

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e
Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS
BRASILEIRAS NA BUSCA DE PROTÓTIPOS A FÁRMACOS COM
ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL**

**Belo Horizonte
2015**

Paula Souza Lage de Carvalho

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS
BRASILEIRAS NA BUSCA DE PROTÓTIPOS A FÁRMACOS COM
ATIVIDADE ANTILEISHMANIAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor junto ao referido Programa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Co-Orientadores: Prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares – UFMG

Prof. Dr. João Paulo Viana Leite – UFV

Belo Horizonte

2015

Carvalho, Paula Souza Lage de.

Avaliação de compostos derivados de plantas brasileiras na busca de protótipos a fármacos com atividade antileishmanial [manuscrito] / Paula Souza Lage de Carvalho. - 2015.

125 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Co-orientadores: Carlos Alberto Pereira Tavares, João Paulo Viana Leite.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmanioses - Tratamento - Teses. 2. Toxicidade - Teses. 3. Strychnos pseudoquina. 4. Strychnobiflavona. 5. Biodistribuição. 6. Medicina - Teses. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Tavares, Carlos Alberto Pereira. III. Leite, João Paulo Viana. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. V. Título.

CDU:616.993.16

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

PRÓ-REITORA DE PESQUISA: Prof. Dr. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR: Prof. Dr. Humberto José Alves

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dra. Sandhi Maria Barreto

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Dra. Ana Cristina Cortes

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADOR: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO

Professora Dra. Denise Utsch Gonçalves

Professora Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Professor Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Professor Dr. Vandack Alencar Nobre Junior

Lourena Emanuele Costa (Representante Discente)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses, no Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, da Universidade Federal de Minas Gerais; sob a orientação do prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho e co-orientação dos profs. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares (UFMG) e prof. Dr. João Paulo Viana Leite (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa).

COLADORADORES

Prof. Dr. André Gustavo Tempone¹

Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua²

Prof. Dr. José Dias de Souza Filho³

Profa. Dra. Simone Odília Fernandes Diniz⁴

Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso⁵

1. Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.
2. Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.
3. Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.
4. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.
5. Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

SUPORTE FINANCEIRO

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Nano-Biofarmacêutica.
- COLTEC/UFMG.

*D*edico esse trabalho ao Léo pelo incansável estímulo, compreensão, paciência e acima de tudo pelo amor. Verdadeiro companheiro que muitas vezes largou mão de seus desejos para que eu atingisse os meus.

*A*os meus queridos filhos, Guilherme e Tiago, que me transformam diariamente em uma eterna aprendiz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

Aos meus pais por serem exemplo de amor, paciência, honestidade e por me ensinarem a jamais desistir diante das adversidades.

Ao doutor Eduardo, pela orientação, pelos ensinamentos, disponibilidade e por acreditar que eu seria capaz de fazer um bom trabalho.

Ao doutor Carlos Alberto, por sua orientação, por seus ensinamentos, pela sua simplicidade e convívio.

Ao doutor João Paulo, por sua disponibilidade, por seus ensinamentos e acima de tudo pela sua confiança e calma.

Ao Dr. André Tempone, pelos ensinamentos, disponibilidade e convívio.

A Dra. Simone Odília, pelos ensinamentos, conversas, disponibilidade, convívio e paciência.

Ao Dr. Valbert Cardoso,

elos ensinamentos e por ter abertos as portas do seu laboratório para mim.

Aos professores da Pós-Graduação, por seus ensinamentos e convivência; principalmente ao Prof. Manoel Otávio, pela confiança, convívio e por despertar em mim o desejo de aprender cada vez mais, à Profa. Denise Gonçalves pelos seus ensinamentos, confiança e disponibilidade no ambulatório e ao Prof. Vandack Nobre pelo convívio e confiança.

Ao Miguel Fumagalli, pela amizade, convívio, por todos os ensinamentos, por ser um peruano desafiador e principalmente pelos momentos de discussões.

Ao Pedro, pela colaboração, pela disponibilidade e pelo carinho, por ter sido um aluno de iniciação dedicado e desafiador.

Aos amigos da Pós-Graduação, pelo convívio, ensinamentos e confiança durante esses anos nos quais fui representante discente, principalmente ao doutorando João Cioglia, pelo convívio e ensinamentos no ambulatório.

Aos amigos do laboratório: Dr. William Regis, Tatiana Ribeiro, Mônica Schneider, Vivian Tamietti, Lourena Costa, Nathália Cristina, Daniela Pagliara, Leticia Lage, Ana Maria, Luciana Campos, Diogo Valadares, Isabela, Mariana Costa, pela convivência, pelos momentos de descontração, pelo apoio e amizade.

À Juliana Tonini, Tatiana, Lígia, Marta, Thaís, Daiane, Matilha, Vicente que sempre me receberam com tanto carinho no laboratório de Pesquisa em Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, pelos ensinamentos, conversas e convívio.

À Júlia Albernaz, pela amizade, pelos momentos de distração e confiança.

À Jussara Magalhães, secretária do programa de Pós- Graduação, por estar sempre disponível, pela paciência, pela disponibilidade e pela convivência.

Ao Léo e aos meus filhos pelo amor, apoio, atenção, companheirismo e paciência e acima de tudo por compreender todos os momentos de ausência. Nunca terei as palavras corretas para agradecer vocês.

Ao meu sogro Francisco e minha sogra Leíse pela confiança, por muitas vezes cobrir minha ausência e pelo amor.

À Zaia por cuidar dos meus filhos e do meu marido com tanto amor e dedicação e a Virgínia por cobrir minhas ausências com os meninos, sempre disponíveis em cuidar deles.

A minha irmã Roberta, pelo amor, confiança e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, Malu, Tiago, Daniel, Guilherme e Luana pelos momentos de descontração, incentivo e por terem feito parte dessa jornada.

À tia Sandra, Evelyn, Rafa, Andrey, Gael e Diogo, minha segunda família, pelo amor, confiança e compreensão.

A Tia Iná, pela colaboração, incentivo e carinho.

À Dani, Gaby, Tatá e Lora, irmãs que a vida me deu, pelo convívio, pela paciência e amizade.

Ao Zé Du e à Carol, pela amizade, estímulo, conversa e convívio.

Ao Douglas Soltau e família, pela amizade, convívio e ensinamentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Os três grandes fundamentos para se conseguir qualquer coisa são, primeiro, trabalho árduo; segundo, perseverança; terceiro, senso comum.”

Thomas Edison

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são endêmicas em 98 países. Os antimoniais pentavalentes, Pentostam® (estibogluconato de sódio) e Glucantime® (antimoniato de meglumina), são os medicamentos de primeira escolha no tratamento. No entanto, seu uso contínuo pode provocar nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e toxicidade hepática. Medicamentos alternativos incluem pentamidina, anfotericina B (também em formulações lipídicas), paromomicina e miltefosina. No entanto, apresenta alta toxicidade e custo elevado e a miltefosina contém um agente teratogênico. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antileishmanial de extratos de plantas brasileiras, como novas alternativas, que apresentem baixa toxicidade, com vistas no emprego do tratamento das leishmanioses. As espécies *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata*, *Psychotria suterella* e *Strychnos pseudoquina* foram avaliadas por meio de experimentos *in vitro* com a espécie *Leishmania amazonensis*. A espécie *S. pseudoquina* foi a que apresentou a melhor atividade biológica. Realizou-se um fracionamento biomonitorado desta planta e foram isolados dois flavonoides, 3-O-metil éter quercetina e Strychnobiflavona. Ensaio *in vitro* com Strychnobiflavona demonstraram que o flavonoide foi efetivo contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, e apresentou baixa toxicidade em macrófagos e em hemácias humanas do grupo O⁺. Estudos de biodistribuição *in vivo* realizados em camundongos não infectados demonstraram a presença do composto no fígado e baço dos animais. Os resultados também indicaram atuação do produto ao nível mitocondrial na espécie *L. infantum*, sendo este um provável mecanismo de ação do flavonoide. Dessa forma, pode-se concluir que a espécie *S. pseudoquina* apresenta atividade antileishmanial e que o flavonoide Strychnobiflavona é um dos principais responsáveis por tal ação; com potencial de ser explorado no tratamento das leishmanioses.

Palavras-chaves: Leishmanioses, tratamento, toxicidade, *Strychnos pseudoquina*, Strychnobiflavona, ex vivo biodistribuição.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and are endemic in about 98 countries worldwide. The pentavalent antimonials, Pentostam® (sodium stibogluconate) and Glucantime® (meglumine antimoniate), became the first-line drugs for treatment. However, its continued use causes Nephrotoxicity, Cardiotoxicity and hepatic toxicity. Alternative line drugs include pentamidine, amphotericine B (also in lipid formulations), paromomycin, and miltefosine. However, it have high toxicity and high cost and the mitelfosine is a teratogenic agent. Thus, the aim of this study was to evaluate the antileishmanial activity of some brazilian plants, in order to seek new alternatives, with lower toxicity, to use on leishmaniasis treatment. *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata*, *Psychotria suterella* and *Strychnos pseudoquina* species were evaluated on *in vitro* experiments against *Leishmania amazonensis*. The *Strychnos pseudoquina* species showed the best biological activity. A bioactivity-guided fractionation was carried out and two flavonoids, quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone, were isolated. *In vitro* assays with Strychnobiflavone flavonoid demosntrated its effectiveness against *L. amazonensis* and *L. infantum*, for promastigotes forms and it showed a very low toxicity in murine macrophages and in human erythrocytes. *In vivo* biodistribution studies done on healthy BALB/c, showed an accumulation of the drug in the animal liver and spleen. The results also indicated the product presence in the mitochondrial level of the species *L. infantum*, as a possible mechanism of action of flavonoid. Thus, we can conclude that the species *S. pseudoquina* presents antileishmanial activity and Strychnobiflavone are mainly responsible for such action in the plant; so it could be use in the future to improve the treatment of leishmaniasis. Keywords: Leishmaniasis, treatment, toxicity, *Strychnos pseudoquina*, Strychnobiflavone, *ex vivo* biodistribution.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Triagem realizada para avaliação de candidatos a fármacos contra as leishmanioses	19
FIGURA 2 - Incidência mundial da leishmaniose tegumentar	29
FIGURA 3 - Incidência mundial de leishmaniose visceral	29
FIGURA 4 - Casos de leishmaniose tegumentar	30
FIGURA 5 - Número de casos da leishmaniose tegumentar no Brasil	30
FIGURA 6 - Casos de leishmaniose visceral	31
FIGURA 7 - Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil	31
FIGURA 8 - Forma promastigota de <i>Leishmania spp.</i>	32
FIGURA 9 - Forma amastigota de <i>Leishmania spp.</i>	32
FIGURA 10- Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial	33
FIGURA 11 - Esquema ilustrativo da localização da mitocôndria e cinetoplasto no parasito <i>Leishmania spp.</i>	34
FIGURA 12 - Classificação clínica e agentes etiológicos da leishmaniose Tegumentar no Brasil	36
FIGURA 13 - Estrutura química do antimoniato de N-metil glucamine	39
FIGURA 14 - Esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela Organização Mundial da Saúde para o antimoniato de N-metil glucamine	40
FIGURA 15 - Estrutura química da Anfoterinina B	41
FIGURA 16 - Estrutura química da Pentamidina	42
FIGURA 17 - Estrutura química da Miltefosina	43
FIGURA 18 - Estrutura química da Paramomicina	43

FIGURA 19 - Novas Entidades Químicas descritas de 01/1981-06/2006	46
FIGURA 20 - Domínio do Cerrado e áreas de transição no Brasil	49
FIGURA 21 - Espécie <i>Alchornea glandulosa</i>	51
FIGURA 22 - Espécie <i>Miconia lategrenata</i>	52
FIGURA 23 - Espécie <i>Psychotria suterella</i>	53
FIGURA 24 - Espécie <i>Strychnos pseudoquina</i>	54
FIGURA 25 - Fracionamento cromatográfico da espécie <i>Strychnos pseudoquina</i>	63
FIGURA 26 - Distribuição do TCO ₂ e TCO ₄ ⁻ em Sílica	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Fármacos com ação antimicrobiana, antiparasitária e antiviral desenvolvidos nos últimos 25 anos	47
TABELA 2 - Fármacos antiparasitários de origem natural ou derivados	47
TABELA 3 - Espécies de plantas do Domínio do Cerrado e da Mata Atlântica no Brasil com propriedades farmacológicas ativas	51
TABELA 4 - Atividade antileishmanial e citotoxicidade das espécies de plantas avaliadas	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC ₅₀	Concentração da amostra necessária para inviabilizar 50% de macrófagos
CEBIO	Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DMSO	Dimetil sulfóxido
ERos	Espécies reativas de oxigênio
Fc- γ	Receptor Fc gamma
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCL	Ácido clorídrico
HUFU	Herbário Uberlandense
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC ₅₀	Concentração da amostra necessária para inviabilizar 50% de parasitos
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IS	Índice de Seletividade

GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos
EV	Via Endovenosa
IM	Via Intramuscular
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea-Difusa
LT	Leishmaniose tegumentar
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
μM	microMolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-feniltetrazolium bromídeo
PA	Produto Analítico
PR	Pureza radioquímica
%DI/g	Porcentagem da dose injetada por grama de tecido
R123	Rodamina 123
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sb^{3+}	Antimônio trivalente
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de estanho II
RPMI-PR-	Roswell Park Memorial Institute - Phenol Red Negativo
TNF - alfa	Fator de Necrose Tumoral - alfa
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	18
INTRODUÇÃO	22
REVISÃO DE LITERATURA	26
OBJETIVOS	58
MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1. Pesquisa bibliográfica	61
4.2. Animais de experimentação	61
4.3. Parasitos	61
4.4. Coleta e identificação do material vegetal	62
4.5. Estudo fitoquímico biomonitorado do extrato de <i>S. pseudoquina</i>	62
4.6. Ensaio de atividade antileishmanial sobre formas promastigotas de <i>Leishmania spp.</i>	63
4.7. Citotoxicidade em macrófagos murinos	64
4.8. Cálculo do índice de seletividade	65
4.9. Tratamento de macrófagos infectados	65
4.10. Ensaio de inibição da infecção de macrófagos	66
4.11. Atividade hemolítica	66
4. 12. Avaliação dos mecanismos de ação em promastigotas de <i>L. infantum</i>	66
4.12.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática	66
4.12. 2. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	67
4.12.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	68
4. 13. Radiomarcagem de Strychnobiflanova e pureza radioquímica	68
4.14. Estudos <i>in vivo</i> de biodistribuição	70
4.15. Imagens cintilográficas	70
4.16. Análises estatísticas	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
RESUMO DOS RESULTADOS	75
CONCLUSÃO	77
PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO	79
REFERÊNCIAS	82

ANEXOS

97

APÊNDICES

99

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Contextualização da História acadêmica do Aluno

Sou graduada em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais e com início na carreira acadêmica como aluna de iniciação científica no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Instituto de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. Apresentei, ao final da graduação, a monografia intitulada “Análise de receptores Fc-gamma na superfície de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos portadores de diferentes formas clínicas da Doença de Chagas”, sob a orientação do prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho e co-Orientação da profa. Dra. Danielle Marquete Vitelli Avelar.

Posteriormente, iniciei o mestrado na Faculdade de Medicina no Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral, e concluí a dissertação intitulada “Expressão de receptores Fc- γ em leucócitos de portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas”, tendo sido orientada pela profa. Dra. Silvana Maria Elói Santos e co-orientada pelo prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho.

O presente trabalho foi redigido conforme a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013, que regulamenta o formato dos trabalhos finais e de qualificação, estabelecendo condições para a marcação da defesa de teses e dissertações junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da UFMG.

Como surgiu a hipótese do projeto

Durante o período como professora substituta no COLTEC, no Setor de Biologia, conheci o prof. Dr. Eduardo Coelho, que orientava alunos de graduação e pós-graduação no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses. A ideia de iniciar um trabalho na área de tratamento das leishmanioses surgiu após algumas conversas e orientações do mesmo, além de uma revisão bibliográfica que fiz sobre o assunto.

Durante esse período, houve uma proposta de colaboração com o prof. Dr. João Paulo Viana Leite, da Universidade Federal de Viçosa; como parte de um

estudo no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro denominado de PROGRAMA DE BIOPROSPECÇÃO E USO SUSTENTÁVEL DOS RECURSOS NATURAIS DA SERRA DO BRIGADEIRO a flora medicinal. Neste projeto, plantas consumidas pelos primatas e que não apresentavam valor nutritivo para eles foram selecionadas. Então, foram realizados estudo químico-farmacológico destas. Então, com a parceria formalizada, extratos e frações das plantas *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata*, *Psychotria suterella* e *Strychnos pseudoquina* foram enviados para a realização dos testes biológicos. Simultaneamente, foram realizados estudos com a população regional e houve a coleta de relatos denotando o consumo dessas plantas pelos nativos da região, com fins medicinais.

Etapas executadas pela discente

O projeto foi desenvolvido a partir da análise das amostras de extratos e frações de plantas enviadas ao laboratório, na busca de novos fármacos para tratamento às leishmanioses. Após sete meses do início do trabalho, participei do processo seletivo na Faculdade de Medicina no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, na linha de pesquisa de leishmaniose visceral e fui aprovada, iniciando o doutorado em março de 2012.

Com as amostras enviadas para os testes, realizei o protocolo de triagem (FIG. 1) para avaliar os possíveis candidatos a fármacos contra as leishmanioses.

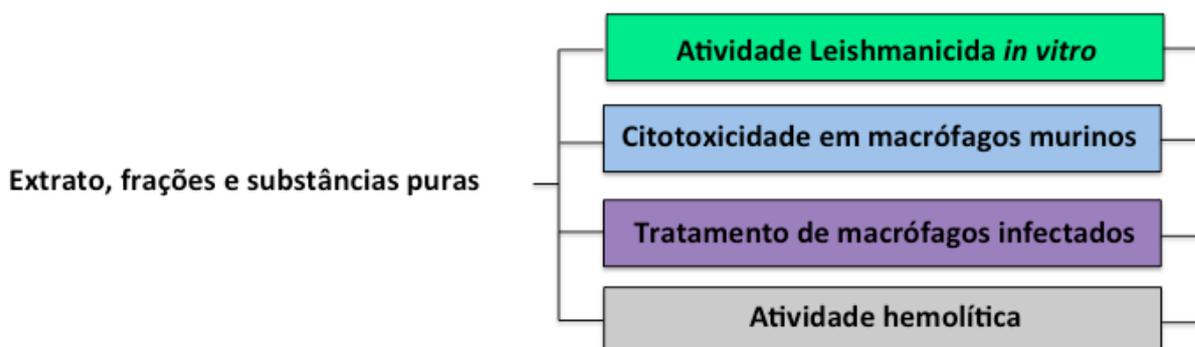


FIGURA 1- Triagem realizada para avaliação de candidatos a fármacos contra as leishmanioses.

Ao término dos experimentos, extrato da espécie *Strychnos pseudoquina* apresentou os melhores resultados de atividade antileishmanial, e uma patente nacional foi depositada com os dados obtidos (Anexo 1), além um artigo científico publicado no periódico “*Evidence based Complementary and Alternative Medicine*”, classificado à época pelo “Qualis Capes”, na área de Medicina II, como índice A1 (Apêndice 1). Após esta publicação, preparei o manuscrito para o exame de qualificação e o exame foi realizado em 22 de novembro de 2013, com aprovação.

Continuei com as análises experimentais desse estudo e realizei ensaios de biodistribuição *in vivo* com o flavonoide identificado na espécie *S. pseudoquina* e investiguei o provável mecanismo de ação deste composto sobre a espécie *L. infantum*. Os dados foram processados e um artigo científico encontra-se em fase final de preparação para submissão na revista *European Journal of Medicinal Chemistry*, “Qualis Capes”, na área de Medicina II, como índice A2 (Apêndice 2).

Ao mesmo tempo, iniciei minha participação no projeto de pesquisa intitulado “Avaliação longitudinal clínica, parasitológica e imunológica de indivíduos com leishmaniose tegumentar humana na região metropolitana de Belo Horizonte”, no qual realizei o acompanhamento dos pacientes, colhendo amostras biológicas e coletando informações da clínica destes indivíduos, nos prontuários. Os pacientes foram avaliados quanto à clínica e, posteriormente, realizou-se a análise de anticorpos IgG total e IgG1 antes e após o tratamento, além da avaliação do perfil sérico de citocinas pró- (TNF-alfa, IFN-gama e IL-2) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-6 e IL-10) nos pacientes. Esse trabalho gerou a confecção de um artigo científico, que encontra-se em fase final de formatação para posterior submissão.

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania* (ASHFORD et al., 1992; MORI-YASUMOTO et al., 2012), sendo consideradas como uma das seis doenças tropicais negligenciadas mais importantes no mundo (WHO, 2010; LOZANO et al., 2012; PIGOTT et al., 2014). No Brasil, existem cerca de sete espécies que podem causar as doenças no homem, sendo que, dessas, seis (*Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lansoni*, *L. shawii* e *L. naiffi*) são responsáveis pelos casos de leishmaniose tegumentar (LT), enquanto a *L. infantum* é responsável pelos casos de leishmaniose visceral (LV).

A LT pode apresentar três manifestações clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutâneadifusa (LCD) (GREVELINK & LERNER, 1996; DESJEUX, 2001).

O tratamento das leishmanioses é realizado com o uso de antimoniais pentavalentes, dentre os quais o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) que são os fármacos de primeira escolha (WERBOVETZ et al., 1992; TEMPONE et al., 2011, MCGWIRE & SATOSKAR, 2013). No Brasil, o Glucantime[®] é utilizado como fármaco de primeira escolha; entretanto, apresenta alta toxicidade provocando cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, ainda mialgia e pancreatites (OLIVEIRA et al., 2011; MACHADO et al., 2012).

