L.S., MORIMOTO, M.S.S., CARDOSO, L.G.V., KAPLAN, M.A.C., GILBERT, B. 2005. topical anti-inflammatory and analgesic activities of *Copaífera dukei* Dwyer. Phytoter. Res., **19**: 946.
- CASON, V. GILBERT, B. 2000. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaífera guianensis* Desf., *Copaífera dukei* Dwyer and *Copaífera multijuga* Hayne. Phytochem. **55**:773.
- CHAN-BACAB, M.J., PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M. 2001. Plants natural products with leishmanicidal activity. Nat. Prod. Rep., **18**: 674.
- CHANG, K.P. FONG, D. 1983. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. Ciba Found. Symp., **99**: 113.
- COWAN, M.M. 1999. Plants products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. **12**: 564.
- CROFT S. L., SNOWDON D., YARDLEY V. 1996. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. J Antimicrob Chemother. **38**:1041
- CROFT, S., SUNDAR, S. FAIRLAMB, A.H. 2006. Drug resistance in Leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev., Vol. 19, No.1, p. 11.
- CROFT, S.L. ENGEL, J. 2006. Miltefosine – discovery of antileishmanial activity of phospholipid derivatives. Trans R Soc Trop Med Hyg. **100** Suppl 1:S4
- DA SILVA, H.H.G., GERIS, R., RODRIGUES FILHO, E., ROCHA, C., DA SILVA, I.G. 2007. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plants *Copaífera reticulada* Duke (Leguminosae – Caesalpinoideae). Against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **40**: 24.
- DAS V.N.R., PANDEYK., VERMA N., LAL, C.S., BIMAL, S., TOPNO R.K., SINGH, D., SIDDIQUI, N. A., VERMA R.B., DAS, P. 2009. Development of Post-kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) in Miltefosine-Treated Visceral Leishmaniasis. Am. J. Med. Hyg., **80** (3), 336.
- DESJEUX, J. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiol. Infect. Dis., **27**: 305.
- DENTON, H., Mc GREGOR, J.C. COOMBS, G.H. 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. Biochem.J., **381**, 405.
- DEMICHELLI, C., OCHOA, R., DA SILVA, J. B. B., FALCÃO, C. A. B., ROSSI-BERGMANN, B., DE MELO, A. L., SINISTERRA, R. D. FRÉZARD, F. 2004. Oral delivery of meglumine antimoniate- β -cyclodextrin complex for treatment leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother., **48**: 100.

- DUEÑAS-ROMERO, A.M., LOISEAU, P.M. SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. 2007. Interection of sitamaquine withy membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigote. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**: 246.
- DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2010. Doenças Negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Rev. Saúde Pública* **44** (1): 200.
- FAGHIHI, G. KIA, T. 2003. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. *Clin. Dermatol.* **28**: 13.
- FERNANDES, F.F. FREITAS, E.P.S. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaífera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against os southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, **147**: 150.
- FERREIRA, C. S., MARTINS, P.S., DEMICHELI, C., BROCHU, C., OULLETTE, M. FRÉZARD, F. 2003. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): A comparative study withy trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals*, **16**: 441.
- FOKIALAKIS, N., KALPOUTZAKIS, E., LAT TEKWANI, B., SKALTSOUNIS, A. L., DUKE, S. O. 2006. Atilishmanial activity of natural diterpene from *Cistus* sp. And semisynthetic derivatives thereof. *Biol. Pharm. Bull* **29**: 1775.
- GHELARDINI, C., GALEOTTI, N., DI CESARE MANELLI, L., MAZZANTI, G., BARTOLINI, A. 2001. Local anaesthetic activity of β -Caryophyllene. *IL Farmaco* **56** 387.
- GILBERT, B., FERREIRA, J. L. P., ALMEIDA, M.B.S., CARVALHO, E. S., CASON, V., ROCHA, L. M. 1997. The official use of medicinal plants in public health. *Ciênc. Cult.*, **49**: 339.
- GOMES, N.M., REZENDE, C.M., FONTES, S.P., MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D. 2007. Antinociceptive activity of Amazonian *Copaíba* oils. *J. Ethnopharmacol.*, **109**: 486.
- GOTTLIEB, O.R., MAGALHÃES, M.T. 1960. Modified distillation trap. *Chemist-Analyst.* **49**: 114
- GUERIN, P.J., OLLIARO, P., SUNDAR S., BOELAERT M., CROFT S.L., DESJEUX P., WASUNNA, M.K. BRYCESON, D.M. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda., *Lancet Infect. Dis.*, **2**: 494.
- HART, D.T., LAUWERS, W.J., BOSSCHE, H.V., OPPERDOES, F.R. 1989. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana* infected macrophages., *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**: 123.
- HOWARD MK, PHAROAH MM, ASHALL F, MILES MA. 1991. Human urine stimulates growth of *Leishmania in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **85**:477
- IWU, M.M., JACKSON, J.E. SCHUSTER, B.G. Medicinal Plants in the Fight Against Leishmaniasis. 1994. *Parasitol. Today*, **10**: 65.
- KAYSER, O., KIDERLEN, A.F. CROFT, S.L. 2003. Natural Products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res.*, **90**: 55.
- LIEW, F.Y., WEI, X.Q., PROUDFOOT, L. 1997. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Phil. Trans. Lond. B.*, **352**: 1311.
- LIMA, S.R.M., VEIGA JUNIOR, V.F., CHRISTO, H.B., PINTO, A.C., FERNANDES, P.D. 2003. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaífera multijuga* Hayne and its fractions. *Phyther. Res.* **17**, 1048.