Fármacos de segunda linha, como a anfotericina B (Fungizone[®]), têm sido recomendados nos casos de intolerância dos pacientes e/ou resistência dos parasitos ao tratamento convencional. Porém, os mesmos devem ser administrados em ambiente hospitalar e também apresentam efeitos colaterais, tais como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (SUNDAR et al., 2007; RICHARD & WERBOVETZ, 2010). A anfotericina B lipossomal (AmBisome[®]) é considerada efetiva e tem baixa toxicidade, entretanto, com custo elevado (TEMPONE et al., 2011, MCGWIRE & SATOSKAR, 2013).

O tratamento das leishmanioses apresenta limitações que reduzem a adesão dos pacientes, tais como a longa duração, a via de aplicação dos fármacos (intramuscular ou endovenosa) e a toxicidade observada nos pacientes (OSÓRIO et al., 2007). Há de se destacar o aumento do número de casos de recidiva à doença

após o fim do tratamento, fato atualmente observado em pacientes em diversas regiões do mundo (VÉLEZ et al., 2009). Nesse contexto, torna-se necessário o aumento dos investimentos para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antileishmanial, a fim de se obterem compostos efetivos contra o parasito, que apresentem menos efeitos tóxicos.

Produtos naturais têm sido avaliados contra doenças parasitárias (ZHAI et al. 1999; MENDONÇA-FILHO et al., 2004; ROCHA et al. 2005; VALADARES et al., 2011). O uso empírico de plantas medicinais tem demonstrado que o caule, as raízes, folhas, sementes e os frutos têm eficiência no tratamento de diversas doenças, suscitando o interesse em seu estudo. Nos últimos anos, o recurso vegetal tornou -se uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, sendo que cerca de 25% dos medicamentos atualmente disponíveis foram originados a partir de pesquisas com produtos naturais, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de fármacos semi-sintéticos (MOREIRA et al., 2006).

O Brasil abriga uma das maiores biodiversidade do planeta. Esta abundante variedade de vida – que se traduz em mais de 20% do número total de espécies da Terra – eleva nosso país ao posto de principal nação entre os 17 países de maior biodiversidade no mundo. Além disso, muitas das espécies brasileiras são endêmicas e diversas espécies de plantas de importância econômica mundial são originárias do Brasil (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE DO BRASIL, 2014). O país apresenta duas áreas de *hotspots*, dentro das 34 áreas mundiais, sendo essas o Cerrado e a Mata Atlântica (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Uma área é considerada *hotspot* quando apresenta alta diversidade biológica, endemismo, e está ameaçada no maior grau de extinção. Esta área deve ter pelo menos 1.500 espécies endêmicas de plantas e ter perdido mais de 3/4 de sua vegetação original (Conservation, 2015).

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, correspondendo a cerca de 23% da área total do país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011). Seu território de domínio é caracterizado pela predominância do bioma, porém, apresenta Veredas, Matas de Galeria, Matas Mesófilas de Interflúvio, dentre outros exemplares característicos que ocorrem nesse ambiente. Por isso, no cerrado, a biodiversidade é intensa (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE DO BRASIL, 2013). Alguns gêneros de plantas encontradas no cerrado

demonstraram potencial antileishmanial, tais como: *Bixa*, *Sida*, *Psidium*, *Plantago*, *Ficus*, *Piper*, *Musa* e *Solanum* (NETO & MORAIS, 2003).

A Mata Atlântica abrangia uma área equivalente a 1.200.000 km², cerca de 12% do território brasileiro. Atualmente, ela foi reduzida a 7% de seu território original e encontra-se muito fragmentada (Portal SOS Mata Atlântica). É considerada um dos maiores repositórios de biodiversidade do planeta e detém o recorde de plantas lenhosas (angiospermas) por hectare (450 espécies no sul da Bahia), e cerca de 20 mil espécies de plantas superiores, sendo cerca de oito mil delas endêmicas; além de imensa quantidade de espécies e endemia de vários outros grupos de plantas em seu ambiente (VARJABEDIAN, 2010). Espécies de plantas com atividades antileishmanial também já foram descritas na Mata Atlântica, tais como: *Zanthoxylum chiloperone* (FERREIRA et al., 2002), *Annonaceae* (GRANDIC et al. 2004) e *Ocimum gratissimum* (UEDA-NAKAMURA et al., 2006).

Nesse contexto, é de grande relevância a busca de compostos naturais que possam ser utilizados no tratamento das leishmanioses, que possuam eficácia no combate ao parasito e apresentem nenhum ou poucos efeitos colaterais nos pacientes, contribuindo para um aumento da adesão ao tratamento e, potencialmente, na diminuição dos casos de recidiva da doença e de resistência dos parasitos, como observado com os medicamentos convencionais.

Breve Histórico das Leishmanioses

A leishmaniose tegumentar (LT) americana é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos na literatura desde o século I depois de Cristo (LAINSON, 1997; CAMARGO & BARCINSKI, 2003).

Nas Américas foram encontradas cerâmicas pré-colombianas datadas de 400 a 900 anos depois de Cristo, tendo sido feitas pelos índios do Peru que apresentavam mutilações nos lábios e nariz, sendo essa doença, atualmente, conhecida como leishmaniose mucocutânea (LAINSON & SHAW, 1988; BASANO & CAMARGO, 2004). Posteriormente, por meio de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e das mucosas, características da ocorrência de leishmaniose (SANTOS & COIMBRA, 1994; BASANO & CAMARGO, 2004).

Em 1909, Lindenberg identificou em lesões cutâneas e nasofaríngeas formas de *Leishmania*, parecidas à espécie *Leishmania tropica* (BASANO & CAMARGO, 2004). Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da espécie *L. tropica*, a denominou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcerade-Bauru”, “ferida-brava” ou “nariz-de-tapir” (SILVEIRA et al., 1997; BASANO & CAMARGO, 2004).

No Brasil, até a década de 70, todos os casos de LT eram atribuídos à espécie *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos eco-epidemiológicos, outras espécies foram descritas, sendo registradas até o momento seis espécies que podem causar a doença em nosso país (BASANO & CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2007).

A Leishmaniose Visceral foi primeiramente descrita na Grécia, em 1835, e na Índia, em 1869, onde recebeu o nome “kala-jwar”, que quer dizer febre-negra ou “calazar”, que significa pele-negra, em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele que ocorre na doença (MARZOCHI et al., 1981). Posteriormente, William Leishman e Charles Donovan isolaram o protozoário do baço de um soldado indiano e de uma criança, respectivamente (LEISHMAN, 1994). Ronald Ross criou o gênero *Leishmania* e o agente causador do calazar foi denominado *Leishmania donovani*, em homenagem à Leishman e Donovan (PESSÔA & MARTINS, 1988).

O primeiro a descrever um caso de LV humana nas Américas foi Migone, em

1913, após realizar necropsia de um brasileiro falecido no Paraguai (MIGONE, 1913). Em 1934, Penna observou formas amastigotas do parasito em lâminas histológicas do fígado de pacientes que faleceram com suspeita de febre amarela, no Nordeste do Brasil (BADARÓ & DUARTE, 1996).

Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países no mundo, prevalecendo em regiões tropicais e sub-tropicais, que se estendem desde as florestas tropicais da região Central e América do Sul, até o oeste da Ásia e Oriente Médio (ALVAR et al., 2012, WHO 2013).

Relatórios epidemiológicos relataram, em relação à Leishmaniose Cutânea, que cerca de 350 milhões de pessoas vivem em área de risco de contrair a infecção, com 12 milhões de pessoas afetadas em todo o mundo; e 1,0 a 1,5 milhão de novos casos registrados a cada ano, sendo que um terço destes casos ocorre nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e Ásia Ocidental, do Oriente Médio para a Ásia Central (FIG. 2). Os dez países com maior número de casos são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e que, juntos, são responsáveis por 70 a 75% da incidência global estimada de LC (ALVAR et al., 2012, PIGOTT et al., 2014; WHO, 2014).

Em relação à LV, estima-se sua incidência em cerca de 500 mil novos casos e 60 mil mortes a cada ano, em todo o mundo (FIG. 3), sendo que mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (IOSET J R, 2008; AMEEN M., 2010; MISHRA et al., 2011; WHO, 2014).

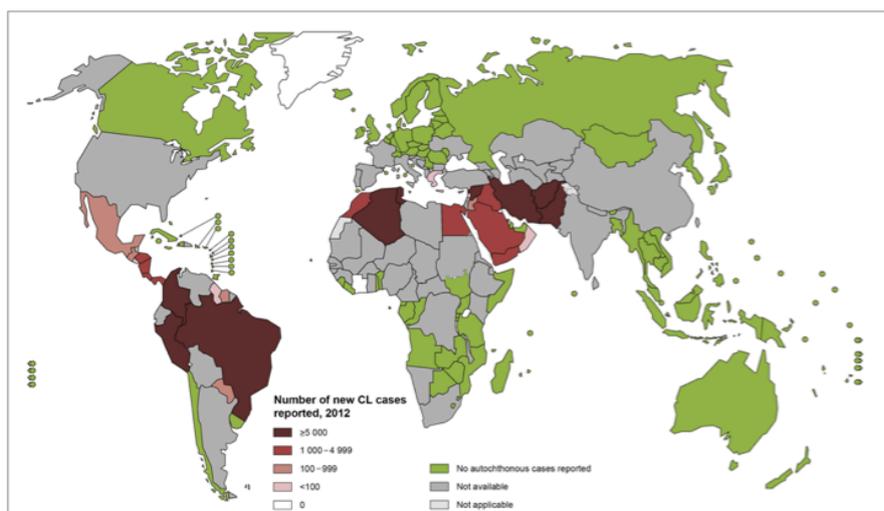


Figura 2. Incidência mundial da leishmaniose tegumentar (WHO, 2012).

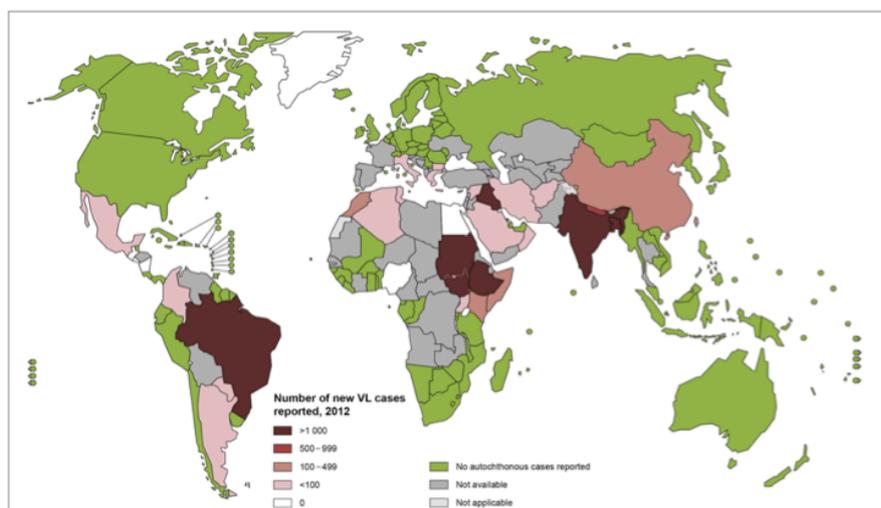
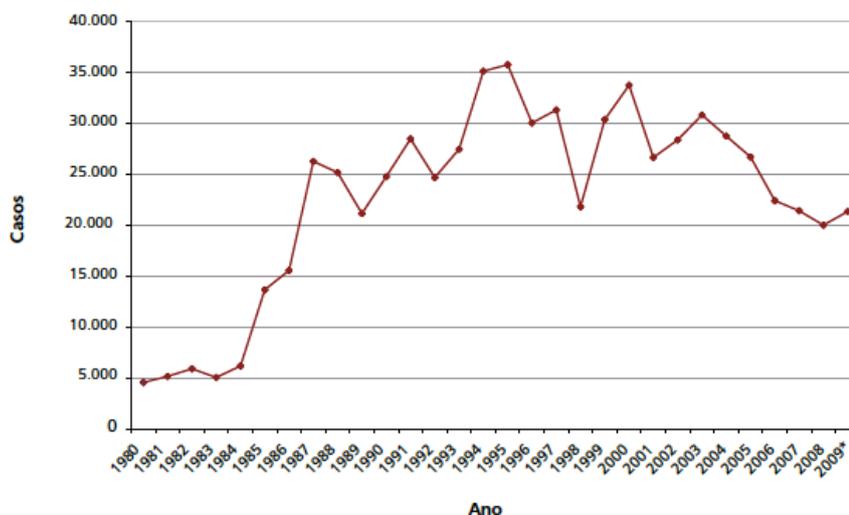


Figura 3. Incidência mundial da leishmaniose visceral (WHO, 2012).

No Brasil, no período de 1988 a 2009, a LT apresentou média anual de 27.093 casos registrados e coeficiente médio de detecção de 16 casos por 100 mil habitantes. São observados picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos registrados a partir de 1985, quando há a implantação das ações de vigilância e controle epidemiológico da doença no país (FIG. 4). No entanto, o número de casos continua a crescer em nosso país, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (FIG. 5) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011; ALVAR et al., 2012, WHO, 2014).



Fonte: (SVS/MS)

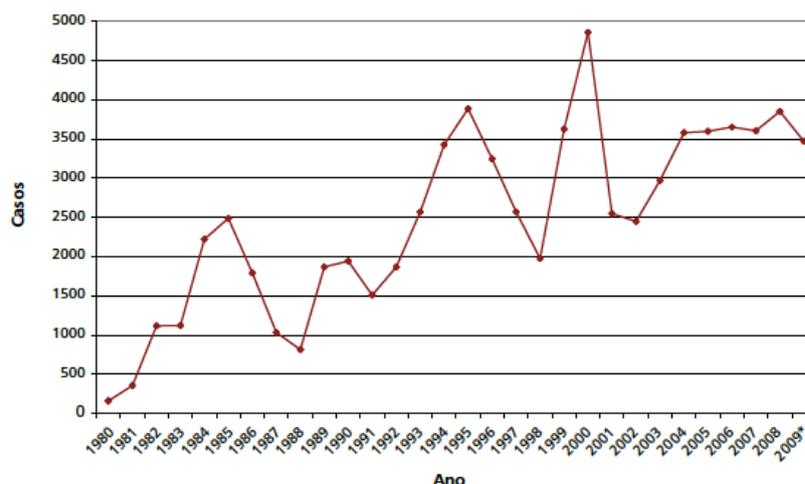
Figura 4. Casos de leishmaniose tegumentar (Secretária de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde do Brasil, 2011).

Número de casos de leishmaniose cutânea reportados								
País	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005
Brasil	23793	21356	22397	21989	20123	21530	22397	26685

Figura 5. Número de casos da leishmaniose tegumentar no Brasil (WHO, 2014).

Observa-se ainda uma expansão geográfica da doença, visto que, no início da década de 1980, foram registrados casos em 19 unidades federadas e, em 2003, todos os estados apresentaram incidência da doença. Em 1994, houve registro de casos autóctones em 1.861 municípios, o que representava 36,9% dos municípios do País. Em 2005, houve expansão da doença para 2.068 municípios (37,2%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011).

A LV apresenta comportamento epidemiológico cíclico, com elevação de casos em períodos médios de cinco anos. No período de 1998 a 2009, a média anual de casos foi de 3.349, e a incidência de 1,97 casos por 100 mil habitantes (FIG. 6).



Fonte: (SVS/MS)

Figura 6. Casos de leishmaniose visceral (Secretária de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde do Brasil, 2011).

Observa-se que a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,2% em 2000 para 5,7% em 2009 (ALVAR et al., 2012). No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde, de 2007 a 2012, houve uma oscilação no número de casos de LV no Brasil (FIG. 7).

Número de casos de leishmaniose visceral reportados								
País	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005
Brasil	3118	3840	3716	3693	3852	3604	3651	3597

Figura 7. Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil (WHO, 2014).

Os dados epidemiológicos dos últimos anos revelam também a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (PASSOS et al., 1993; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011).

As leishmanioses representam um grave problema de Saúde Pública devido à

elevada morbidade e mortalidade observada nos casos agudos e não tratados, especialmente em relação à LV. Nos últimos anos, o número de mortes e a taxa de letalidade relacionadas à LV vem aumentando gradativamente, o que torna a doença preocupante e demonstra a necessidade da busca por medidas de controle mais efetivas (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2010).

Morfologia do parasito *Leishmania spp.*

O parasito se apresenta sob duas formas evolutivas principais: promastigota (Figura 8), forma alongada, flagelada, de vida livre, móvel, com núcleo único, cinetoplasto localizado entre a porção anterior e encontrado no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (flebótomo); e a forma amastigota (Figura 9), que apresenta morfologia arredonda, flagelo rudimentar, cinetoplasto em forma de bastão, e que se desenvolve nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado e reproduz-se por divisão binária (GRIMALDI & TESH, 1993).



Figura 8: Forma promastigota de *Leishmania spp.*

Fonte: Atlas de Parasitologia.doc

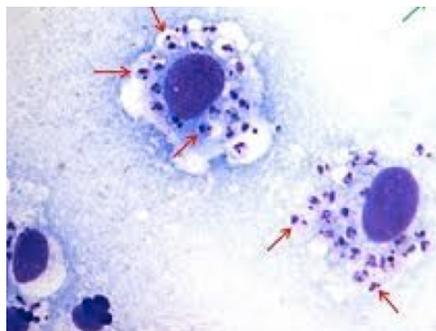


Figura 9: Forma amastigota de *Leishmania spp.*

Fonte: Anatomia Patológica - FM/UFMG

Ao contrário das células de mamíferos, que possuem de centenas a milhares de mitocôndrias, os tripanosomatídeos, entre os quais se incluem o *Trypanosoma cruzi* e a *Leishmania spp.*, possuem uma única mitocôndria (FIDALGO & GILLE, 2011). O bom funcionamento desta estrutura torna-se, desta forma, imprescindível para a sobrevivência dos parasitos (MEHTA & SHAHA, 2004).

A ultraestrutura da mitocôndria nos tripanossomatídeos é diversa em comparação aos organismos multicelulares, no que diz respeito à densidade da matriz, à forma e ao número de cristas (FIG. 10). Geralmente, a mitocôndria se localiza abaixo da membrana plasmática, correndo por todo o corpo do parasito, abaixo dos microtúbulos sub-peliculares. Uma característica peculiar da mitocôndria dos protozoários da ordem kinetoplastida é que o DNA mitocondrial (kDNA) concentra-se em uma região especializada da mitocôndria denominada de cinetoplasto (FIG.11) (DE SOUZA et al., 2009). O cinetoplasto se situa próximo ao núcleo e sua forma e organização estrutural variam de acordo com o estadio de desenvolvimento do protozoário (DE SOUZA, 2009).

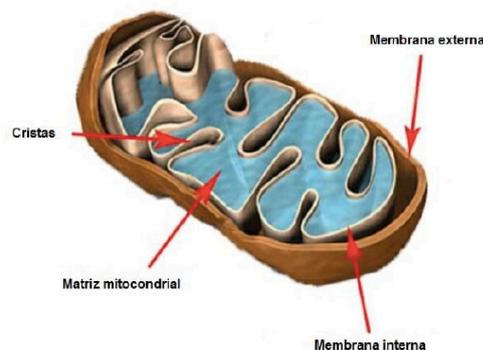


Figura 10: Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial. Fonte: Fonte: LHSC, 2011.

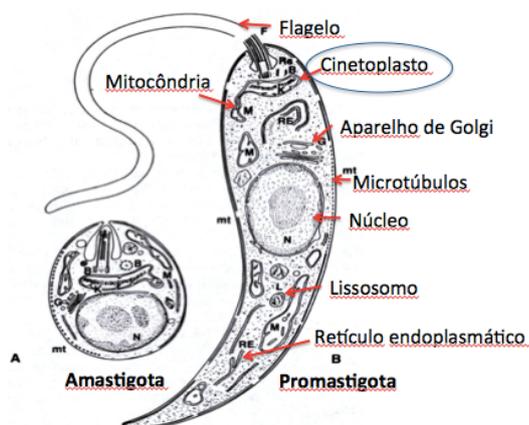


Figura 11 : Esquema ilustrativo da localização da mitocôndria e cinetoplasto no parasito *Leishmania spp.* Fonte: Rey, 2009.

As mitocôndrias são organelas celulares que desempenham papel central no metabolismo energético e apresentam atividade fundamental para a sobrevivência de qualquer célula. Estão envolvidas em vários processos e vias metabólicas, como: 1) conversão do piruvato a acetil-CoA, processo catalisado pelo complexo da desidrogenase do piruvato; 2) ciclo do ácido cítrico; 3) fosforilação oxidativa que resulta do funcionamento conjunto da cadeia respiratória acoplada à síntese de ATP; 4) oxidação (degradação dos ácidos graxos); 5) parte do ciclo da ureia; 6) fornecimento de metabólitos intermediários ao resto da célula; 7) armazenamento de cálcio, de forma a manter a concentração de cálcio citoplasmático em nível baixo e constante; 8) síntese de DNA, RNA e proteínas; 9) reparação do DNA e 10) formação de espécies reativas de oxigênio (PEDERSEN, 1999).

Durante a fosforilação oxidativa, os elétrons são transferidos para a cadeia respiratória mitocondrial, e um gradiente de prótons é estabelecido através da membrana mitocondrial interna como fonte de energia para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) (DE SOUZA et al., 2009; FONSECA SILVA et al., 2013).

A permeabilização da membrana mitocondrial precede o processo de morte celular por apoptose ou necrose, que é dependente do tipo de célula ou do estímulo indutor do tipo de morte celular; e esta permeabilização constitui um dos principais fatores indicadores de morte. De fato, existe um número elevado de fatores pró-apoptóticos que atuam ao nível da membrana mitocondrial, induzindo à permeabilização da membrana e que, por sua vez, ativam os compostos anti-apoptóticos da família Bcl-2 a interagir com proteínas da membrana mitocondrial,

evitando sua permeabilização. Outro fator que reforça o envolvimento da mitocôndria na morte celular é a existência de intervenções farmacológicas específicas, isto é, através de compostos que atuam ao nível das proteínas mitocondriais que evitam ou retardam a morte celular (LOEFFLER & KROEMER, 2000).

A manutenção de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é vital para o processo metabólico de formação de ATP, bem como para a sobrevivência celular (MEHTA & SHAHA; 2006; DE SOUZA et al., 2009). Em células de mamíferos, o aumento da produção celular de espécies reativas de oxigênio (EROs) provavelmente é responsável pela despolarização de $\Delta\Psi_m$ e consequente morte celular (BANKI et al., 1999; FONSECA SILVA et al., 2013). Como consequência do aumento de geração de EROs mitocondriais, podem ocorrer danos oxidativos aos ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. Uma consequência do estresse oxidativo mitocondrial, na presença de concentrações elevadas de Ca^{2+} , é a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), uma permeabilidade não-seletiva da membrana mitocondrial interna que leva à disfunção da organela, além da liberação de fatores pró-apoptóticos. O citocromo c também é um importante fator regulatório para a liberação de EROs mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 2001).

A perda do $\Delta\Psi_m$ ainda favorece a liberação do citocromo c para o citosol, onde se associa ao fator 1 de ativação de protease de apoptose (APAF-1) e com a posterior associação à caspase 9, formando o apoptosoma que age como sinal direto para a caspase executora 3 (HEUSSLER et al., 2001).

As mitocôndrias parecem ser um alvo comum para vários produtos naturais, sejam extratos brutos ou compostos isolados, como relatado por diversos autores (DO SOCORRO et al., 2003; BRENZAN et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013). O modo de ação da maioria dos produtos naturais que causam dano mitocondrial e morte do parasito tem sido atribuído à inibição da biossíntese de esterol e à perda do potencial de membrana mitocondrial (RODRIGUES et al., 2013; MONZOTE et al., 2014). Tem-se demonstrado que as variações no $\Delta\Psi_m$ induzidas por medicamentos estão associados com a sobrevivência das células em *Trypanosoma cruzi* (MENNA-BARRETO et al., 2009), *Leishmania donovani* (MEHTA & SHAHA; 2006) e *L. amazonensis* (RODRIGUES et al., 2007).

Apresentação clínica da doença

Considerando a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro infectado, a localização das lesões, bem como a evolução clínica da doença, Marzochi & Marzochi (1994) classificaram a LT em diferentes formas, apresentações da doença e seus respectivos agentes etiológicos (FIG.12). (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006).

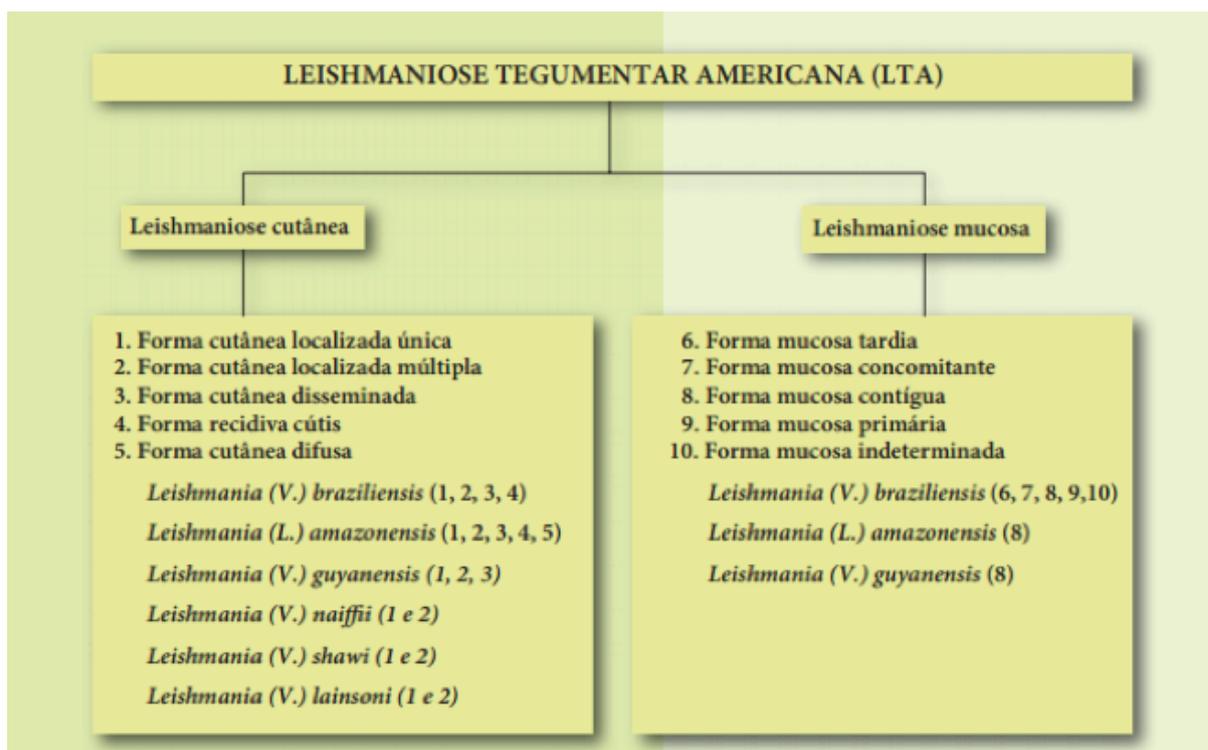


Figura 12. Classificação clínica e agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006).

A LT pode apresentar-se sob as seguintes formas clínicas:

- Forma cutânea localizada – ocorre pela lesão única situada, geralmente, no local da picada do vetor. Muitas vezes é ulcerosa, na qual há tendência à cura espontânea. Apresenta boa resposta ao tratamento, podendo acompanhar-se de linfadenopatia local, linfangite ascendente e ulceração de alguns nódulos, reproduzindo as lesões iniciais.
- Forma cutâneo-disseminada – ocorre pela disseminação hematogênica ou linfática dos parasitos. As lesões são numerosas e distantes do local das picadas, distribuindo-se por várias áreas do corpo; em geral, são pequenas e ulceradas, podem ter tamanhos diversos e têm boa

resposta ao tratamento.

- Forma cutâneo-difusa – constitui manifestação rara e grave da LT, ocorrendo em pacientes considerados anérgicos, ou seja, com deficiência na resposta imune celular aos antígenos do parasito. De início insidioso, com lesão única sem resposta significativa ao tratamento, evolui lentamente, com formação de placas infiltradas e nodulações não ulceradas múltiplas, que recobrem grandes extensões cutâneas. O tratamento é difícil ou ineficaz (CASTES et al., 1983; OKELO et al., 1991; BARRAL-NETO et al., 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006).

A LMC é, geralmente, causada pela disseminação hematogênica dos parasitos para as mucosas nasais, orofaringe, palato, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traquéia e árvore respiratória superior (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006). De acordo com a classificação clínica proposta por Marzochi & Marzochi (1997), e considerando como parâmetros o tempo decorrido entre as lesões cutâneas e mucosas, o local de inoculação e a localização das lesões, a forma mucosa pode receber as seguintes classificações:

- Forma mucosa tardia – caracteriza-se pelo aparecimento da lesão mucosa após alguns anos o surgimento da lesão cutânea, fato que costuma ocorrer dentro dos dois primeiros anos, mas há relatos de sua ocorrência décadas após a erupção da lesão na pele.
- Forma mucosa indeterminada – acometimento mucoso, sem identificação da porta de entrada, supondo-se que as lesões mucosas sejam originadas de infecção, sem manifestação cutânea clínica prévia.
- Forma mucosa primária – situação em que a lesão de mucosa é causada pela picada do vetor diretamente na mucosa, restrita às mucosas labial e genital (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006).

A LV caracteriza-se por um amplo espectro clínico, que pode variar desde as manifestações clínicas assintomáticas, passando pelas oligossintomáticas, até às formas sintomáticas graves, que, quando agudas e não tratadas, podem levar o

paciente ao óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009):

- Forma Assintomática – é aquela na qual não há evidência de manifestações clínicas, porém, os exames laboratoriais são positivos.
- Forma Oligossintomática – caracteriza o início da sintomatologia, que pode variar de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Frequentemente, evolui para cura espontânea. A combinação de manifestações clínicas e das alterações laboratoriais, que melhor parece caracterizar a forma oligossintomática; são: febre, hepatomegalia, hiperglobulinemia e velocidade de hemossedimentação elevada.
- Forma Moderada – caracteriza-se por febre irregular, geralmente associada ao emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. Apresenta um quadro clínico lento, geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado ao comprometimento geral do paciente.
- Forma Grave – caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui de forma rápida, com febre contínua e comprometimento intenso do estado geral do paciente. Instala-se a desnutrição e edema dos membros inferiores, que pode evoluir para anasarca. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nesses pacientes, o óbito é geralmente determinado por infecções bacterianas e/ou hemorragia (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009).

Tratamento das leishmanioses

O tratamento das leishmanioses está disponível desde o início do século 20 (WHO, 2010). O antimônio trivalente (Sb^{3+}) foi usado pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), obtendo algum sucesso, visto que naquela época 90% dos casos evoluíam para o óbito quando não tratados. No entanto, esta formulação apresentava toxicidade e efeitos adversos, ocasionando tosse, dor no peito, depressão carditoxicidade e nefrotoxicidade (LAINSON & SHAW, 1978; SOARES-

BEZERRA et al., 2004).

Desde a década de 50, os antimoniais pentavalentes são utilizados, dentre os quais o antimoniato de N-metil glucamine (Glucantime[®], Rhône Poulenc Rorer, França) e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®], Welcome Foundation, Inglaterra), são os mais empregados (FONSECA-SILVA et al., 2011).

No Brasil, o fármaco de primeira escolha é o Glucantime[®]. Esse composto atua sobre diversas vias do metabolismo dos parasitos, sendo sugerido que algumas particularidades químicas (FIG.13) em sua composição podem contribuir para o efeito farmacológico.

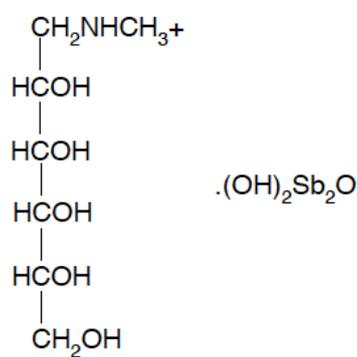


Figura 13. Estrutura química do antimoniato de N-metil glucamine. Fonte: Rath et al., 2003.

Os antimoniais parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da *Leishmania spp.*, por meio de glicólise e β -oxidação que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas (BERMA, 1995). Outro mecanismo sugerido é a ligação com sítios sulfidrílicos, levando à morte dos parasitos (ROBERTS et al., 1995; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA, 2006). Entretanto, possui efeitos colaterais, como anorexia, náusea, vômitos, dor abdominal, mal-estar, mialgia, artralgia, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, pancreatite e hepatite; e seu uso provoca maior toxicidade e mortalidade em pacientes positivos para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (AMATO et al., 2007; RICHARD & WERBOVERTZ, 2010; RAMÍREZ-MACÍAS et al., 2012, NAGLE et al., 2014).

O Ministério da Saúde do Brasil distribui, gratuitamente, o Glucantime[®] na rede pública de Saúde, adotando o esquema terapêutico preconizado pela OMS, tanto para a LT quanto para a LV (FIG. 14). Recomenda-se o tratamento da LV com

a dose de 20mg Sb⁺⁵/kg/dia, por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias, por via endovenosa ou intramuscular (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006)

Forma Clínica	Dose	Tempo de duração mínimo
Leishmaniose Cutânea	10 - 20mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia (Recomenda-se 15mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia)	20 dias
Leishmaniose Difusa	20mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	20 dias
Leishmaniose Mucosa	20mg/Sb ⁺⁵ /kg/dia	30 dias

Figura 14. Esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil e pela Organização Mundial da Saúde para o antimoniato de N-metil glucamine.

A escolha do Glucantime[®] é contra-indicada em pacientes com insuficiência renal, problemas cardíacos, pacientes que foram submetidos à transplante renal e em gestantes; nesse caso, pelo fato do composto ter a capacidade de atravessar a barreira transplacentária e impregnar o tecido nervoso do feto, pode levar a síndromes severas de retardamento mental. O tratamento dessas pacientes consiste em cuidados locais, observação clínica e utilização de anfotericina B (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006).

Fármacos de segunda escolha são anfotericina B pura ou lipossomal e Pentamidina. O desoxicolato de anfotericina B (Fungizone[®]) (FIG.15) é um fungicida poliênico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus* com excelente atividade *in vitro* na eliminação de *Leishmania spp.* intra e extracelulares. É usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais, apesar de sua elevada toxicidade e do fato de necessitar de administração parenteral (AMATO et al, 2000; SERENO et al, 2000).

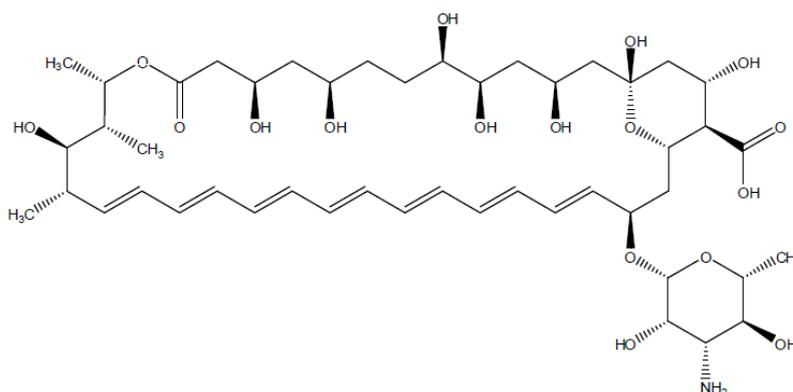


Figura 15. Estrutura química da Anfoterinina B. Fonte: Nagle et al, 2014

Seu mecanismo de ação envolve a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular do parasito, mas também nas células do hospedeiro, alterando a permeabilidade seletiva aos cátions e levando à morte celular (COHEN, 1998). O antibiótico pode provocar lise coloidal osmótica devido ao influxo iônico exacerbado, o que aumenta sua toxicidade. O fármaco também interfere na síntese do ergosterol, um importante componente de membrana celular (DOGRA & SAXENA, 1996; MARZOCHI et al.; 2010).

Dentre os problemas da administração da anfotericina B estão a miocardite, toxicidade renal, dor no local de aplicação e a necessidade de monitoramento e hospitalização (NAGLE et al, 2014). A anfotericina B lipossomal (AmBisome[®]) é uma formulação da anfotericina B, na qual a mesma é incorporada em lipossomas de fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nesta formulação, o fármaco atinge níveis plasmáticos mais elevados que a anfotericina B pura. Entretanto, a meia-vida é mais curta, pois este é rapidamente fagocitado pelos macrófagos do fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações. A forma lipossomal age especificamente sobre macrófagos, sendo incorporada ao meio intracelular e, assim, reduzindo os efeitos colaterais com maior índice de eficácia terapêutica, inclusive em pacientes sem resposta terapêutica aos antimônios. Apresenta porém, custo elevado (SAMPAIO et al, 1989; DE PAULA et al., 2003, MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2007).

A pentamidina (Lomidina[®]) (FIG.16) é o fármaco de segunda escolha, mais comumente recomendado quando os antimoniais não podem ser administrados, embora também apresente efeitos adversos significantes e necessite de administração parenteral (MARZOCHI et al., 2010, NAGLE et al., 2014).

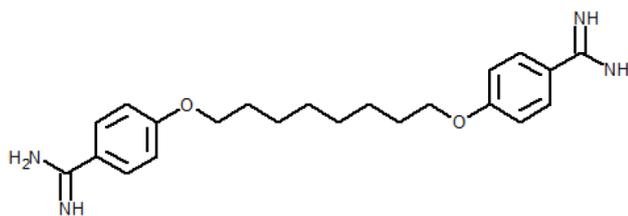


Figura 16. Estrutura química da Pentamidina. Fonte: Nagle et al., 2014

O provável mecanismo de ação da pentamidina é a inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP et al, 2005). Outros mecanismos propostos seriam na inibição da RNA polimerase, função ribossomal e na síntese de proteínas e fosfolipídios (DIETZE, 2003), e a inibição direta da S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), enzima envolvida na biossíntese da espermidina (REGUERA et al, 2005).

De caráter catiônico, pode apresentar-se na forma de isotionato ou cloridrato. No Brasil, apenas o isotionato de pentamidina é comercializado e se apresenta sob a forma farmacêutica de frasco-ampola, contendo 300 mg/sal. A dose recomendada é de 4 mg/Kg/dia via intramuscular a cada dois dias, não ultrapassando a dose total de 2 g. Podem ocorrer dor e abscessos no local de aplicação, náuseas e vômitos, hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade e hiperglicemia pela ação do medicamento no metabolismo da glicose (RATH et al, 2003, MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011). Não deve ser utilizada durante a gestação e em pacientes com diabetes mellitus, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e em crianças com menos de 8 kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011). O mecanismo de resistência pode estar associado a um decréscimo do potencial da membrana mitocondrial com redução do acúmulo do fármaco em terapias prolongadas (MUKHERJEE et al, 2006).

Outros medicamentos usados no tratamento das leishmanioses, mas que não são comercializados no Brasil, são: miltefosina (FIG. 17), uma alquilfosfocolina que tem atividade contra células cancerígenas e várias espécies de parasitos, assim como bactérias e fungos. Foi originalmente desenvolvido como um fármaco anticancerígeno, em 2002, e foi aprovado na Índia como o primeiro tratamento oral da LV (PEYRON et al, 2005; NAGLE et al., 2014).

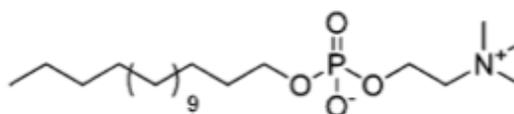


Figura 18. Estrutura química Miltefosina. Fonte: Nagle et al., 2014

Este fármaco interfere nas membranas celulares sem interagir com o DNA e modula a permeabilidade celular, a fluidez e composição de lipídios da membrana, o metabolismo dos fosfolipídios e a transdução do sinal de proliferação (JENDROSSEK & HANDRICK, 2003). Entretanto, apresenta eventos adversos que incluem problemas gastrointestinais, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Outra limitação é a teratogenicidade da miltefosina. Por isso, mulheres em idade fértil precisam tomar contraceptivos durante o tratamento e um adicional de três meses depois, devido à meia-vida longa da miltefosina (~ uma semana) (PANDEY et al., 2009; DORLO et al., 2012; NAGLE et al., 2014).

A paramomicina (FIG.18) é um antibiótico aminoglicosídico, também chamado aminosidina. É o único aminoglicosídeo com atividade antileishmanial importante clinicamente. Ambas as formas de leishmanioses podem ser tratadas com esse antibiótico, mas, por ter baixa absorção oral, formulações parenterais e tópicas têm sido desenvolvidas para as formas visceral e tegumentar, respectivamente (CROFT et al., 2006; DAVIDSON et al, 2009; NOGUEIRA et al., 2011; NAGLE et al., 2014).

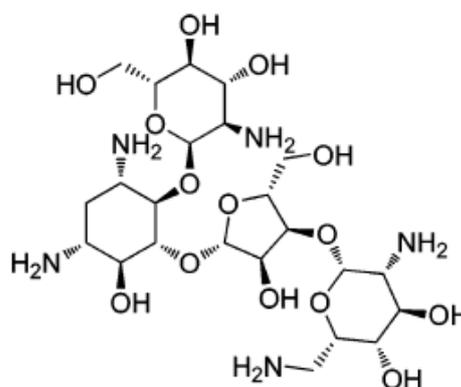


Figura 18. Estrutura química da Paramomicina. Fonte: Nagle et al., 2014.

O mecanismo de ação ocorre por meio da inibição da atividade mitocondrial da *Leishmania spp.* (LIMA et al., 2007). Este fármaco causa dor no local da aplicação, eritema, edema, aumento da transaminase hepática, nefrotoxicidade e

ototoxicidade (CROFT et al; 2006; PANDEY et al., 2009; JHA et al., 2013). A taxa de cura em estudos realizados é variável. Em um estudo de fase III em Bihar, entre 2003 e 2004, usando a medicamento em regime de 11 mg/kg (15 mg/kg como o sulfato) em associação com SbV⁺ ou miltefosina, via intra muscular, durante 21 dias; observou-se taxa de cura de 94,6 % (SUNDAR et al., 2007).

Um estudo realizado em cinco centros da Etiópia comparou a eficácia da paramomicina como monoterapia usando a dose de 15 mg/kg por dia durante 21 dias; antimoniais (20 mg/kg por dia) como monoterapia por 30 dias ou a combinação dos dois medicamentos por 17 dias. Aos seis meses após o final do tratamento, a monoterapia com paramomicina apresentou uma taxa média de cura de 63,8% e taxas ainda menores em dois Centros do Sudão, sendo essas de 14,3% e 46,7% (HAILU et al., 2010; NAGLE et al., 2014). Não há relatos sobre uso da paromomicina no tratamento da LV em países da América Latina e Mediterrâneo.