- LIU, H; DREW, P; GAUGLER, A. C; CHENG, Y. VISNER, G. A. 2005. Pirfenidone inhibits lung allograft fibrosis through L-arginine-arginase pathway. *Am. J. Transplant.*, **5**:1256.
- LIRA R, CONTRERAS LM, RITA RM, URBINA JA. 2001. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J Antimicrob Chemother.* **47**:537.
- MBONGO, N., LOISEAU, P.M., BILLION, M.A. ROBERT-GERO, M. 1998. Mechanism of Amphotericin B Resistance in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **42**: 352.
- MÉNEZ C., BUYSE M., BESNARD M., FARINOTTI R., LOISEAU P.M., BARRATT G. 2006. Interaction between miltefosine and amphotericin B: consequences for their activities towards intestinal epithelial cells and *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**:3793
- MINODIER, P., ROBERT, S., RETORNAZ, K., GARNIER, J.M. 2003. Liposomal Amphotericin B in treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Fundam. Clin. Pharmacol*, **17** : 183.
- MISHRA, B.B., SINGH, R.K., SRIVASTAVA, A., TRIPATHI, V.J., TIWARI, V.K. 2009. Fighting Against Leishmaniasis: Search of Alkaloids as Future True Potential Anti-Leishmanial Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **9**: 107.
- MISHRA, J., SAXENA, A. SINGH, S. 2007. Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. *Curr. Med. Chem.*, **14**: 1153.
- MURRAY, H.W. 2004. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Ame.J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 787.
- MONZOTE, L., MONTALVO, A.M., SCULL, R., MIRANDA, M., ABREU, J. 2006. Activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grow in Cuba against *L. amazonensis*. *Chemother.*, **52**: 130.
- MONZOTE, L., MONTALVO, A.M., SCULL, R., MIRANDA, M., ABREU, J. 2007a. *In vitro* activity of essential oil against *Leishmania donovani*. *Phytother. Res.*, **21**: 1055.
- MONZOTE, L., MONTALVO, A.M., SCULL, R., MIRANDA, M., ABREU, J. 2007b. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralésional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. *Biomed. Pharmacother.*, **61**: 148.
- NWAKA S, HUDSON A. 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **5**: 941.
- NEVES, D.P., MELO, A. L. DE, LINARDI, P.M., VITOR, R.W.A. 2005. *Parasitologia Humana*, 11ª edição. São Paulo. Ed. Atheneu, 47.
- OLIVEIRA, V.C.S., MOURA, D.M.S., LOPES, J.A.D., DE ANDRADE, P.P., DA SILVA, N.H., FIGUEIREDO, R.C.B.Q. 2008. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (CD) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure os *Leishmania chagasi* promastigote. *Parasitol. Res.*, **104**: 1053.
- OULLETTE, M., DRUMMELSMITH, J. PAPADOPOULOU, B. 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Update*, **7**: 257.
- PAIVA, L.A.F. RAO, V.S.N. GRAMOSA, N.V. SILVEIRA, E.R. 1998. Gastroprotective effect of *Copaífera langsdorffii* óleo-resin on experimental gastric ulcer model in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **62**: 73.
- PALUMBO, E. 2008. Oral Miltefosine Treatment in Children with Visceral Leishmaniasis: A Brief Review. *Braz. J. Infect. Dis.* **12**: 2.