Os azoles ainda são usados no tratamento da doença, sendo esses antifúngicos orais que inibem a biossíntese do ergosterol, resultando na acumulação de 14 α -metil esteróis. Como os parasitos dependem de ergosterol em seu metabolismo de esteróis e compartilham esta via biossintética, os azóis têm sido explorados por seu potencial terapêutico contra infecções por *Leishmania spp.* (DE MACEDO-SILVA et al., 2013). Sua taxa de cura varia de acordo com as espécies de *Leishmania spp.*, sendo 76% de cura contra *L. braziliensis* (SAENZ et al., 1990) e 89% contra *L. mexicana* (NAVIN et al., 1992).

Além da ação da droga sobre os parasitos, o sucesso do tratamento das leishmanioses está sujeito à imunidade celular. Assim, em pacientes com co-infecção de HIV/leishmanioses, o tratamento tende ao insucesso (CHRISTOPHER et al., 2007).

O critério de cura é clínico: recomenda-se o acompanhamento mensal por três meses consecutivos e, após a cura clínica, seguimento até 12 meses após o término do tratamento e quando possível, uma reavaliação após 24 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2006).

Uso de produtos naturais e tratamento fitoterápico

A partir de uma perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças foram iniciados com o uso de plantas

medicinais (SCHULZ et al., 2002). Pela atual legislação de fitoterápicos no Brasil RDC26/2014, planta medicinal é definida como “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. As mesmas representam uma fonte inesgotável de medicamentos aprovados e comumente utilizados, bem como uma fonte de novas substâncias com atividade biológica potencial (DI STASI,1995).

Desde a antiguidade, as plantas têm sido um recurso ao alcance do homem. Durante milênios, o homem empiricamente aperfeiçoou seus conhecimentos a fim de melhorar suas condições de alimentação e tratar enfermidades, demonstrando uma estreita interrelação entre o uso das plantas e sua evolução. A partir do século XIX, a humanidade se depara diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico presente nas plantas medicinais. Foi descoberto que substâncias ativas, na forma purificada ou após sofrerem transformação química, possuem atividades farmacológicas, sendo que, muitas vezes, essas atividades são confirmadas pelo uso popular e comprovadas cientificamente. Produtos naturais podem oferecer uma fonte ilimitada de diversidade química para o desenvolvimento de novos fármacos (MIGUEL & MIGUEL, 2000; CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

O uso empírico de plantas medicinais pela população mostra que o caule, as raízes, folhas, sementes e os frutos têm eficiência na cura de diversos males, suscitando grande interesse no estudo destas plantas (BERGMANN et al., 1997; VARANDA, 2006). A fitoterapia vem sendo utilizada como uma prática integrativa e complementar no tratamento de doenças. Extratos totais ou semi-purificados e compostos purificados derivados de plantas medicinais constituem base para desenvolvimento de novos agentes medicinais para o tratamento das doenças (TOMAZZONI et al., 2006; TEMPONE et al., 2007; VERMEERSCH et al., 2009; SOARES et al., 2010; GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011; VALADARES et al., 2011).

Muitos estudos clínicos e farmacológicos de medicamentos tradicionais derivaram predominantemente de plantas, como os envolvidos no desenvolvimento da aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina (NEWMAN et al., 2000; GRABLEY & THIERICKE, 2000).

Produtos naturais continuam a ser uma importante fonte de agentes quimioterapêuticos, particularmente, aqueles utilizados para tratar doenças infecciosas. Das 162 Novas Entidades Químicas (NCE) aprovadas como medicamentos anti-infecciosos de agências reguladoras ao longo do período 1981-

2002, 99 (61%) deles são de origem natural (como produto natural, derivado de um produto natural, ou um composto sintético baseado em um produto natural) (NEWMAN et al.; 2003; SALEM & WERBOVETZ, 2006).

Estudo realizado por NEWMAN & CRAGG, em 2007, descreveu o número de NCE aprovadas em 25 anos e, destas, 82% são de produtos naturais, derivado de um produto natural, um composto sintético baseado em um produto natural; bem como fármacos que mimetizam compostos naturais (FIG. 19).

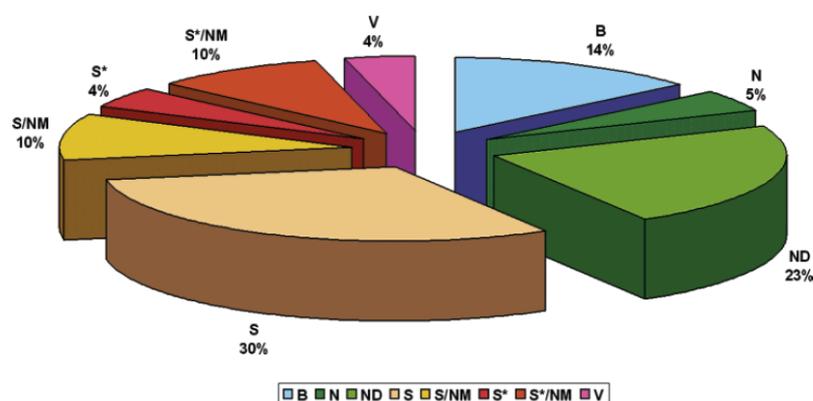


Figura 19. Novas Entidades Químicas descritas de 01/1981-06/2006 (N = 1184).

Abreviações: B: peptídeos e/ou proteínas isolados de organismos/linhagens celulares ou produzidos por processos biotecnológicos; N: produtos naturais sem modificações químicas; ND: produtos naturais com modificações através de semi-síntese; S: fármacos totalmente sintetizados, com base na estrutura do composto natural; S*: fármacos obtidos por síntese total com sítio farmacofórico semelhante ao do composto natural; NM: fármacos que mimetizam produtos naturais; V: vacinas.

O maior número de fármacos aprovados na indústria farmacêutica, nos EUA, nos últimos 25 anos foi voltado para o tratamento das doenças infecciosas (microbianas, parasitárias e virais) (NEWMAN & CRAGG, 2007), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Fármacos com ação antimicrobiana, antiparasitária e antiviral desenvolvidos nos últimos 25 anos.

Indicação	Total	B	N	ND	S	S/NM	S*	S*/NM	V
Antibacteriana	109	-	10	64	23	-	-	1	11
Antifúngica	29	1	-	3	22	3	-	-	-
Antiparasitária	14	-	2	5	4	-	2	-	1
Antiviral	78	12	-	2	7	1	20	12	25
Total	230	13	12	74	56	4	22	12	37
Porcentual	100	5,7	5,2	32,3	24,5	2,2	9,6	4,8	15,7

Dos 14 fármacos com ação antiparasitária desenvolvidos no período de 1981 a 2006, sete deles são de origem natural, conforme mostrado na Tabela 2 (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Tabela 2. Fármacos com ação antiparasitária de origem natural e/ou derivados.

Nome genérico	Nome comercial	Ano de introdução
Mefloquina HCl	Fansimef	1985
Ivermectina	Mectizan	1987
Artemisinina	Artemisin	1987
Artemether	Artemetheri	1987
Artenusato	Arinate	1987
Eflornithina HCl	Ornidyl	1990
Arteether	Artemotil	2000

O Programa de Controle de Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde considera a investigação de plantas como essencial para o tratamento de doenças parasitárias, como é o caso das leishmanioses (GARCÍA et al., 2010).

Extratos de plantas e substâncias puras das classes de metabólitos secundários, como os alcalóides, flavonoides, terpenos, saponinas, quinonas, chaconas; foram descritos com atividade antileishmanial contra diferentes espécies do parasito (LAVAUD et al., 1995; OKETCH-RABAH et al., 1997; MISHRA et al., 2011).

Estudos realizados com plantas das famílias Piperaceae, Asteraceae e

Lauraceae demonstraram atividade contra tripanossomatídeos, principalmente, *Trypanosona spp.* e *Leishmania spp.* (PARMAR et al., 1998; KATO & FURLAN, 2007; NDJONKA et al., 2013). Entretanto, a maioria dos compostos ativos encontra-se presentes na família Piperacea (BATISTA et al., 2008; DA SILVA-FILHO et al., 2008).

Com o avanço da pesquisa na área de química de produtos naturais; o isolamento de micromoléculas bioativas contra tripanossomatídeos tem sido incentivado, a fim de se obter novas moléculas e desenvolver novos fármacos para combater tais doenças (NDJONKA et al., 2013). Portanto, muitos compostos derivados de fontes naturais possuem atividades farmacológicas e podem ser usados no desenvolvimento de medicamentos contra as leishmanioses (POLONIO & EFFERTH, 2008; DOS SANTOS et al., 2011). A necessidade de novos medicamentos para doenças negligenciadas é urgente. Assim, testes devem ser focados na descoberta de compostos derivados de produtos naturais que possam ser usados contra tais doenças (MISHRA et al, 2011).

Cerrado Brasileiro

O território brasileiro possui grande diversidade de clima, paisagem, solo, vegetação e fauna, devido a suas proporções continentais. O espaço geográfico brasileiro compreende 8,5 milhões de Km², situados em latitudes que vão de, aproximadamente, 5° N a 34° S. Esta grande extensão territorial é composta por um conjunto de vegetações (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2013).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade (CALIXTO, 1997; Ministério da Saúde do Brasil, 2006).

O Cerrado se espalha por 2.031.990 km² do Planalto Central. Nele, encontra-se presente o Bioma Cerrado, que é a vegetação mais frequente, embora, não seja a única que compõe este domínio. Os ecossistemas de florestas, como as Matas Ciliares – que ocorrem às margens dos cursos de água – e as Matas Secas – que ocorrem, geralmente, em solos com afloramentos de rocha, são exemplos de ambientes que pertencem a outros tipos de Bioma.

Por apresentar grande área de transição, com domínio Amazônico, Mata Atlântica e Caatinga, é composto por uma grande biodiversidade, sendo denominado de domínio do Cerrado (FIG. 21); sendo considerado uma das duas áreas de *hotspots* do Brasil (OLIVEIRA et al., 2008; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2013).



Figura 20. Domínio do Cerrado e áreas de transição no Brasil (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013).

Mata Atlântica

É um conjunto de formações florestais (Florestas: Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Estacional Semidecidual, Estacional Decidual e Ombrófila Aberta) e ecossistemas associados, tais como as restingas, manguezais e campos de altitude, que se estendem por aproximadamente 1.200.000 km², correspondendo a 12,04% do território nacional e em 17 estados do território brasileiro (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE DO BRASIL, 2014). Além de ser uma das regiões mais ricas do mundo em biodiversidade, tem importância vital para aproximadamente 120 milhões de brasileiros que vivem em seu Domínio, onde são gerados aproximadamente 70% do PIB brasileiro, prestando serviços ambientais relevantes (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE DO BRASIL, 2014).

A elevada biodiversidade da Floresta Atlântica é em função das variações ambientais do bioma. Um dos fatores mais importantes que contribui para esta

variação é sua extensão em latitude, que abrange 38°. Variações altitudinais constituem outro importante fator que contribui para a ocorrência de alta diversidade biológica, dado que as matas se estendem do nível do mar a uma altitude de 1.800 metros. Além disso, as matas do interior diferem consideravelmente das matas do litoral, proporcionando uma maior variedade de habitats e nichos. Estes fatores resultam em uma diversidade única de paisagens, que abrigam extraordinária biodiversidade (CEPF, 2001).

O conhecimento sobre a biodiversidade da Mata Atlântica e de seus habitats associados ainda é limitado, o que pode ser constatado com a acentuada evolução dos números de novos táxons descritos para os grupos da fauna nos últimos 20 anos (LEWINSOHN & PRADO, 2002). Em tal situação, o primeiro passo no sentido da preservação da biodiversidade consiste em conhecer que espécies existem, onde residem e quais são os elementos críticos para a sua sobrevivência no ambiente natural. No entanto, o Brasil está longe de possuir um inventário completo sobre as espécies animais e vegetais que abriga. Para se ter uma ideia, somente o grupo de estudiosos liderado pelo botânico Harri Lorenzi, do Instituto Plantarum, de Nova Odessa (SP) revelou, em 2006, que se descobrem seis novas espécies vegetais anualmente em ambiente de floresta atlântica (ROCHA et al., 2003; ROCHA et al., 2004). Algumas plantas provenientes da Mata Atlântica e Cerrado, como as que foram avaliadas neste trabalho, foram descritas com outras atividades farmacológicas, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Espécies de plantas do Cerrado e Mata Atlântica com propriedades farmacológicas.

Espécies	Propriedades Farmacológicas
<i>Alchornea glandulosa</i>	Antibacteriana, antiinflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica, antimalária e antidiarréica, bem como citotóxica contra células cancerosas (CONEGERO et al., 2003)
<i>Miconia latecrenata</i>	Antimicrobiana, analgésica, antitripanossômica e antimalária (PIERONE et al., 2011)
<i>Psychotria suterella</i>	Atividade anestésica e antitérmica (FRAGOSO et al., 2008).
<i>Strychnos pseudoquina</i>	Doenças hepáticas, distúrbios estomacais e antimalária (HONÓRIO-FRANÇA et al., 2008).

Espécies vegetais

Alchornea glandulosa

O gênero *Achornea* é constituído por 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação. *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (FIG. 21) (sinonímia: *Alchornea irucurama* Casar), conhecida pelo nome popular de “amor seco”, “canela-raposa”, “tapiá” ou “tanheiro”, é uma árvore de caule tortuoso e que ocorre em florestas ciliares do Brasil, sendo encontrada principalmente no bioma da Floresta Atlântica, distribuída do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (LORENZI, 1998).

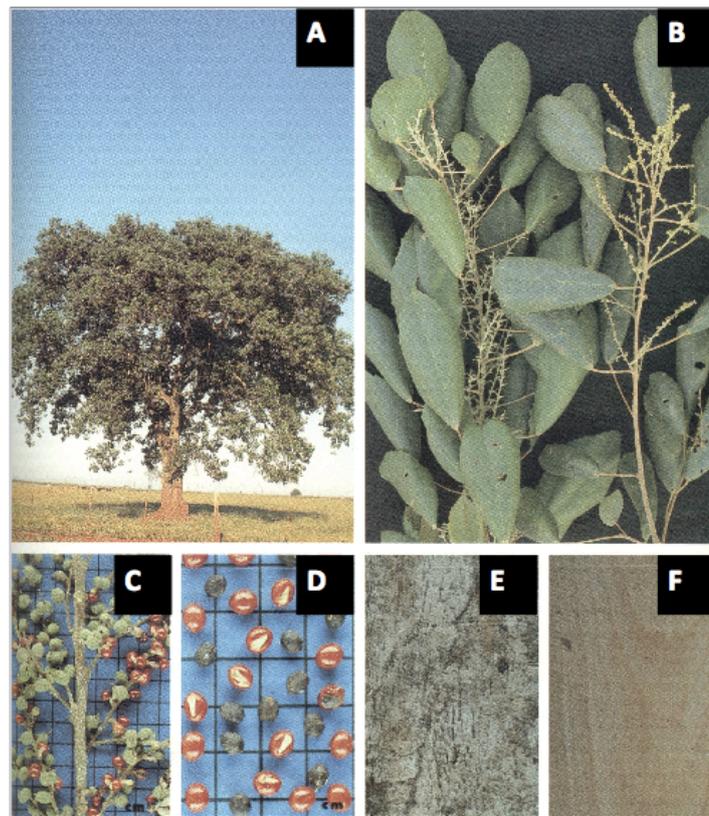


Figura 21. *Alchornea glandulosa*. São mostrados (A) arvoré, (B) folhas, (C) frutos, (D) sementes, (E) casca e (F) madeira (LORENZI, 1992).

Estudos farmacológicos realizados com extratos brutos e compostos isolados revelaram ação antibacteriana, antiinflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica e antidiarréica (CONEGERO et al., 2003; LOPES et al., 2005; CALVO et al., 2007) .

Miconia lategrenata

O gênero *Miconia* é constituído por aproximadamente 1.000 espécies que ocorrem, principalmente, em áreas tropicais das Américas (RENNER, 1993). Da forma pela qual está atualmente delimitado, este gênero pode ser reconhecido pelas folhas destituídas de formicários, inflorescências geralmente terminais e não envoltas por brácteas foliosas, hipanto sem constrição no ápice, cálice com lacínias externas reduzidas, pétalas com ápice arredondado ou emarginado, nunca agudo, e frutos bacáceos (GOLDENBERG R; 2004).

A *Miconia Lategrenata* (DC) Naudin (FIG. 22) é um arbusto com dois a cinco metros de altura; com ramos, pecíolos, face abaxial das folhas, inflorescências e

hipanto esparsamente recobertos por tricomas estrelados e glabros (GOLDENBERG R ; 2004). Apresenta o nome popular de “pixiricão” (LISTA DE PLANTAS NATIVAS DO BRASIL, 2004).

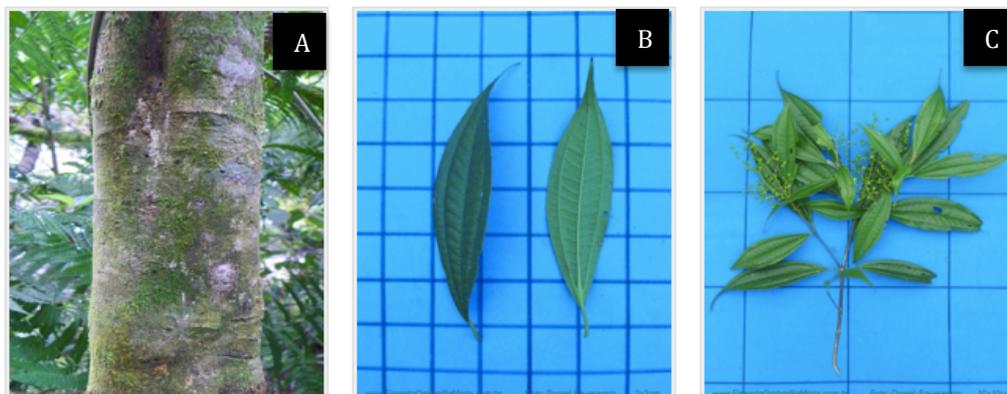


Figura 22. *Miconia lategrenata*. São mostrados (A) Madeira, (B) folhas, (C) frutos (Sistema de Identificação Dendrológica Online - Floresta Ombrófila Mista, 2014).

Extratos desta espécie demonstraram ação antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antimutagênica, tripassomicida e antimalárica (HASRAT et al., 1997, SPESSOTO et al., 2003, CUNHA et al., 2008, PIERONI et al., 2011).

Psychotria suterella

A espécie *Psychotria suterella* Müll. Arg. (FIG. 23), pertencente à família Rubiaceae, é um arbusto de até seis metros de altura, encontrado em florestas tropicais da costa do Brasil (DILLEMBURG & PORTO, 1985, CARVALHO et al., 2000). O gênero é reconhecido pela produção de alcalóides e apresenta entre 1.000 a 1.600 espécies catalogadas (NEPOKROEFF et al., 1999). É popularmente conhecida como “cafezinho roxo da mata” (LISTA DE ÁRVORES NATIVAS DO BRASIL, 2004).



Figura 23. *Psychotria suterella*. São mostrados (A) Arbusto, (B) Fruto e (C) Folhas (UFRG, 2014).

Estudos demonstram sua ação antioxidante, antimutagênica e analgésica (ELISABETSKY et al., 1997, FRAGOSO et al., 2008), sendo comumente reconhecida por seus efeitos psicotrópicos devido principalmente à presença de alcaloides (LOPES et al., 2004).

Strychnos pseudoquina

O gênero *Strychnos* é constituído por cerca de 150 espécies encontradas em todo o mundo, especialmente nas Américas do Sul e Central, na África, Ásia e Austrália (SILVA et al., 2005). A maioria das espécies ocorre na forma de cipós ou arbustos de pequeno porte, exceto a *S. pseudoquina*, nativa da América do Sul, que se apresenta como árvore de médio porte, com sua altura variando de três a cinco metros (LORENZI H., 1998, SILVA et al., 2005).

S. pseudoquina St. Hil. (Família Loganiaceae) é popularmente conhecida como “quina do cerrado”, “casca aromática”, “falsa quina”, “quina branca”, “quina do campo” e “quina mineira” (FIG. 25) É típica do Cerrado e apresenta casca grossa, folha oval, frutas pequenas, arredondadas e amareladas (NICOLETTI et al. , 1984; HONÓRIO-FRANÇA et al., 2008).



Figura 24. *Strychnos pseudoquina*. São mostrados (A) Fruto, (B) Folhas e (C) Flores (KEW.org/science, 2014).

Essa espécie vem sendo usada na medicina popular no tratamento de “distúrbios gástricos, da malária, como relaxante muscular e com atividade antimicrobiana, sedativa, antidiarreica e antipirética (FRANCO et al., 1969; NICOLETTI et al. , 1984; SILVA et al., 2005, HONÓRIO-FRANÇA et al., 2008).

Ensaio de biodistribuição usando o ^{99cm}Tecnésio

Compostos radiomarcados são administrados para fins terapêuticos ou

diagnósticos, para identificar processos fisiopatológicos ou ainda em estudos pré-clínicos para avaliação do perfil de biodistribuição de compostos. Para esse caso, os radiofármacos são marcados com um radionuclídeo emissor de radiação gama, que apresenta energia de 100 a 500 keV. Após sua administração, os radiofármacos penetram nos tecidos e, por meio de uma câmara gama, pode-se realizar a detecção e medida da radiação. Este procedimento permite avaliar a biodistribuição do radiofármaco e localizar os focos onde o radiotraçador é mais captado. Como a distribuição *in vivo* do radiofármaco é determinada pelas características fisiológicas dos tecidos, ela pode fornecer importantes informações sobre vários tecidos, de forma não-invasiva (BOERMAN et al., 2000).

O radionuclídeo deve emitir uma radiação que seja detectável por um equipamento específico, além de expor o paciente a doses atóxicas de radiação (THRALL e ZIESSMAN, 2001; SAHA, 2004). Existe uma variedade de radionuclídeos usados em medicina nuclear, tais como iodo-131 (^{131}I), índio-111 (^{111}In), tálio-201 (^{201}Tl), flúor-18 (^{18}F), tecnécio-99 metaestável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), gálio-67 (^{67}Ga); dentre outros (SAHA, 2004).

Como elemento de número atômico 43, o tecnécio é um metal de transição e apresenta como característica seu estado de oxidação (-1 a +7). Deste modo, é capaz de formar complexos metais/doadores, que são formados pela ligação entre o metal deficiente de elétrons com átomos ou grupos funcionais (aminas, amidas, tióis, fosfinas, oximas e isonitrilas) capazes de doar pares de elétrons (ARAÚJO, 1998). O uso deste marcador é resultado de sua alta disponibilidade, baixo custo e, ainda, por apresentar características nucleares e físicas extremamente favoráveis: emissão de baixa energia gama (140 keV) e meia-vida de seis horas, oferecendo um baixo risco de exposição à radiação (ASSIS, 2007).

No meio aquoso, o $^{99\text{m}}$ tecnécio é quimicamente estável, na forma de pertecnetato: $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. Quando injetado no organismo, o pertecnetato é captado pela glândula tireoide devido à sua similaridade com o iodeto, em relação ao seu raio atômico e à carga negativa. Para alcançar outros sítios, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ precisa ligar-se a um carreador, usualmente um agente quelante. Para isso, é necessário que o mesmo seja reduzido, tornando-se capaz de se ligar a grupos ou átomos doadores de elétrons, sendo que a estabilidade do complexo aumenta com o aumento do número de ligações com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O cloreto de estanho II ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é o agente

reduzido mais comum usado na preparação de compostos ligados ao ^{99m}Tc (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 1998).

Muitos agentes quelantes complexam-se com o ^{99m}Tc e têm afinidade por certos tecidos, sendo, assim, utilizados para realizar imagens cintilográficas (HJELSTUEN, 1995). Na ausência de ligantes, o ^{99m}Tc reduzido apresenta-se na forma de $^{99m}\text{TcO}_2$, um coloide que, se injetado no organismo, é captado pelas células do sistema fagocítico mononuclear.

Diante das vantagens descritas, o ^{99m}Tc foi o radiotraçador escolhido para a marcação do flavonoide Strychnobiflavona, isolado de extrato obtido das cascas do caule de *S. pseudoquina* e realização dos estudos de biodistribuição *in vivo*, no presente trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar produtos naturais bioativos a partir das espécies *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata*, *Psychotria suterella* e *Strychnos pseudoquina*, visando obter um composto com atividade antileishmanial.

Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antileishmanial dos extratos obtidos de *A. glandulosa*, *M. latecrenata*, *P. suterella* e *S. pseudoquina* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e avaliar a citotoxicidade dos produtos que apresentam melhor atividade antileishmanial.
- Fracionar o extrato e purificar produtos naturais que apresentarem os melhores resultados de atividade antileishmanial e de citotoxicidade.
- Verificar a efetividade dos produtos selecionados na inibição e no tratamento da infecção de macrófagos por formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- Avaliar a atividade antileishmanial da Strychnobiflavona contra formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e a ação da Strychnibiflavona no tratamento de macrófagos infectados por *L. infantum*.
- Avaliar *in vitro* os possíveis mecanismos de ação do protótipo a fármaco em formas promastigotas de *L. infantum*, tais como: a) alteração da permeabilidade da membrana celular; b) produção de espécies reativas de oxigênio e c) avaliação do potencial da membrana mitocondrial.
- Avaliar a biodistribuição *in vivo* utilizando a marcação com ^{99m}Tc do flavonóide Strychnobiflavona.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pesquisa bibliográfica

Com a ideia inicial do projeto iniciou-se a pesquisa bibliográfica em maio de 2011, sendo avaliados artigos escritos em inglês, espanhol e português. Para a pesquisa dos artigos, foram usadas as seguintes bases de dados: PubMed, Periódicos CAPES, Google Acadêmico, Ministério da Saúde do Brasil, *World Health Organization* e *Drugs for Neglected Diseases Initiative*. Os termos utilizados para a busca foram: “*Leishmania*; antileishmanial activity; leishmanicidal activity; treatment of leishmaniasis; drugs against leishmaniasis; cutaneous leishmaniasis; visceral leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; *Leishmania infantum*, necrose, apoptose, amphotericin B, miltefosine, paramocyn, pentavalent antimony, pentamidine, *Strychnos pseudoquina*; *Alchornea glandulosa*; *Psychotria suterella*; *Miconia Latecrenata*; History of leishmaniasis; ROS; mitochondrial damage, Plants used for treatment; Natural Products, Cerrado, Mata Atlântica, *Hotsport*, Plantas do cerrado usadas na medicina popular, Biodiversidade brasileira, Strychnosbiflavona, 3-O-metil éter quercetina e flavonoids”.

4.2. Animais de experimentação

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (Protocolo nº. 136/2012, Anexo 2). Camundongos BALB/c fêmeas, de oito semanas de idade, foram utilizados. Os animais foram adquiridos junto ao Biotério Central (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, sob as devidas condições de manejo.

O tamanho da amostra de três animais por grupo, foi calculada usando o Programa GRAPHpad StateMate Prisma.

4.3. Parasitos

Foram utilizadas a cepa IFLA/BR/1967/PH-8 de *L. amazonensis* e a cepa MHOM/BR/1970/BH46 de *L. infantum*. Os parasitos foram cultivados de acordo com o protocolo descrito por Coelho et al. (2003).

4.4. Coleta e identificação do material vegetal

Foram coletadas folhas das espécies vegetais nativas da Mata Atlântica (*Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrenata*, *Psychotria suterella*) no mês de dezembro de 2010, na trilha “Vale do Ouro” localizada dentro da Unidade de Conservação (UC) Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, no município de Araponga (Minas Gerais, Brasil). A “Licença de autorização de coleta” na UC foi expedida pelo Instituto Estadual de Floresta de Minas Gerais, (N^o UC 073/07, COL 050/07). A identificação das espécies foi realizada por confronto de exsicatas no Herbário VIC, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para a espécie nativa do cerrado, *S. pseudoquina*, as cascas do caule foram coletadas em áreas de dominância desse bioma no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil). Exsicata da espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (código HUFU 10936).

As árvores nas quais foram coletadas as espécies vegetais utilizadas neste trabalho foram georeferenciadas. As partes coletadas das espécies foram separadas e secadas em estufa ventilada escura a temperatura de 37 °C por 48 horas, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de faca.

4.5. Estudo fitoquímico biomonitorado do extrato de *S. pseudoquina*

Parte das cascas do caule de *S. pseudoquina* (480 g) foi submetida à extração por percolação seriada empregando uma série eluotrópica com solventes em ordem crescente de polaridade. Iniciou-se a percolação utilizando hexano (PA) como solvente extrator de forma exaustiva até completa extração dos compostos solúveis neste solvente. Ao final dessa extração, o extrato líquido foi concentrado até a remoção completa do solvente em evaporador rotatório, resultando em 2,0g do extrato hexânico (0,4%). Em seguida, com a droga vegetal que permaneceu retido no percolador, iniciou-se a extração exaustiva com acetato de etila PA, sendo o mesmo concentrado em evaporador rotatório e, posteriormente liofilizados, levando à obtenção de 36,3 g de extrato em acetato de etila (7,6%).

Um ensaio antileishmanial foi realizado para verificar a atividade dos extratos obtidos das diferentes plantas, e verificou-se que o extrato acetato em etila de *S. pseudoquina* foi aquele que apresentou o melhor resultado de atividade contra *Leishmania spp.* Por este motivo a *S. pseudoquina* foi utilizada para a continuidade

dos experimentos. O extrato acetato de etila da planta foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica Gel, sendo obtidas 426 frações. De acordo com os grupos químicos, as frações foram divididas em 29 grupos e os mesmos foram avaliados quanto à atividade antileishmanial (dados não mostrados). Desses, quatro grupos foram selecionados, sendo que dois grupos ativos foram submetidos à posterior purificação cromatográfica, levando à obtenção dos flavonoides 3-O-metil éter quercetina e Strychnobiflavona (FIG. 25).

A elucidação estrutural dos compostos purificados foi realizada após a análise de espectros no ultravioleta, infravermelho, espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear. A parte de fracionamento das amostras foi realizada no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, sob a supervisão do Prof. João Paulo Viana Leite.

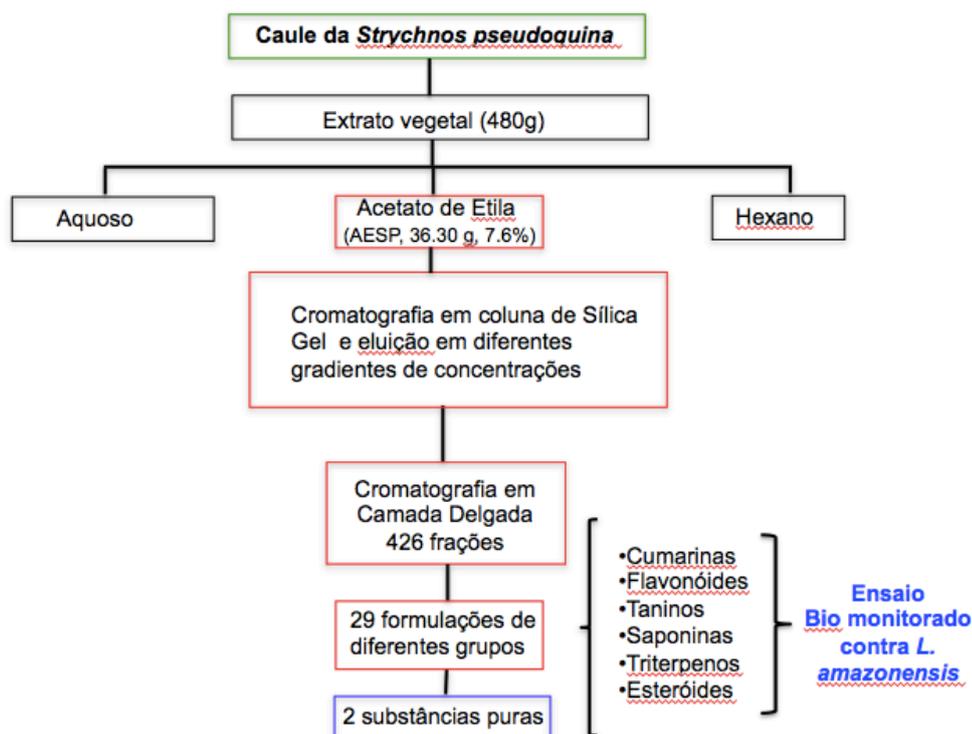


Figura 25. Fracionamento cromatográfico da espécie *Strychnos pseudoquina*.

4.6. Ensaio de atividade antileishmanial sobre formas promastigotas de *Leishmania spp.*

Em uma placa de cultura celular de 96 poços (Nunc, Nunclon[®]), 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* foram incubadas com

diferentes concentrações dos extratos (0.78 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou com os flavonoides já purificados, 3-O-metil éter quercetina (1.09 to 140 μM) e strychnobiflavona (0.62 to 79.5 μM); em meio RPMI-PR⁻ e em um volume final de 100 μL , por 48 h e a 24°C. A viabilidade das promastigotas foi verificada pela atividade oxidativa mitocondrial por meio do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromídeo) que consiste na adição de 10 μL de MTT por poço (na concentração de 5 mg/mL) e posterior incubação por 4h em estufa, a 24°C. Em seguida, foi adicionada à placa 60 μL de dodecil sulfato de sódio a 10% de ácido clorídrico (SDS 10%/ HCL 0,1 M) e incubado por 18 h em estufa a 24°C. Ao final do ensaio, o sobrenadante foi lido a 570 nanômetros (nm), em leitor de microplacas (LABTRADE, modelo 660).

Como controle positivo, a anfotericina B foi utilizada na concentração de 1 μM . Poços contendo apenas promastigotas em meio RPMI-PR⁻ foram usados como controle negativo. Em conjunto, foi feito o controle do solvente utilizado para dissolver os compostos (dimetil sulfóxido – DMSO), sendo que o mesmo foi adicionado na placa na proporção máxima de 1% do volume final do poço.

A determinação dos valores de IC₅₀ (concentração inibitória) ou CE₅₀ (concentração efetiva), ou seja, a concentração da amostra necessária para inviabilizar 50% dos parasitos, foi obtida por análise de regressão não-linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

4.7. Citotoxicidade em macrófagos murinos

Um ensaio foi realizado para a avaliação da citotoxicidade sobre células de mamíferos, no caso, macrófagos murinos, utilizando as amostras que apresentaram os melhores resultados de atividade antileishmanial. Para tal, foram inoculados, por via peritoneal, 3 mL de uma solução de tioglicolato 3% em camundongos BALB/c. Após quatro dias, a eutanásia dos animais foi realizada com a posterior extração dos macrófagos. Estes foram centrifugados a 1.200 x g por 20 min e a 4°C, sendo ressuspensos em 1 mL de meio RPMI completo (meio RPMI acrescido com 20% de soro fetal bovino inativado e os antibióticos penicilina e estreptomicina (Sigma).

Macrófagos foram quantificados em câmara de Neubauer e plaqueados em placas de cultura celular de 96 poços (5×10^5 células), sendo incubados por 24 h em

estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, diferentes concentrações dos extratos (0.78 to 100 µg/mL) e flavonoides 3-O-metil éter quercetina (1.09 to 140 µM) e strychnobiflavona (0.62 to 79.5 µM) foram adicionadas, e a placa foi incubada por 48 h em estufa a 5% de CO₂, a 37°C. Após este período, adicionou-se 50 µL de MTT e uma nova incubação foi realizada por 4 h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. As células foram solubilizadas em solução de SDS 10%/ HCl 0.1 M por 18 h e as absorbâncias foram determinadas a 540 nm, em leitor de microplacas.

A determinação da CC₅₀, ou seja, a concentração da amostra necessária para inviabilizar 50% dos macrófagos, foi obtida por análise de regressão não-linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes.

4.8. Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade ($IS=CC_{50}/IC_{50}$) demonstra a relação entre a citotoxicidade e a atividade biológica sobre os parasitos. Esse índice representa o potencial efetivo das substâncias sobre o parasito em relação a sua citotoxicidade. Preconiza-se que um fármaco com potencial deva apresentar um valor de IS superior a 10.0 (OSÓRIO et al., 2007).

4.9. Tratamento de macrófagos infectados

Macrófagos peritoneais foram extraídos, quantificados e plaqueados na concentração de 5×10^5 células por poço, em placas de cultura celular de 24 poços (Nunc®). Posteriormente, foram incubados por 2 h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas em meio RPMI completo para a retirada dos macrófagos não-aderidos. Então, formas promastigotas estacionárias de *L. amazonensis* ou *L. infantum* foram quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 5×10^6 em placas de 24 wells e estas foram incubadas com os macrófagos (proporção de 1 macrófago para 10 parasitos) durante 4 h em estufa de 5% de CO₂, a 37°C. As células foram lavadas para a retirada dos parasitos não-aderidos e não-fagocitados e, em seguida, macrófagos infectados foram tratados com 3-O-metil éter quercetina (0, 70, 140, or 280 µM) ou Strychnobiflavona (0, 40, 80, or 160 µM), por 48 h e a 24°C. Como controle positivo, a anfotericina B foi utilizada na concentração de 1 µg/mL. Após a incubação, as células foram coradas pelo método Panótico, conforme descrição do fabricante

Renylab[®] e a porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 200 células, em triplicata, no microscópio óptico.. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes, realizados em triplicata, que apresentaram resultados semelhantes.

4.10. Ensaio de inibição da infecção de macrófagos

Formas promastigotas estacionárias de *L. amazonensis* (1×10^6 células) foram previamente incubadas com 3-o-metil éter quercetina (0, 70, 140, or 280 μM) ou Strychnobiflavona (0, 40, 80, or 160 μM), por 4 hs e a 24°C. Após a incubação, os parasitos foram lavados três vezes com meio RPMI 1640, quantificados e incubadas durante 24 h com macrófagos murinos, na proporção de 10 parasitos para 1 macrófago. Posteriormente, as células foram lavadas e coradas pelo método panótico, conforme descrição do fabricante Renylab[®], e a porcentagem de macrófagos infectados foi determinada após a contagem de 200 células, realizada em triplicata. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes, realizadas em triplicata, que apresentaram resultados semelhantes.

4.11. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada por meio da incubação dos produtos com suspensões de hemácias humanas do grupo O⁺, na concentração de 5% de CO₂, por 1 h e a 37°C. A suspensão de hemácias foi centrifugada a 1000 x g por 10 min, e a lise celular foi determinada espectrofotometricamente (570 nm). A ausência de hemólise (branco) ou a lise completa das hemáceas (controle positivo) foi determinada através da substituição dos produtos por um volume igual de PBS ou água destilada, respectivamente. Os resultados foram determinados pela porcentagem de hemólise, quando comparada com ao branco e ao controle positivo. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes, realizadas em triplicata, que apresentaram resultados semelhantes.

4. 12. Avaliação dos mecanismos de ação em promastigotas de *L. infantum*

4.12.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática

O SYTOX[®] Green é um fluoróforo utilizado para avaliar a permeabilidade da membrana das células, por meio de sua ligação ao DNA. Neste caso, o método foi utilizado para observar se a substância estudada alterava ou não a permeabilidade da membrana plasmática de formas promastigotas de *L. infantum*. A substância testada foi a Strychnobiflavona, com seus respectivos valores de Concentração Efetiva a 99% (CE99). Para tal, formas promastigotas estacionárias (2×10^6 parasitos/poço) foram lavadas com PBS e incubadas com 30 μ L de SYTOX[®] Green (1 μ M) em placas escuras de 96 poços, por 15 min em estufa à 24°C, e, posteriormente, a substância foi adicionada. O aumento na fluorescência pela ligação do marcador fluorescente ao DNA do parasito foi mensurado utilizando-se o espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader), com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. As leituras foram realizadas a cada 20 min, em um total de 320 min. A normalização das leituras foi realizada subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado (controle). A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 a 0,5% (controle positivo) (Kulkarni et al., 2009). Para controle, foram usados poços contendo a substância em estudo, adicionados de meio de cultura e o fluoróforo em questão para avaliar o possível aumento de fluorescência na presença da substância. Além disso, o reagente DMSO foi utilizado como controle para verificar a possível interferência nos resultados.

4.12. 2. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) (diacetato de dicloro hidro fluoresceína) é uma forma quimicamente reduzida de fluoresceína utilizada como um indicador de EROs. Após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, a sonda H2DCF-DA, que não é fluorescente, é convertida para a forma altamente fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein 47(DCF). Esse método foi utilizado para avaliar a produção de ROS nos parasitos. Formas promastigotas estacionárias de *L. infantum* (2×10^6 parasitos por poço) foram lavados em solução HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) e incubados com Strychnobiflavona, no valor da CE99 por 60 min a 120 min. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas por 15 min com H2DCF-DA (5 μ M) e a leitura da fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-

Mode Microplate Reader), com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Como controle positivo, parasitos tratados com azida sódica (20 μ M) foram utilizados (Carvalho et al., 2011); e parasitos não-tratados foram usados como controle negativo. A normalização da leitura foi realizada subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado (controle). Poços contendo a substância em estudo, adicionados de meio de cultura e o fluoróforo em questão foram utilizados para avaliar a fluorescência da substância. Além disso, o solvente utilizado metanol ou DMSO foi utilizado como controle para verificar possível interferência nos resultados.

4.12.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A Rodamina 123 (R123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. Esse fluorocromo tem características lipofílicas e catiônicas, que permitem sua atração pelo alto potencial elétrico presente na membrana mitocondrial, acumulando-se preferencialmente na matriz dessa organela. Devido a essa propriedade, R123 tem sido utilizada para quantificar o potencial de membrana em diferentes tipos celulares (KOOPMANN et al., 2005). As reduções na intensidade de fluorescência desta sonda representam a perda do potencial de membrana. Formas pomastigotas de *L. infantum* (2×10^6 parasitos por poço) foram lavados em solução HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) e incubados com Strychnobiflavona, no valor da CE99, por 60 min a 120 min. Posteriormente, 20 μ L de Rodamina 123 (0,3 mg/mL) foram adicionados às amostras, e houve uma incubação por 10 min, em estufa de CO₂ a 37°C. Após, foi feita uma centrifugação das amostras a 2.000 x g por 10 min, e as mesmas foram transferidas para uma placa escura de 96 wells (SPL Life Sciences), tendo sido feita a leitura da fluorescência em espectrofluorímetro de placas, em filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm.

4. 13. Radiomarcção de Strychnobiflanova e pureza radioquímica

Para radiomarcção de Strychnobiflanove, o método desenvolvido por Hosseinimehr et al., 2010, foi usado com algumas modificações. Resumidamente, Strychnobiflavona foi dissolvido em uma mistura de etanol absoluto, a solução de Cloreto estanoso II (SnCl₂.2H₂O) que foi preparada em HCl 0,25 N. Uma solução composta por 500 μ L de Strychnobiflavona (1 mg / mL), 20 μ L de SnCl₂.2H₂O (1 mg

/ mL) e 200 uL de solução de tampão fosfato pH 7,6 (PBS) foi misturada num frasco de vidro de 10 ml, e solução de ^{99m}Tc -pertechnetato de sódio (100 uL $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$ / 63 MBq), IPEN / Cnen / Brasil, foi adicionado à solução. A mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 30 min. Depois, a mistura foi incubada durante 15 minutos com 200 mg de sílica e centrifugado. O sobrenadante foi removido. A pureza radioquímica (PR) do ^{99m}Tc -Strychnobiflavona foi determinada por cromatografia em camada fina sobre tiras de sílica (CCF-SG, Merck, Darmstadt, Alemanha). A acetona foi usado para quantificar o tecnécio hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$) e solução salina a 0,9% de NaCl foi utilizado para determinar a quantidade de tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$). O ^{99m}Tc -Strychnobiflavona não se moveu sobre tiras de sílica, quando a solução salina é utilizada, enquanto que o composto radiomarcado migrou para o topo da tira utilizando acetona como solvente (FIG 27).