- PARIS, C; LOISEAU, P. M. BORIES, C. 2004. Miltefosine induced apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 852.
- PIMENTA, P.F. TURCO, S.J. Mc CONVILLE, M.J. LAWYER, P.G. PERKINS, P.V. SACKS, D.L. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, **256**: 1812.
- PIRSON, P., LECLEF, B., TROUET, A. 1990. Activity of Ketoconazole derivatives against *Leishmania Mexicana amazonensis* within mouse peritoneal macrophages. *Annu. Trop. Med. Parasitol.*, **84**: 133.
- RASMUSSEN, B. DESCOTEAUX, A. 2004. Contribution of Electron and Confocal Microscopy in the Study of *Leishmania*-Macrophage Interactions. *Microscopy and Microanalysis*, **10**: 656.
- REITHINGER, R., DUJARDIN, J-C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.*, **7**: 581.
- RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C., WADT, P.G.S, WADT, L.H.O. 2004. Copaíba: Ecologia e Produção de óleo-resina. *Embrapa Acre. Documentos*, 91. 28p.
- ROBERTS, L.J., HANDMAN, E. FOOTE, S.J. 2001. Science, medicine, and the future leishmaniasis. *British Med. J.*, **321**: 801.
- ROCHA, L.G., ALMEIDA, J.R.G.S., MACÊDO, R.O., BARBOSA-FILHO, J.M. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomed.*, **12**: 514.
- RODRIGUES, J.C.F., ATTIAS, M., RODRIGUEZ, C., URBINA, J.A., DE SOUZA, W. 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22, 26 azasterol, $\Delta^{24(25)}$ – sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**: 487.
- ROSA, M.S.S., MENDONÇA-FILHO, R.R., BIZZO, H.R., RODRIGUES, I.A., SOARES, R.M., SOUTO-PADRÓN, T., ALVIANO, C.S., LOPES, A.H.C.S. 2003. Antileishmanial Activity of Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**: 1895.
- SACKS, D.L. ANDERSON, C. 2004. Re-examination of the immunosuppressive mechanism mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol. Rev.*, **201**: 225.
- SAHA, S., MONDAL, S., BANERJEE, A., GHOSE, J., BHOWMICK, S., ALI, N. 2006. Immune responses in Kala-azar. *Indian J. Med. Res.*, **123**: 245.
- SANTIN, M.R., DOS SANTOS A.O., NAKAMURA C.V., DIAS FILHO, B.P., FERREIRA I.C., UEDA-NAKAMURA, T. 2009. In vitro activity of of essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* **105**: 1489.
- SANTOS, A., BIZZO, H.R., ANTUNES, A.M.S., D'AVILA, I.A. 2006. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. *Rev. Bras. Pl. Méd., Botucatu*, **8**: 14.
- SANTOS, D.O., COUTINHO, C E.R, MADEIRA, M.F., BOUTINHO, C.G., VIEIRA, R.T., NASCIMENTO, S.B., BERNARDINO, A., BOURGUIGNON, S.C., CORTE-REAL, S., PINHO, R.T., RODRIGUES, C.R. CASTRO, H.C. 2008a. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.*, **13**: 1.
- SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA. 2008b. Antimicrobial activity of Brazilian copaíba oils obtained from different species of the *Copaífera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **113**: 277.
- SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. 2008c. Effect of Brazilian copaíba oils on *Leishmania amazonensis*. *J. Ethnopharmacol.*, **120**: 204.