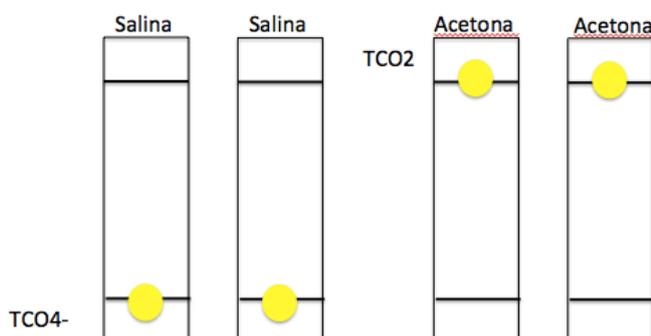


Figura 26. Distribuição do TCO_2 e TCO_4^- em Sílica

A radioatividade foi medida utilizando um contador gama (Wallac 1470 Assistente Contador Gama, Perkin Elmer, Turku, Finlândia). A pureza radioquímica (PR) foi determinada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ PR} = \frac{\text{cpm of } ^{99m}\text{Tc-Strychnobiflavona}}{\sum \text{cpm} (^{99m}\text{TcO}_2 + ^{99m}\text{TcO}_4^- + ^{99m}\text{Tc-Strychnobiflavona)} \times 100$$

cpm= contagem por minuto

4.14. Estudos *in vivo* de biodistribuição

Para as análises de biodistribuição *in vivo* foram utilizados camundongos Balb/c (n = 3 por grupo). Alíquotas contendo 3,2 MBq de ^{99m}Tc-Strychnobiflavona foram administradas na veia da cauda em camundongos saudáveis. A 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e, em seguida, submetidos a eutanásia. As amostras de sangue, coração, baço, fígado e os rins foram retirados para análise. Cada órgão ou tecido foi pesado, e a radioatividade foi determinada num contador gama automático (Wizard, Finlândia). Uma alíquota de ^{99m}Tc-Strychnobiflavone contendo a mesma dose injetada foi contado simultaneamente num tubo em separado, o qual foi definido como 100% a radioatividade. Os resultados foram expressos como a percentagem da dose injetada por grama de tecido (% ID/g) de acordo com a seguinte equação:

$$\%ID/g = \frac{\text{cpm/g /órgão}}{\text{Padrão de dose (cmp)}} \times 100$$

4.15. Imagens cintilográficas

Para imagens cintilográficas foram utilizados camundongos Balb/c (n = 3 por grupo). Alíquotas contendo 3,2 MBq de ^{99m}Tc-Strychnobiflavona foram administradas na veia da cauda em ratos saudáveis. A 1, 3, 6 e 24 horas após a administração, os ratos foram anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e colocados em posição supina sob uma câmara de raios gama (Mediso, Budapeste, Hungria), utilizando um baixo consumo de energia colimador de alta resolução. As imagens foram adquiridas utilizando um tamanho de 256 × 256 × 16 matriz, com uma janela de 20% de energia fixada em 140 keV por um período de 10 min como descrito por Diniz et al., 2008.

4.16. Análises estatísticas

Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism[®] 5.0 para Windows. A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, usado para comparações múltiplas entre os grupos. As diferenças dos valores obtidos nas análises do mecanismo de ação foram avaliadas por ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram

expressos pela média de três experimentos independentes, acompanhada de seus respectivos limites de confiança ao nível de 95%. Valores de $P < 0.05$ foram considerados como indicativos de significância.

SÍNTESE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da atividade contra *L. amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos de extratos de *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrema*, *Psychotria suterella* e *Strychnos pseudoquina*,

Inicialmente, as espécies *Alchornea glandulosa*, *Miconia latecrema*, *Psychotria suterella* e *Strychnos pseudoquina* foram avaliadas, sob a forma de extratos de acetato de etila, e os resultados da atividade antileishmanial (IC₅₀) em *L. amazonensis* e a citotoxicidade (CC₅₀) em macrófagos murinos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Atividade antileishmanial e citotoxicidade das espécies de plantas avaliadas.

Compostos (em µg/mL)	IC ₅₀ ^a	CC ₅₀ ^b	IS ^c
<i>P. suterella</i>	10.62	189.75	17.86
<i>A. glandulosa</i>	366.50	271.85	0.74
<i>M. latecrenata</i>	75.73	181.40	2.39
<i>S. pseudoquina</i>	24.90	257.9	10.4

^a Valor da concentração da amostra necessária para inviabilizar 50% dos parasitos.

^b Valor da concentração da amostra necessária para inviabilizar 50% dos macrófagos.

^c Valor da relação entre a citotoxicidade e a atividade biológica nos parasitos.

Os dados encontrados demonstraram que as espécies *A. glandulosa* e *M. latecrenata* não apresentaram atividade biológica. Em relação a *P. suterella* e *S. pseudoquina*, seus extratos apresentaram atividade antileishmanial satisfatória, além de baixa citotoxicidade e índice de seletividade adequado. Tentamos obter a espécie *P. suterella* para novos experimentos, porém, fomos informados de que a mesma, por se encontrar em extinção, não é comercializada. Desta forma, passamos a trabalhar com a espécie *S. pseudoquina*.

5.2. Purificação da espécie *S. pseudoquina*, avaliação da atividade antileishmanial das substâncias puras, inibição e tratamento de macrófago infectado por formas promastigotas de *L. amazonensis*

Como *S. pseudoquina* apresentou um resultado de IS satisfatório, a mesma foi fracionada e dois flavonoides foram obtidos, como sendo alguns os principais responsáveis pela atividade antileishmanial. Desta forma, com os experimentos

realizados, um artigo científico foi publicado (Apêndice), no qual são mostrados os resultados e a discussão desta parte da Tese são mostrados sob a forma de artigo supracitado.

5.3. Atividade antileishmanial, tratamento de macrófagos infectados e avaliação do mecanismo de ação do flavonoide Strychnobiflavona sobre *L. infantum*; além de estudos de sua biodistribuição *in vivo*

O flavonoide Strychnobiflavona apresentou atividade biológica significativa contra *L. infantum*, bom como foi efetivo no tratamento de macrófagos infectados por essa espécie de *Leishmania spp.* Tais resultados estão inseridos em um novo artigo científico que foi preparado e encontra-se em fase final de avaliação, antes de sua submissão (Apêndice).

Os possíveis mecanismos de ação foram avaliados segundo:

- I) Alteração da permeabilidade da membrana: Strychnobiflavona não foi capaz de provocar alterações na permeabilidade da membrana de *L. infantum*.
- II) Produção de espécies reativas de oxigênio: o flavonoide não estimulou a geração de espécies reativas de oxigênio.
- III) Avaliação do potencial da membrana mitocondrial: a Strychnobiflavona mostrou-se capaz de promover alteração no potencial de membrana mitocondrial.

Realizou-se estudo de biodistribuição do flavonoide, com o intuito de avaliar a porcentagem de dose retida nos órgãos de animais saudáveis. Os resultados indicam ter ocorrido maior concentração do flavonoide no fígado e baço dos animais, 24 horas após a injeção do composto radiomarcado. Tais dados estão também inseridos no artigo científico citado acima.

RESUMO DOS RESULTADOS

- O extrato de acetato de etila da *S. pseudoquina* apresentou a melhor atividade antileishmanial, dentre os extratos testados, contra a espécie *L. amazonensis*; além de não ter apresentado citotoxicidade em macrófagos murinos.
- Os flavonoides 3-O-metil éter quercetina e Strychnobiflavona foram purificados a partir do extrato de acetato de etila de *Strychnos pseudoquina*, e classificados como principais responsáveis pela atividade antileishmanial do extrato.
- Os flavonoides 3-O-metil éter quercetina e strychnobiflavona foram efetivos no tratamento de macrófagos infectados e na inibição da infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis*.
- O flavonoide Strychnobiflavona foi capaz de promover alteração no potencial de membrana mitocondrial de *L. infantum*, sendo esse o possível mecanismo de ação do composto.
- O flavonoide Strychnobiflavona foi encontrado predominantemente no fígado e baço dos animais nos tempos avaliados.

CONCLUSÃO

A espécie *Strychnos pseudoquina* apresentou a melhor atividade antileishmanial dentre as plantas testadas e dois de seus flavonóides, identificados como os principais responsáveis por tal atividade. Devido à seu caráter atóxico em células de mamíferos, ausência de atividade hemolítica e sua concentração orgânica no fígado dos animais, tal composto tornam-se candidatos a ser avaliado em experimentos *in vivo*, visando à procura de novos fármacos para tratamento das leishmanioses.

PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Como perspectivas, pretende-se:

1) Testar a efetividade do flavonóide Strychnobiflavona contra a espécie *L. brasiliensis*.

2) Uma vez realizado o estudo de biodistribuição, sugerir o estudo de toxicidade.

3) Sugerir novas formulações farmacêuticas tais como as nanocarreadoras, e aplicá-las no tratamento da infecção experimental em camundongos infectados pela espécie *L. infantum*.

4) Desenvolver uma formulação de aplicação tópica e/ou oral utilizando o flavonoide Strychnobiflanova e utilizá-lo no tratamento da infecção experimental de camundongos BALB/c contra a espécie *L. infantum*.

5) Avaliar o grau de proteção do tratamento nos animais infectados e tratados, por meio de:

- Carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodos drenantes;
- Avaliação da resposta imune celular, por meio da produção das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, GM-CSF nos esplenócitos dos animais; e pela dosagem de óxido nítrico;
- Avaliação da resposta imune humoral, pela determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a específicos aos parasitos.

As limitações do estudo foram:

- Obtenção da substância pura: por se tratar de uma substância inédita, a mesma não é sintetizada comercialmente, sendo a síntese em laboratório laboriosa, devido ao número de centros quirais da molécula, dentre outros aspectos.

- O tempo médio de obtenção da substância pura é de um a dois anos, sendo necessária a repetição do processo para obter maior rendimento do produto.

ALVAR J., et al., WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence PLoS One.;7(5),p.e35671, 2012.

AMATO, V.S et al. Use of Itraconazole in the Treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A Pilot Study, International Journal of Infectious Diseases, v. 4(3), p. 153-157, 2000.

AMATO, V. S., et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. Am J Trop Med Hyg, v. 77, p. 266-274, 2007.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clin Exp Dermatol, v. 35, p. 699-705, 2010.

ARAÚJO, J. G. V. C. Estudos biológicos em hamsters infectados com *Leishmania amazonensis* empregando anticorpos (anti-amastigotas) marcados com 99mTecnécio. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 1998.

ASHFORD, R.W., DESJEUX, P., DERAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. Parasitol Today, v. 8, p. 104-105, 1992.

ASSIS D.N., BIODISTRIBUIÇÃO DO FLUCONAZOL MARCADO COM 99mTECNÉCIO, LIVRE E ENCAPSULADO EM NANOCÁPSULAS, EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO COM *Candida albicans*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 2007.

AZEVEDO, A.C.R., et al. Ecology of sand flies (Diptera: *Psychodidae: Phlebotominae*) in the north of the state of Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, p. 459-464, 2002.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESE, R.; FOCACCI, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, v. 2, p.1234- 1259, 1996.

BANKI K. et al., Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. J Immunol. Feb 1;162(3); p.1466-79, 1999.

BARRAL-NETTO, M., et al. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. Eur. Journ. Derm., [S. I.], V: 5, p. 104-113, 1995.

BATISTA, J.M. et al. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypansomal agents. Biol. Pharm. Bull.v 31, p.538–540, 2008.

BASANO, S. A., CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Bras. Epidemiol, v. 7, p. 329-337, 2004.

BERMAN, J. D., WADDELL, D., HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 27, p. 916-920, 1985.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica, Caderno 11. Leishmaniose visceral, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em 05 out 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, (Série A. Normas e Manuais Técnicos), p. 182, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico, v. 2, p. 11-13, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial. p. 26-37, 2006.

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. p 14; 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Cerrado. Disponível em: <http://www.portalbrasil.net/cerrado_vegetacao.htm>. Acesso em 01 out 2013.

BRENZAN MA. et al., Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. *Phytomedicine*. Feb 15;19(3-4); p.223-30, 2012.

BOERMAN, O. C. et al.. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Progress in Lipid Research*, v. 39, p. 461-475, 2000.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência hoje*, [S.l.], n.1.234, v. 21, p. 26-30, 1997.

CALVO T.R. et al., Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. *Biol Pharm Bull*. Mar;30(3),p.451-9, 2007.

CAMARGO, L. M. A., BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura*, v. 1, p. 34-37, 2003.

CARVALHO, L.M.T., FONTES, M.A.L. & OLIVEIRA FILHO, A.T. Tree species distribution in canopy gaps and mature forest in an area of cloud forest of the Ibitipoca range, south-eastern Brazil. *Plant Ecology*, v:149, p.9-22, 2000.

CASTES, M., et al. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol*, v. 27, p. 176-186, 1983.

CHAN-BACAB, M.J., PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep*, v. 18, p. 674-688, 2001.

CONEGERO, L. S. et al., Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Química Nova*, v. 26(6), p. 825-827, 2003.

CONVIT, J., et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, v. 66, p. 603-610, 1972.

COSTA, C.H.N., PEREIRA, H.F., ARAÚJO, M.V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saúde Pública*, v. 24, p. 361-372, 1990.
Conegero L. S., et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Quim. Nova*, v. 26, n.6, p. 825-827, 2003.

CHRISTOPHER, L. K.; AUWAERTER, P. G.; MAYER K. H. Coinfection with HIV and Tropical Infectious Diseases: Protozoal Pathogens. *Clinical Infectious Disease*, Arlington, v.45, n.9, p.1208-1213, 2007.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.19, n.1, p.111-126, 2006.

CUNHA W.R. et al, Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosa* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Fitoterapia*. Jul;79(5), p.356-60, 2008.

DA SILVA FILHO, A.A. et al. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother. Res.*, v. 22, p. 1307-1310, 2008.

DAVIDSON RN, DEN BOER M, RITMEIJER K. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Jul;103(7); p.653-60, 2009.

DE PAULA C.D.R. et al. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Sociedade Br de Medicina Tropical*, V.36, n.3, p.365-371, 2003.

DE SOUZA W., ATTÍAS M., RODRIGUES JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol*. Oct;41(10); p.2069-80, 2009.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 95, n. 3, p. 239-43, 2001.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Unesp, p.230;1995.

DIETZE, R. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CIMERMAN, Benjamin; CIMERMAN, Sérgio. Medicina Tropical. São Paulo: Atheneu. Capítulo 6, 85-99, 2003.

DILLENBURG, C. R. & PORTO, M. L. Tribo Psychotrie. Boletim Instituto de Biociências da UFRGS, p.76, 1985.

DINIZ SO, et al.. Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. Nucl Med Commun. Sep;29(9), p.830-6, 2008.

DO SOCORRO S et al., Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from Croton cajucara. Antimicrob Agents Chemother. Jun;47(6); p.1895-901, 2003.

DOGRA J & SAXENA VN, Itraconazole and leishmaniasis: a randomised double-blind trial in cutaneous disease. Int J Parasitol; Dec; 26(12), p.1413-5, 1996.

DORLO T.P. et al., Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. Antimicrob Chemother; V:11; p.2576-97, 2012.

DOMÍNIO DO CERRADO, Embrapa. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_23_911200585232.html>. Acesso: em 05 out. 2014.

DOS SANTOS R.A. et al., Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. Parasitology. Sep;138(10), p.1224-33, 2011.

ELISABETSKY, E. et al., Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: An approach to unveil bioactive natural products. The case of Psychotria alkaloids as potential analgesics. Ciência e Cultura, v. 49, p. 378-385, 1997.

FERREIRA M.E. et al., Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. J Ethnopharmacol; 80(2-3); p.199-202, 2002.

FIDALGO L.M., GILLE L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. Pharm Res. Nov;28(11), p. 2758-70, 2011.

FRAGOSO V. et al. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of Psychotria umbellate Vell. Toxicology in vitro, v. 22, n. 3, p. 559-566, 2008.

FRANCO D.M., ALDO P.T., MARINI BETTÒLO G.B. The occurrence of nor-dihydrotoxiferine in Strychnos pseudoquina A. St. Hil. Tetrahedron Lett., v.25, p.2009-10, 1969.

FONSECA-SILVA F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. PLoS One, v. 6, n. 2, p. e14666, 2011.

GARCÍA, M., et al. Screening of medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. Pharm Biol, v. 48, n. 9, p. 1053-8, 2010.

GENARO O. & REIS A.B. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. et al. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, p. 67-83, 2005.

GOLDENBERG, Renato. O gênero *Miconia* (Melastomataceae) no Estado do Paraná, Brasil. Acta Bot. Bras. [online]., vol.18, n.4, p. 927-947; 2004.

GRABLEY, S & THIERICKE, R. In: Drug Discovery from Nature. Berlin: Springer; p. 3-37, 2000.

GRANDIC S.R. et al., In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. Biomed Pharmacother; V:58; p.388-92, 2004.

GREVELINK, S. A. & LERNER, E. A. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol, v. 34, p. 257-272, 1996.

GRIMALDI, G. J. R. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev, v. 6, p. 230-250, 1993.

HASRAT JA., et al., Medicinal plants in Suriname: screening of plant extracts for receptorbinding activity. Phytomedicine. Mar;4(1), p.59-65, 1997.

HAILU A et al., Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: a multicentre, open-label, randomized trial PLoS Negl Trop Dis. Oct 26;4(10):e709, 2010.

HEUSSLER VT; KÜENZI P; ROTTENBERG S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. Int J Parasitol. Sep;31(11)p.1166-76, 2001.

HJELSTUEN OK. Technetium-99m chelators in nuclear medicine. A review. Analyst. Mar;120(3); p.863-6, 1995.

HONÓRIO-FRANÇA A.C. et al. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (*Strychnos pseudoquina* ST. HILL). Acta Cirúrgica Brasileira, v.23, n.6, p. 504-10, 2008.

Hotspot. Área de conservação ambiental. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/como/index.php?id=8>>. Acesso em 20 de jan 2014.

HOSSEINIMEHR J.S. et al. Technetium-99m-Labeled Quercetin as a potential radical scavenging agent. Annual and International Congress of Nuclear Medicine, At Mashhad, Iran., Volume: Iran J Nucl Med; 18:(suppl 1), 2010.

IOSET J. R. Natural Products for Neglected Diseases: A Review. Current Organic Chemistry, v. 12, n. 8, p. 643-666, 2008.

JHA R.K. et al., The treatment of visceral leishmaniasis: safety and efficacy. JNMA J Nepal Med Assoc. Oct-Dec;52(192); p.645-51, 2013.

JENDROSSEK V & HANDRICK R. Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. Curr Med Chem Anticancer Agents. Sep;3(5); p.343-53, 2003.

LAINSON R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. Revista Paraense de Medicina, v. 11, p. 29-40, 1997.

LAINSON R. & SHAW J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. Nature, v. 273, p. 595-600, 1978.

LAVAUD C. et al., 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. Phytochemistry. V.40, n.1, p.317-320,1995.

LEISHMAN WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. Natl Med J India. Jul-Aug;7(4),p.196-200, 1994.

LEWINSOHN T. M. & PRADO, P. I. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, p. 176, 2002.

LIMA E.B. et al., Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. An. Bras. Dermatol.;V:82, p.111-24, 2007.

LOEFFLER M & KROEMER G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. Review, *Exp Cell Res*. Apr 10;256(1); p.19-26, 2000.

LOPES FC, CALVO TR, VILEGAS W, CARLOS IZ. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. Biol Pharm Bull. Sep;28(9), p.1726-30, 2005.

LORENZI H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2.ed., Nova Odessa: Plantarum, 1998.

LOZANO R. et al.; Global and regional mortality from 795 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet; v:380; p. 2095-2128, 2012.

KATO, MJ; FURLAN M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. Pure Appl. Chem., v.79, p. 529-538, 2007.

KAPOOR, P; SACHDEVA, M.; MADHUBALA, R., Effect of the microtubule stabilising agent taxol on leishmanial protozoan parasites in vitro, FEMS Microbiology Letters, v. 176(2), p. 429-435, 1999.

KOOPMAN, WJH et al., Simultaneous Quantitative Measurement and Automated Analysis of Mitochondrial Morphology, Mass, Potential, and Motility in Living Human Skin Fibroblasts. International Society for Analytical - Cytology Cytometry, V: 69A, p. 1-12, 2005.

KOWALTOWSKI AJ et al., Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb;280(2), p.H649-57, 2001.

KOWALTOWSKI AJ; CASTILHO RF; VERCESI AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. Apr 20;495(1-2); p.12-5, 2001.

KRAMP, KL et al., Derivatives of pentamidine designed target the Leishmania lipophosphoglycan. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 695-698, 2005.

DE MACEDO-SILVA ST. et al., In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*. Dec 23;8(12):e83247 , 2013.

MACHADO, P.A., et al. Effect of 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues in *Leishmania* species related to American cutaneous leishmaniasis. *Chem Biol Drug Des*, v. 80, p. 745-751, 2012.

MAIA-ELKHOURY, A.N., et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 12, p. 2941-7, 2008.

MALHI H; GORES GJ; LEMASTERS JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Review, *Hepatology*. Feb;43(2 Suppl 1):S; p.31-44, 2006.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 80, n.6, p. 859, 1986.

MARZOCHI KB, et al. [Epidemiological aspects of meningococcal disease. I. Morbidity study in nonepidemic and epidemic periods in the municipality of Londrina, Paraná, Brazil (1965-1975)]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.*, v:33,p.1-30,1981.

MARZOCHI, M.C.A., MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthrozoosis and Possibilities for Their Control. *Cad. Saúde Públ.* , v. 10, n.2, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M.C.A., MARZOCHI, K.B.F., SCHUBACH, A.O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CIMERMAN, Benjamin; CIMERMAN, Sérgio. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. 2. ed. São Paulo: Atheneu,. Capítulo 9, p. 39-56, 2010.

Mata Atlântica, Ministério do Meio Ambiente do Brasil, 2014. Disponível em : < <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica> >. Acesso em 29 jan. 2014.

Mata Atlântica, Portal SOS Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.sosmatatlantica.org.br> . Acesso em 10 de dez. 2014.

Manual de recomendações para Diagnóstico, Tratamento e acompanhamento de pacientes com co-infecção *Leishmania*-HIV. Ministério da Saúde do Brasil, 2011.

Mecanismo de ação do Glucantime[®], Boletim Epidemiológico Paulista. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_Ita.htm>. Acesso: 29 set. 2013.

MENDONÇA-FILHO, R.R., et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (*Palmae*). Res Microbiol, v. 155, p. 136-43, 2004.

MEHTA A & SHAHA C. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione. Free Radic Biol Med.; May 15; 40(10); p.1857-68, 2006.

Miconia Lategrenata. Sistema de Identificação Dendrológica Online - Floresta Ombrófila Mista. Disponível em <http://florestaombrofilamista.com.br/sidol/?menu=species&menu=home&page=detail&s&id=16>. Acesso em 20 jan. 2014.

MIGONE, L. E., un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). Bulletin Societe Pathologic Exotique , v:6, p.118-120, 1913.

MIGUEL, M.D.;MIGUEL, O.G. Atenção Farmacêutica na Formação do Acadêmico de Farmácia. Visão Acadêmica. Curitiba, UFPR, 2000.

MISHRA B. B. et al, Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. Mini Rev Med Chem. Jan;9(1); p.107-23; 2009.

MISHRA, B.B. & TIWARI, V.K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. Eur J Med Chem, v. 46, n. 10, p. 4769-807, 2011.

MONZOTE L et al., Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. Exp Parasitol. Jan;136; p.20-6, 2014.

MORI-YASUMOTO, K., et al. Leishmanicidal activities and cytotoxicities of bisnaphthoquinone analogues and naphthol derivatives from *Burman Diospyros burmanica*. Bioorg Med Chem, v. 20, p. 5215-5219, 2012.

MUKHERJEE, A., et al., Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. Molecular e Biochemical Parasitology v. 145, p. 1-10, 2006.

NAGLE AS et al.,Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. Chem Rev. Nov 3, 2014.

NAVIN TR et al., Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. J Infect Dis. Mar;165(3), p.528-34, 1992.

NAKAMURA, C. V., et al. Atividade antileishmanial do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck ev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn, v. 16, n 1, p.61-66, 2006.

NDJONKA et al. Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases Int. J. Mol. Sci, v.14, n. 2, p.3395-3439, 2013.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B.; SYTSMA, K.J. Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. Systematic Botany, Laramie WY, v.24, n.1, p.5-27, 1999.

NETO G.G. & MORAIS R.G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de mato grosso: Um Estudo Bibliográfico. Acta bot. bras. v.17, n.4, p.561-584, 2003.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, M. K. The influence of natural products upon drug discovery. Nat Prod Rep., v. 17, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, DJ; CRAGG, GM; SNADER, KM, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002., J. Nat. Prod., , V:66, p.1022, 2003.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. J Nat Prod., v. 70, p. 461-477, 2007.

NICOLETTI M. et al., Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. J Nat Prod. Nov-Dec;47(6),p.953-7, 1984.

NOGUEIRA IR et al., Preparation, characterization, and topical delivery of paromomycin ion pairing. Drug Dev Ind Pharm. Sep;37(9); p.1083-9, 2011.

NOWOTNIK, D. P. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. Textbook of radiopharmacy theory and practice. v.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., Cap. 3, p. 53-72, 1990.

OKELO, G.B., SANG, D., BHATT, K.M. The treatment of diffuse cutaneous leishmaniasis: a report of two cases. East. Afr. Med. J., v. 68, p. 67-68, 1991.

OKETCH-RABAH H.A., et al., Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. J Nat Prod., v.60, n.5, p.458-61, 1997.

OLIVEIRA, L.F., et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. Acta Trop., v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

OLIVEIRA, D.A., PIETRAFESA, J.P., BARBALHO, M.G.S. Manutenção da Biodiversidade e o Hotspots Cerrado. Caminhos de Geografia, v. 9, n. 26, p. 101 – 114, 2008.

OSORIO E. et al., Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. J Ethnopharmacol.,v.111, n.3, p. 630-5, 2007.

PANDEY K et al., Pharmacotherapeutic options for visceral leishmaniasis—current scenario. *Clinical Medicine: Pathology*; 2:1–4, 2009.

PASSOS, V.M., et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 1, p. 103-10, 1993.

PARMAR, V.S.J. et al. Polyphenols and alkaloids from Piper species. *Phytochemistry*, V.49, p. 1069–1078, 1998.

PEYRON, C. et al., Synthesis and in vitro antileishmanial activity of 5-substituted-2'-deoxyuridine derivatives *Bioorganic Chemistry*, V: 33(6), p. 439-447, 2005.

PEDERSEN PL. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr*. Aug;31(4); p.291-304, 1999.

PESSOA, S.B., MARTINS, A.V. Leishmanioses tegumentares. In: *Parasitologia Médica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.78-87, 1988.

PIERONI L.G. et al., Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) *Triana* leaves. *Molecules*. Nov 10;16(11), p.9439-50, 2011.

PIGOTT DM et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. *Elife*. Jun 27;3. doi: 10.7554/eLife.02851, 2014.

Psychotria Suterella Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=11745. Acesso em 20 jan 2014.

POLONIO T & EFFERTH T., Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *Int J Mol Med*. Sep;22(3); p.277-86; 2008.

RAMÍREZ-MACÍAS, I., et al. Leishmanicidal activity of nine novel flavonoids from *Delphinium staphisagria*. *Scientific World Journal*, v. 2012, n. 203646, 2012.

RATH, S. , et al., Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose; estado da arte. *Química nova*, v.26(4), p. 550-555, 2003.

REGUERA, M. R; TEKWANI, B.L AND BALAÑA-FOUCE, R, Poliamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, v.140, p. 151-164, 2005.

RICHARD, J.V., WERBOVETZ, K.A. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr Opin Chem Biol*, V: 14, n. 4, p. 447-55, 2010.

ROCHA, C. et al. A biodiversidade nos grandes remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro e nas restingas da Mata Atlântica. São Carlos: Rima, 2003. [

ROCHA, C. F. D. et al. Pesquisas de longa duração na restinga de Jurubatiba. *Ecologia, história natural e conservação*. São Carlos: Rima, 2004.

ROCHA, L. G., et al. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6-7, p. 514-35, 2005.

RODRIGUES I. A. et al., In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7- hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. *BMC Complement Altern Med.*; Oct 2;v:13; p.249, 2013.

SAENZ RE, PAZ H, BERMAN JD. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med.* Aug;89(2), p.147-55, 1990.

SAHA, G. B. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4.ed. New York: Springer-Verlag, p.358; 1998.

SAHA, G.B. *Fundamental of Nuclear Pharmacy*. 5 ed. New York: Springer-Verlag, p.383; 2004.

SALEM MM & WERBOVETZ KA., Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr Med Chem.*;13(21), p.2571-98, 2006.

SAMPAIO RNR, et al.. Avaliação do tratamento da forma mucosa de Leishmaniose tegumentar americana com antimoniais pentavalentes. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, V:664, p.189-192, 1989.

SANTOS, R. V., COIMBRA, J. R.. *Epidemiologia e Saúde dos povos Indígenas no Brasil*. Rio de Janeiro, Ed. FIOCRUZ/ABRASCO. 260p. , 1994.

SERENO, D; HOLZMULLER, P AND LEMESTRE, J. L, Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* 74, p. 25-31, 2000.

SILVA M.A. et al., *Strychnos L. da América do Sul e Central*. *Rev Bras Farmacogn.*, V:15, p.256-67, 2005.

SILVEIRA, F. T., et al. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: Editora CEJUP, 1997.

SOARES-BEZERRA, R. J., LEON, L., GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revis Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, V: 40, p. 139-149, 2004.

SPESSOTO M.A., et al., Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine*. 10(6-7), p.606-9, 2003.

Strychnos pseudoquina. Disponível em:
http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large1/cat_single1-4010.htm
Acesso em 20 jan 2014.

SUNDAR S. Et al., Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. N Engl J Med. Jun 21; V: 356(25), p. 2571-81, 2007.

TAHIR, A.E. et al., The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. Phytother. Res. V:12, p.576–579, 1998.

TEMPONE, A.G., et al. Amphibian secretins for drug discovery studies: a search for a new antiparasitic and antifungal compounds. Letters in Drug Design & Discovery, n. 4, p. 67-73, 2007.

TEMPONE, A.G., OLIVEIRA, M.C., BERLINCK, R.G. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. Planta Med, v: 77, p. 572-85, 2011.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. Medicina Nuclear. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.408, 2001.

UEDA-NAKAMURA T et al., Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. Parasitol Int; V:55; p.99-105, 2006.

VALADARES, D.G., et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. Parasitol Int, v. 60, p. 357-363, 2011.

VARANDA E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VARJABEDIAN, Roberto. Lei da Mata Atlântica: Retrocesso ambiental. Estud. av., v.24, n.68, p. 147-160, 2010.

WERBOVETZ, K.A., et al. Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania* promastigotes *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, v. 36, n. 2, p. 495-7, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. http://www.who.int/leishmaniasis/en_. Acesso em 15 jan 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html. Acesso em 16 jan 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series. P.201. Organization W H. Geneva: World Health Organization. 2010.

WRIGHT, J.H. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer ("Delhi Sore"). J Med Res., v. 10, p. 472-482, 1903.

ZHAI, L., et al. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. J Antimicrob Chemother, v. 43, p. 793-803, 1999.

Anexo 1 - Documento comprobatório do depósito de patente nacional

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
- 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
- 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
- 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627. Pampulha, Belo Horizonte - MG BR
- 1.5 CEP: 31270-901 1.6 Telefone: (31) 3409-4774 1.7 Fax: (31) 3409-6430
- 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

 continua em folha anexa

-
- 2. Natureza:**
-
- Invenção
-
- Modelo de Utilidade
-
- Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: PATENTE DE INVENÇÃO

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

"Composições Farmacêuticas Antileishmania e Uso"

 continua em folha anexa

Anexo 2 - Comprovante de aprovação do projeto pelo CETEA da UFMG

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 67 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Pesquisa por novos adjuvantes de resposta imune utilizando o fungo *Agaricus blazei* para emprego em vacinas contra a leishmaniose visceral", que tem como responsável EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 04/06/2013. Este certificado espira-se em 04/06/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 67 / 2013, related to the Project entitled "Research for new adjuvants of immune response using the *Agaricus blazei* in the development of vaccines against visceral leishmaniasis", under the supervision of EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 04/06/2013. This certificates expires in 04/06/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 04/06/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

1 Apêndice – Artigo científico em processo de preparação para submissão

2
3 **Antileishmanial activity and possible action mechanism of Strychnobiflavone flavonoid**
4 **derived from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum***

5
6 Paula S. Lage¹, Miguel A. Chávez-Fumagalli¹, Juliana T. Mesquita², Laís M. Mata³, Simone O.A.
7 Fernandes³, Valbert N. Cardoso³, Manuel Soto⁴, Carlos A.P. Tavares⁵, João P.V. Leite⁶, André G.
8 Tempone², Eduardo A.F. Coelho^{1,7,*}

9
10 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade
11 de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

12 ² Laboratório de Toxinologia Aplicada a Fármacos Antiparasitários, Instituto Adolfo Lutz, São
13 Paulo, Brazil.

14 ³ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal
15 de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

16 ⁴ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Departamento de Biología Molecular,
17 Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, Spain.

18 ⁵ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal
19 de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

20 ⁶ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,
21 Minas Gerais, Brasil.

22 ⁷ Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
23 Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

24
25
26 ***Corresponding author**

27 **Address:** Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo de
28 Doenças Parasitárias. Departamento de Patologia Clínica. Coltec. Universidade Federal de Minas
29 Gerais. Avenida Antônio Carlos, 6627, 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

30 Phone and fax number: +55 31 3409 4983. *E-mail:* eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

31
32
33
34
35
36

37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71

Abstract

Leishmaniasis is one of the most important parasitic infectious diseases in the world. The present study aims to investigate the *in vitro* antileishmanial activity of strychnobiflavone in *Leishmania infantum*, as well as its possible action mechanism on the parasites, and its *in vivo* biodistribution profile in BALB/c mice. The antileishmanial activity of the strychnobiflavone against stationary promastigotes of *L. infantum* presented a IC_{50} value of 5.4 μ M, and a cytotoxicity value on murine macrophages (CC_{50}) of 125 μ M. Macrophages that were infected and later treated with the aforementioned product presented reductions of 52% in the parasite burden, after treatment. The strychnobiflavone altered the cellular metabolism of *L. infantum* promastigotes, by despolarising the parasites' mitochondrial membrane potential. In addition, using SYTOX[®] Green as a fluorescent probe, the strychnobiflavone demonstrated no interference in plasma membrane permeability, and this compound was not able to induce the reactive oxygen species production on the parasites. To *in vivo* biodistribution studies and scintigraphic images, the flavonoid was radiolabeled with technetium-99m, and injected in mice. The ^{99m}Tc-strychnobiflavone compound showed a high uptake by liver of the animals during all time investigated. In conclusion, our study demonstrates, for the first time, the antileishmanial activity of strychnobiflavone against *L. infantum*, and suggests that the possible action mechanism of this flavonoid could be associated with the parasites' mitochondrial membrane potential alterations. The higher presence of this compound in the liver of the evaluated animals may well leads to use of this flavonoid in future studies in the treatment of VL.

Keywords: *Leishmania spp.*, strychnobiflavone, antileishmanial activity, mitochondrial membrane potential, biodistribution; scintigraphic images.

72

73 **INTRODUCTION**

74

75 Leishmaniasis is considered one of the six major infectious diseases in the world, with a
76 high incidence and ability to produce deformities and cause death. The disease affects about 12
77 million people in 98 countries and territories in the world [1,2]. Visceral leishmaniasis (VL) caused
78 by *Leishmania donovani* and *L. infantum/L. chagasi* represents an important disease, leading to
79 nearly 500,000 new cases and 50,000 deaths annually [3].

80 The parenteral administration of pentavalent antimony compounds continues to be the first
81 choice to treat leishmaniasis; however, the occurrence of side effects, such as anorexy, myalgias,
82 arthralgias, chemical pancreatitis, leucopenia, and cardiotoxicity; are main problems reported by
83 patients [4,5]. Amphotericin B, a second line drug, is a highly hydrophobic antifungal product and
84 presents an effective antileishmanial activity; however, its clinical use is also limited by high
85 toxicity [6]. To improve the therapeutic index of AmpB and to reduce its cytotoxicity, lipid-based
86 formulations have been developed for parenteral administration, such as AmpBisome[®],
87 AmphocilH[®] and Abelcet[®]. The World Health Organization has recommended the use of liposomal
88 AmpB (L-AmpB) based on its high efficacy and safety [1,7]. Despite improvements in therapeutic
89 indexes for these lipid formulations, their use still remain limited due mainly to their high cost [8].
90 In addition, leishmaniasis has emerged as an opportunistic infection in human immunodeficiency
91 virus-infected (HIV) patients [9,10,11]. Therefore, the development of new strategies to treat
92 leishmaniasis has become a priority.

93 In recent years, considerable attention has been given to secondary compounds purified from
94 plants, in an attempt to search for new antileishmanial products [12,13,14]. The *Strychnos* genus
95 includes approximately 200 plant species, many of which are known for their potential medicinal
96 secondary metabolites [15,16]. *Strychnos pseudoquina* St. Hil. is a native cinchona-like tree of the
97 Brazilian Savanna, popularly known as “quina”, and used in the folk medicine to treat hepatic and
98 stomach diseases [17], and malaria [18]. Recently, a study performed using an ethyl acetate extract
99 derived from *S. pseudoquina* stem bark isolated two flavonoids, quercetin 3-O-methyl ether and
100 strychnobiflavone (SPEA-2); which presented an effective antileishmanial activity against
101 *Leishmania amazonensis* species [19].

102 In this study, it was showed that both flavonoids presented an effective activity against *in*
103 *vitro* promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*, as well as a low toxicity in murine
104 macrophages, and a null hemolytic activity in human red blood cells. Also, the strychnobiflavone
105 flavonoid proved to be effective in inhibiting the infection of macrophages by parasites that had
106 been pre-incubated with it, as well as in reducing the parasite burden in infected previously

107 macrophages, and that were later treated with the isolated product [19]. In the present study, the
108 antileishmanial activity of the strychnobiflavone was evaluated against *L. infantum*, and the possible
109 action mechanism of this flavonoid in this parasite species was also evaluated. Objectiving future *in*
110 *vivo* studies employing this flavonoid in treat leishmaniasis, an *in vivo* biodistribution study of
111 strychnobiflavone was also performed in BALB/c mice.

112

113 **MATERIALS AND METHODS**

114

115 **Parasite and mice**

116 *Leishmania infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) was used in this study. Parasites were
117 grown at 24°C in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 20% heat-
118 inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100
119 µg/mL streptomycin, at pH 7.4. Stationary-phase promastigotes of parasites were prepared as
120 described [20]. Murine peritoneal macrophages were obtained from female BALB/c mice (8 weeks
121 old), which were purchased from Institute of Biological Sciences of UFMG. Experiments were
122 performed in compliance with the National Guidelines of the Institutional Animal Care and Use
123 Committee for the Ethical Handling of Research Animals (CEUA) from the Federal University of
124 Minas Gerais (UFMG), which approved this study under protocol number 136/2012.

125

126 **Antileishmanial activity against *L. infantum***

127 The inhibition of *Leishmania spp.* growth was assessed by *in vitro* cultivating stationary-
128 phase promastigotes of *L. infantum* (1×10^6 cells) in the presence of strychnobiflavone flavonoid
129 (0.4 to 15.9 µM), in 96-well culture plates (Nunc, Nunclon, Roskilde, Denmark) for 48 h at 24°C.
130 A previous titration curve was performed to determine the best time of inhibition of *L. infantum*
131 growth incubating the evaluated products (data not shown), and the used concentrations of the
132 flavonoid were derived from Lage et al. [19]. Cell viability was assessed by measuring the cleavage
133 of 5mg/mL of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma).
134 Absorbances were measured by using a multiwell scanning spectrophotometer (LABTRADE model
135 660) at a wavelength of 570 nm. Amphotericin B (1 µM) was used as a positive control. The
136 concentration of the products needed to inhibit 50% of the *Leishmania* viability (IC₅₀) was
137 determined by applying the sigmoidal regression of the concentration-response curves, using
138 different concentrations of the compounds. Data shown are representative of three independent
139 experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

140

141

142

143 Cytotoxicity assay

144 The inhibition of 50% of the macrophage viability (CC_{50}) was calculated by cultivating
145 macrophages (5×10^5 cells) with strychnobiflavone (0.4 to 15.9 μM), in 96- well plates for 48 h at
146 37°C. Also, a previous titration curve was performed to determine the best time of inhibition of
147 macrophages viability incubating the evaluated products (data not shown). Cell viability was
148 assessed by the MTT assay, and amphotericin B was used as control. The selectivity index (SI) was
149 calculated by determining the ratio between CC_{50} and IC_{50} . Data shown are representative of three
150 independent experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

151

152 Treatment of infected macrophages

153 Murine macrophages (5×10^5 cells) were plated on round glass coverslips inside the wells
154 of a 24-well culture plate (Nunc) in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS, 2 mM L-
155 glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, at pH 7.4. After 24 h of incubation at
156 37°C in 5% CO_2 ; stationary-phase promastigotes of *L. infantum* were added to the wells (5×10^6),
157 and the cultures were incubated for 24 h at 37°C, 5% CO_2 . Next, free parasites were removed by
158 extensive washing with RPMI 1640 medium, and infected macrophages were treated for 48 h with
159 strychnobiflavone (40, 80 and 160 μM), for 48 h at 24°C, 5% CO_2 . Cells were washed in RPMI
160 1640 and incubated with 4% paraformaldehyde for 15 min, at which time they were treated with
161 70% ethanol in an ice-bath for 4 h and again washed three times with sterile PBS. Amphotericin B
162 (1 $\mu\text{g/mL}$) was used as a positive control. The percentage of the inhibition of *Leishmania* intra-
163 macrophage viability was determined by counting 200 cells, in triplicate. Data shown are
164 representative of three independent experiments, performed in triplicate, which presented similar
165 results.

166

167 Evaluation of the reactive oxygen species (ROS) production

168 Stationary promastigotes of *L. infantum* (2×10^6 cells per well) were washed in HBSS
169 (Hanks' Balanced Salt solution, Sigma-Aldrich) medium, and incubated with strychnobiflavone
170 using its IC_{99} value (5.4 μM) for 60 min. $\text{H}_2\text{DF-DA}$ (5 μM) was added, and the cells were incubated
171 for 15 min at 24°C. The fluorescence intensity was detected using a fluorimetric microplate reader
172 (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader-Molecular Devices), at 488 and 525 nm for
173 excitation and emission, respectively. Sodium azide (10 mM) was used as positive control [21].