- SEN, R., BANDYOPADHYAY, S., DUTTA, A., MANDAL, G., GANGULY, S., SAHA, P., CHATTERJEE, M. 2007. Artemisin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. J. Med. Microbiol., **56**: 1213.
- SERENO, D., HOLZMULLER, P., MANGOT, I., CUNY, G., OUAISSI, A., LEMESRE, J.L. 2001. Antimonial mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 3097.
- SINGH, S., SIVAKUMAR, R. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. J. Infect. Chemother, **10**: 307.
- SÜLSEN, V. P., FRANK, F. M., CARZOLA, S. I., ANESINI, C. A., MALCHIODI, E. L., FREIXA, B., VILA, R., MUSCHIETTI, L. V. MARTINO, V. S. 2008. Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Sesquiterpenes Lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (*Asteraceae*). Antimicrob. Agents Chemother., **52**: 2415.
- SACKS, D. & NOBEN-TRAUHT, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat. Rev. Immunol **2**: 845.
- STUART, K., BRUN, R., CROFT, S., FAIRLAMB, A., GÜRTLER, R.E., MCKERROW, J., REED, S., TARLETON, R. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J. Clin. Invest., **118**: 1301.
- TAPPIN, M.R.R, PEREIRA, J.F.G., LIMA, L.A., SIANI, A.C., MAZZEI, J.L., RAMOS, M.F.S. 2004. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. Quim. Nova, **27**: 236.
- TIUMAN, T.S., UEDA-NAKAMURA, T., CORTEZ, D.A.G., FILHO, B.P.D., MORGADO-DÍAZ, J.A., DE SOUZA, W., NAKAMURA, C.V. 2005. Antileishmanial Activity of Parthenolida, a Sesquiterpene Lactone Isolate from *Tanacetum parthenium*. Antimicrob. Agents Chemother., **19**: 176.
- TRACY, J.W., WEBSTER JR., L.T. 1996. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Tripanomiasis, leishmaniasis, amebiasis, giardiasis, trichomoniasis and other protozoal infections. In: Hardman, J. G., Gilman, A. G., Limbird, I. E., ed. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th edition. McGraw-hill companies, inc (publishers). 987.
- TRIPATHI, P., SINGH, V., NAIK, S. 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. Immunol. Med. Microbiol, **51**: 229.
- UEDA-NAKAMURA, T., MENDONÇA-FILHO, R. R., MORGADO-DÍAZ, J. A., MAZA, P. K., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., ALVIANO, D. S., ROSA, M. S. S., LOPES, A. H. C. S., ALVIANO, C. S., NAKAMURA, C. V. 2006. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. Parasitol. Int., **55**: 99.
- VANNIER-SANTOS, M.A., MARTINY A., DE SOUZA W. 2002. Cell biology of *leishmania* spp.: invading and evading. Curr. Pharm. Des., **8** (4): 297.
- VEIGA JÚNIOR, V.F., ZNINO, L., CALIXTO, J.B., PATITUCCI, M.L., PINTO, A.C. 2001. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaíba oils available in Brazil. Phytother. Res., **15**: 476.
- VEIGA JÚNIOR, V.F., PINTO, A.C. 2002. O gênero *Copaífera* L. Quím.Nova. **25**: 273.
- VEIGA JÚNIOR, V.F. O Gênero *Copaífera*. Estudos fitoquímicos de 8 espécies classificadas e 127 óleos de copaíba. Tese de Doutorado. Instituto de Química – UFRJ, 2004. 398p.
- VEIGA JÚNIOR, V.F., ROSAS, E.C., CARVALHO, M.V., HENRIQUES, M.G.M.O, PINTO, A. C. 2007. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaíba oils from *Copaífera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaífera reticulata* Ducke and *Copaífera multijuga* Hayne – A comparative study. J. Ethnopharmacol., **112**: 246.

VERCESI A.E. & DOCAMPO R. 1992. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem J.*, **284** (Pt 2):463.

ZHOU, Y., MESSIER, N., OUELLETTE, M., ROSEN, B.P., MUKHOPADHYAY, R. 2004. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimonial reductase that's confers sensitivity to the drug pentostan. *J. Biol. Chem.* **279(36)**: 37445.

ZVULLUNOV, A., KLAUS, S., VARDY, D. 2002. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *New Engl. J. Med.*, 347.

WADHONE P., MAITI M., AGARWAL R., KAMAT V., MARTIN S., SAHA B. 2009. Miltefosine promotes IFN-gama- dominated anti-leishmanial immune response. *J. Immunol.* **182**: 7146.

WADT, L.H. DE O., DE JÁUREGUI, K, M. C.H., DE ARAÚJO, E.A., FELINTO, A.S., VIEIRA, A.H., BENTES-GAMA, M. 2007. Efeito do tipo e época de extração na produção do óleo-resina de Copaíba. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Minas Gerais , Caxambu.*

WRIGHT, C.W.A. PHILLIPSON, J.D. 1990. Natural Products and Development of Selective Antiprotozoal Drugs. *Phytother. Res.*, **4**: 127.

www.arvores.brasil.nom.br/esq.htm

www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao_em_pauta_6_doencas_negl.pdf

www.saude.gov.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)