174

175 Evaluation of cellular membrane permeability

176 Late log-phase promastigotes of *L. infantum* (2×10^6 cells per well) were washed in PBS
 177 and incubated with 1 μ M SYTOX[®] Green, for 15 min at 24°C [23]. Strychnobiflavone was added
 178 using its IC₉₉ value and the fluorescence intensity was measured every 20 min, in a total of 120 min.
 179 The maximum permeabilization was obtained with 0.1% Triton X-100. Fluorescence intensity was
 180 determined using a fluorimetric microplate reader (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader-
 181 Molecular Devices), with excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively.

182

183 **Activity on mitochondrial membrane potential**

184 Stationary-phase promastigotes of *L. infantum* (2×10^6 cells per well) were washed twice in
 185 HBSS medium, seeded and incubated with strychnobiflavone at a concentration of its IC₉₉, for 60
 186 min and 120 min. Rhodamine 123 (0.3 μ g/mL) was added, and the cells were incubated for 10 min,
 187 in the dark. The cells were washed twice in HBSS, and the fluorescence intensity was measured
 188 using a fluorimetric microplate reader (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader-Molecular
 189 Devices), with excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively.

190

191 **Strychnobiflavone radiolabeling and radiochemical purity**

192 For strychnobiflavone radiolabeling, the flavonoid was dissolved in a solution composed by
 193 ethanol plus SnCl₂.2H₂O, which was prepared in 0.25 N HCl. A solution composed of 500 μ L
 194 strychnobiflavone (1 mg/mL), 20 μ L SnCl₂.2H₂O (1 mg/mL), and 200 μ L phosphate buffer solution
 195 (PBS) pH 7.6 was mixed in a 10 mL glass vial, and 100 μ L sodium ^{99m}Tc-pertechnetate solution
 196 (Na^{99m}TcO₄⁻ /63 MBq) (IPEN/CNEN/Brazil) was added. The mixture was kept at room temperature
 197 for 30 min. After, it was incubated for 15 min with 200 mg of silica and then the mixture was
 198 centrifugated. The supernatant was removed and the radiochemical purity (RP) of ^{99m}Tc-
 199 strychnobiflavone was determined by thin-layer chromatography on silica strips (TLC-SG, Merck,
 200 Darmstadt, Germany). Acetone was used to quantify the hydrolysed technetium (^{99m}TcO₂), and
 201 0,9% NaCl saline solution was used to determine the amount of free technetium (^{99m}TcO₄⁻). The
 202 ^{99m}Tc-strychnobiflavone usually did not move on silica strips when saline is used, while the
 203 radiolabeled compound migrated to the top of the strip using acetone as solvent. Radioactivity was
 204 measured using a gamma counter (Wallac 1470 Wizard Gamma Counter, Perkin Elmer, Turku,
 205 Finland). The RP was determined from the following equation:

206

207

208

209

210

$$\% \text{ RP} = \frac{\text{cpm of } ^{99\text{m}}\text{Tc-strychnobiflavone}}{\sum \text{cpm } (^{99\text{m}}\text{TcO}_2 + ^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + ^{99\text{m}}\text{Tc-strychnobiflavone})} \times 100$$

where: cpm = counts per minute

211

212

213

214 *Ex vivo* biodistribution studies

215 For the *ex vivo* biodistribution studies, BALB/c mice (n=3 per group) were used. For this,
216 aliquots containing 3,2 MBq of ^{99m}Tc-strychnobiflavone were administered into the tail vein in the
217 animals. At 1, 3, 6 and 24 hours after, the animals were anesthetised with a solution combining
218 ketamine (80 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg), and they were euthanized. Blood samples, heart,
219 lungs, spleen, liver, stomach and kidneys were harvested for analysis. Each organ or tissue was
220 weighed, and the radioactivity was determined using an automatic gamma counter (Wizard,
221 Finland). An aliquot of ^{99m}Tc-strychnobiflavone containing the same injected dose was counted
222 simultaneously in a separate tube, which was defined as 100% radioactivity. The results were
223 expressed as the percentage of the injected dose per gram of tissue (% ID/g), according to the
224 following equation:

$$\% \text{ ID/g} = \frac{\text{cpm/g (tissue)}}{\text{standard dose}} \times 100$$

225

226 Scintigraphic images

227 For scintigraphic images, BALB/c mice (n=3 per group) were used. Aliquots containing 3,2
228 MBq of ^{99m}Tc-strychnobiflavone were administered into the tail vein in the animals. At 1, 3, 6 and
229 24 hours after administration, mice were anesthetized with a solution combining ketamine (80
230 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg), and they were placed in a supine position under a gamma camera
231 (Mediso, Budapest, Hungary), using a low-energy high-resolution collimator. Images were acquired
232 with a 256×256×16 matrix size, with 20% energy window set at 140 keV, for a period of 10 min
233 [23].

234

235 Statistical analysis

236 The results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) and analyzed using GraphPad
237 Prism™ (version 6.0 for Windows). The IC₅₀, IC₉₉ and CC₅₀ values were calculated from the mean
238 percentage reduction of the promastigotes and macrophages, respectively; compared to that in the
239 non-treated controls. The curves were determined by applying sigmoidal regression to the logarithm
240 concentration/response data. In the assays where the mitochondrial function was evaluated, the
241 differences among the groups were statistically evaluated by the two-tailed unpaired Student's *t*-
242 test. In the biodistribution assays, one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test was used to
243 compare differences between different time points and in each organ. The data showed are

244 representative of three different experiments, performed in triplicate, which presented similar
245 results. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

246 RESULTS

247

248 Antileishmanial activity, cytotoxicity and treatment of infected macrophages

249 The inhibition of *L. infantum* viability using the strychnobiflavone (SPEA-2) was evaluated
250 against stationary-phase promastigotes of the parasites. It could be observed that this flavonoid was
251 effective against parasites, presenting an IC_{50} value of $5.4 \mu M$ (Table 1). When the cytotoxicity of
252 the strychnobiflavone was evaluated in murine macrophages, the *in vitro* assay demonstrated a very
253 low toxicity in the cells, after incubation with this product. The values of CC_{50} were of $125 \mu M$, and
254 the calculated selectivity index (SI) was determined as of 23,1 (Table 1). Amphotericin B was used
255 as a control and it presented a SI of 9.9. In order to assess the capacity of the strychnobiflavone in
256 treating macrophages previously infected with *L. infantum*, cells were pre-infected with stationary
257 promastigotes of the parasites (in a ratio of 10 parasites per 1 macrophage) and later treated with 40,
258 80, or $160 \mu M$ of strychnobiflavone, for 48h at $24^{\circ}C$ and 5% CO_2 . The results showed that
259 macrophages that were infected and later treated with strychnobiflavone presented reductions in the
260 parasite number in the order of 52% of the infection degree (Table 2).

261

262 Reactive oxygen species (ROS) production and evaluation of promastigotes' membrane 263 permeability

264 Strychnobiflavone was incubated with promastigotes of *L. infantum* for 60 min, when the
265 ROS production was evaluated by H_2DF-DA fluorescent probe. Strychnobiflavone was not able to
266 induce the ROS production (Fig. 1A). On the other hand, Triton-X, used as a control, proved to be
267 effective in induce the ROS production in the parasites. Alterations in the permeability of cellular
268 membrane in *L. infantum* promastigotes was also evaluated, and the results shoewd also that
269 strychnobiflavone did not able to induce changes in their morphology. On the contrary, azide was
270 used as internal control and resulted in lack of alteration (Fig. 1B). After, the mitochondrial
271 membrane potencial of the promastigotes was evaluated using the fluorescent probe Rhodamine
272 123. Promastigotes were incubated with strychnobiflavone for 60 min, and the results showed that
273 the flavonoid induced a increase of 42% in the fluorescence intensity, when compared to the non-
274 treated promastigotes, and this fact was responsible to promoted a hyperpolarization (Fig. 1C).

275

276 *Ex vivo* biodistribution studies and scintigraphic images

277 The ^{99m}Tc -strychnobiflavone radiochemical purity was of $90,2\% \pm 0.96\%$, thus allowing
278 perform the *in vivo* biodistribution assays. In the results, the ^{99m}Tc -strychnobiflavone *ex vivo*

279 biodistribution studies showed a high uptake of the flavonoid in the liver of the animals. Moderate
280 levels of radioactivity were observed in the kidneys, spleen and intestine, up to 6 h (Figure 2A).
281 This evaluation could also be observed in the scintigraphic images, demonstrating a high uptake of
282 ^{99m}Tc -strychnobiflavone by liver of the evaluated animals. Furthermore, the results showed also a
283 decrease of the radioactivity in the abdominal region of the animals, after 24 h of administration
284 (Figure 2B). On the other hand, the radioactivity levels in such organs, such as spleen and kidneys;
285 was not enough to generation the images.

286

287 **DISCUSSION**

288

289 Some natural compounds, such as flavonoids, have shown activity against *Leishmania*
290 amastigotes in infected macrophages [24]. The plant *Kalanchoe pinata*, which contains quercetin,
291 quercetrin and other flavonoids, shows an effective activity against cutaneous [25] and visceral
292 leishmaniasis [26]. We have previously reported that strychnobiflavone flavonoid was effective
293 against *L. amazonensis*, and proved to be active in inhibiting the infection of phagocytic cells, as
294 well as in reducing the parasite burden in infected previously macrophages. In addition, this product
295 proved to present a low toxicity in murine macrophages, as well as a null hemolytic activity in
296 human red blood cells [19]. Hence, this flavonoid was evaluated against *L. infantum*, and its
297 possible action mechanism of and *in vivo* biodistribution assays was also performed.

298 Results showed that strychnobiflavone presented an IC_{50} value of 5.4 μM in *L. infantum*
299 promastigotes, and a CC_{50} value of 125 μM in murine peritoneal macrophages. The SI was
300 calculated to ratio between CC_{50} and IC_{50} , presenting a value of 23.1; indicating a satisfactory
301 activity of this substance. Previous reports have shown that quercetin flavonoid, which presents a
302 similar chemical structure to strychnobiflavone, has a wide range of reported biological effects,
303 such as antioxidant, anti-hypertensive, anti-inflammatory, antimicrobial and antiprotozoan activities
304 [27,28,29].

305 Studying the action mechanism of drugs in parasites could provide important information
306 about the development of new compounds. Mitochondria are essential cellular organelles that play a
307 central role in energy metabolism, and are considered critical for the survival of any cell. During
308 oxidative phosphorylation, electrons are moved thorough the mitochondrial respiratory chain, and a
309 proton gradient is established across the inner mitochondrial membrane as the energy source for
310 ATP production. Several studies have demonstrated changes in the mitochondria profile of
311 *Leishmania* species previously treated with antileishmanial agents [30, 31, 32,33]. These studies
312 reported that significant alterations in the mitochondria led to the loss of cell viability, and
313 confirmed the importance of this organelle in the parasites' viability [29]. To elucidate the possible

314 action mechanism induced by strychnobiflavone in *L. infantum*, we chose to measure the
315 mitochondrial potential due to the fact that previous studies have shown that the single
316 mitochondria of the kinetoplastid parasites could be considered like a good indicator of cellular
317 dysfunction [34, 35,36].

318 To investigate the membrane permeability of strychnobiflavone in pre-treated *L. infantum*, a
319 assay using SYTOX[®] green was performed. Our data demonstrated that strychnobiflavone did not
320 alter permeability of *L. infantum* plasma membrane, 60 min after the incubation. The reactive
321 oxygen species are generated in infected cells against pathogens infection. ROS can also be
322 generated in response to some drugs, and the same principle works for certain antiprotozoan drugs
323 in killing parasites in infected cells. This property to generate ROS to leads to the destruction of
324 cellular macromolecular components is important because this action can be modulated to derive a
325 maximal effect [29]. So, to evaluate the ROS production in *L. infantum* previously treated with
326 strychnobiflavone, the cell-permeant H₂DFCF-DA was used as a probe. H₂DFCF-DA is a
327 chemically reduced form of fluorescein, which is used as an ROS production indicator in cells. Our
328 data demonstrated that strychnobiflavone was not able to promote production of ROS in *L.*
329 *infantum*.

330 The maintenance of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) is vital for the metabolic
331 process, as well as for cellular survival [35, 37]. Studies have showed that variations in $\Delta\Psi_m$
332 induced by drugs are associated with survival in *Trypanosoma cruzi* [36,38], *L. donovani* [35] and
333 *L. amazonensis* [32]. Evaluation of mitochondrial membrane potential was performed using
334 fluorescent Rhodamine 123. The mitochondrial damage was confirmed by an increase in the
335 rhodamine 123 fluorescence, indicating hyperpolarization and, consequently, an alteration of $\Delta\Psi_m$.
336 This could decrease the ATP synthesis and results in the parasites' death. Prior study showed that
337 the Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) flavonoid promote alteration of the $\Delta\Psi_m$ in *L. amazonensis*,
338 suggesting that EGCG exerts its antileishmanial effect on *L. amazonensis* promastigotes by
339 affecting the parasites' mitochondrial function [39]. Therefore, we suggest that strychnobiflavone
340 could be exerting its antileishmanial activity on *L. infantum* by affecting the parasite mitochondrial
341 function.

342 The *ex vivo* biodistribution studies and scintigraphic images observed in the present study
343 showed a high radioactivity uptake of ^{99m}Tc-strychnobiflavone by liver of the animals, during all
344 time investigated (24 h). This result corroborate to further application of this compound as an
345 antileishmanial agent, once the liver is considered one of the targets of the *Leishmania spp.*
346 Parasites in the infected hosts. Therefore, this flavonoid presents a high potential to be used in
347 future *in vivo* studies aiming in treat the *L. infantum* infection.

348 In conclusion, our study demonstrates, for the first time, the antileishmanial activity of
 349 strychnobiflavone against *L. infantum*, and suggests that the possible action mechanism of this
 350 flavonoid could be associated with the parasites' mitochondrial membrane potential alterations.
 351 Also, the higher presence of this compound in the liver, one of target organs of the viscerotropic
 352 parasites, could leads to use this flavonoid in future studies in the treatment of VL.

353

354 ACKNOWLEDGMENTS

355

356 This work was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa from UFMG (Edital
 357 07/2012), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica, Fundação de
 358 Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; CBB-APQ-02364-08 and CBB-APQ-
 359 00496-11), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; APQ-
 360 472090/2011-9), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas (INCT-V). EAFC
 361 and APF are grant recipient of CNPq. MACF is a grant recipient of FAPEMIG/CAPES. This study
 362 was also, in part, supported in Spain by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación
 363 FIS/PI1100095.

364

365 References

366

- 367 [1] World Health Organization (2010) Control of the leishmaniasis, World Health Organization
 368 Technical Report Series 949.
- 369 [2] Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., de Boer, M.,
 370 Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence PLoS One 7 (2012) e35671.
- 371 [3] Minodier P, Parola P, Cutaneous leishmaniasis treatment, Travel Medicine and Infectious
 372 Disease 5 (2010) 150-158.
- 373 [4] Grevelink SA, Lerner EA, Leishmaniasis, Journal of the American Academy of Dermatology 34
 374 (1996) 257-272.
- 375 [5] Croft SL, Coombs GH, Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search
 376 for novel drugs, Trends Parasitology 19 (2003) 502-508.
- 377 [6] Annaloro C, Olivares C, Usardi P, Onida F, Della Volpe A, Tagliaferri E, Deliliers GL,
 378 Retrospective evaluation of amphotericin B deoxycholate toxicity in a single centre series of
 379 haematopoietic stem cell transplantation recipients, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 63
 380 (2009) 625-626.
- 381 [7] Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M, Davidson RN, Figueras C,
 382 Gradoni L, Kafetzis DA, Ritmeijer K, Rosenthal E, Royce C, Russo R, Sundar S, Alvar J,
 383 Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis, Clinical Infectious
 384 Diseases 43(2006) 917-924.
- 385 [8] Egger SS, Meier S, Leu C, Christen S, Gratwohl A, Krähenbühl S, Haschke M, Drug
 386 interactions and adverse events associated with antimycotic drugs used for invasive
 387 aspergillosis in hematopoietic SCT, Bone Marrow Transplantation 45(2009) 1197-1203.
- 388 [9] Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina,
 389 R., Moreno, J., *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years,
 390 Clinical Microbiology Reviews 10 (1997) 298-319.

- 391 [10] Cota, G.F., de Sousa, M.R., de Mendonça, A.L.P., Patrocínio, A., Assunção, L.S., de Faria,
392 S.R., Rabello, A., *Leishmania*-HIV Co-infection: Clinical Presentation and Outcomes in an
393 Urban Area in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) 2–8.
- 394 [11] Singh, S., Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of
395 *Leishmania*-HIV co-infection in India. *International Journal of Infectious Diseases* 29, (2015)
396 103–112.
- 397 [12] Tiunan T, Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from
398 *Tanacetum parthenium*, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (2005) 176–182.
- 399 [13] Khaliq T., Misra P., Gupta S., Reddy K. P., Kant R., Maulik P. R., Dube A., Nerender T.
400 Peganoine hydrochloride dihydrate an orally active antileishmanial agent, *Bioorganic &*
401 *medical chemistry letters* 19 (2009) 2585–2586.
- 402 [14] Vendrametto M. C., Santos A. O., Nakamura C. V., Dias-Filho B. P. , Cortez D. A. , Ueda-
403 Nakamura T., Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated
404 from leaves of *Piper regnellii* var. *pallidum*. *Parasitology international* 59 (2010) 154–158.
- 405 [15] Thongphasuk P., Suttisri R., Bavovada R., Verpoorte R., Alkaloids and a pimarane diterpenoid
406 from *Strychnos vanprukii*, *Phytochemistry* 64 (2003) 897-901.
- 407 [16] Philippe G., Angenot L., Tits M., Frédérick M. About the toxicity of some *Strychnos* species
408 and their alkaloids. *Toxicon: official journal of the international society on Toxinology*, 44
409 (2004) 405-416.
- 410 [17] Corrêa P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Cultivadas Exóticas*, 1952.
- 411 [18] Andrade-Neto V. F., Brandão M. G. , Stehmann J. R., Oliveira L. A. , Krettli A. U. ,
412 Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *Journal*
413 *of ethnopharmacology* 87 (2003) 253–256.
- 414 [19] Lage P.S., Andrade P.H., Lopes A.S., Chávez-Fumagalli M.A., Valadares D.G., Duarte M.C.,
415 Lage D.P., Costa L.E., Martins V.T., Ribeiro T.G., Filho J.D., Tavares C.A., Pádua R.M., Leite
416 J.P., Coelho E.A., *Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective *in*
417 *vitro* antileishmanial activity, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
418 (2013), 304354.
- 419 [20] Coelho E.A., Tavares C.A., Carvalho F.A., Chaves K.F., Teixeira K.N., Rodrigues R.C.,
420 Charest H., Matlashewski G., Gazzinelli R.T., Fernandes A.P., Immune responses induced by
421 the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are
422 protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection, *Infection and*
423 *Immunity* 71(2003) 3988-94.
- 424 [21] Coimbra E.S., Gonçalves-da-Costa S.C., Corte-Real S., De Freitas F.G., Durão A.C., Souza
425 C.S., Silva-Santos M.I., Vasconcelos E.G., Characterization and cytochemical localization of
426 an ATP diphosphohydrolase from *Leishmania amazonensis* promastigotes, *Parasitology* 124
427 (2002) 137-43.
- 428 [22] Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D, Simmaco M, Rivas L., Temporins, small
429 antimicrobial peptides with leishmanicidal activity, *The Journal of Biological Chemistry* 14
430 (2005) 984-90.
- 431 [23] Diniz S.O., Rezende C.M., Serakides R., Ferreira R.L., Ribeiro T.G., Martin-Comin J.,
432 Cardoso V.N., Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in an
433 experimental model of acute osteomyelitis in rats, *Nuclear Medicine Communications*
434 29(2008) 830-6.
- 435 [24] Muzitano M.F., Cruz E.A., de Almeida A.P., Da Silva S.A., Kaiser C.R., Guette C., Rossi-
436 Bergmann B., Costa S.S., Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe*
437 *pinnata*, *Planta Medica* 72 (2006) 81-3.
- 438 [25] Muzitano M.F., Falcão C.A., Cruz E.A., Bergonzi M.C., Bilia A.R., Vincieri F.F., Rossi-
439 Bergmann B., Costa S.S., Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a
440 murine model of cutaneous leishmaniasis, *Planta Medica* 75(2009) 307-11.

- 441 [26] Gomes D.C., Muzitano M.F., Costa S.S., Rossi-Bergmann B., Effectiveness of the
442 immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis,
443 Parasitology 137 (2010) 613-8.
- 444 [27] Mamani-Matsuda M., Rambert J., Malvy D., Lejoly-Boisseau H., Daulouède S., Thiolat D.,
445 Coves S., Courtois P., Vincendeau P., Mossalayi M.D., Quercetin induces apoptosis of
446 *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human
447 macrophages, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48 (2004) 924-9.
- 448 [28] Bischoff S.C., Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease, Current Opinion
449 in Clinical Nutrition & Metabolic Care 11(2008) 733-40.
- 450 [29] Fonseca-Silva F., Inacio J.D., Canto-Cavalheiro M.M., Almeida-Amaral E.E., Reactive oxygen
451 species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in
452 *Leishmania amazonensis*, PLoS One 8 (2011) e14666.
- 453 [30] Santa-Rita R.M., Henriques-Pons A., Barbosa H.S., de Castro S.L., Effect of the
454 lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania*
455 *amazonensis*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54 (2004) 704-10.
- 456 [31] Ueda-Nakamura T., Mendonça-Filho R.R., Morgado-Díaz J.A., Korehisa Maza P., Prado Dias
457 Filho B., Aparício Garcia Cortez D., Alviano D.S., Rosa Mdo S., Lopes A.H., Alviano C.S.,
458 Nakamura C.V., Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum*
459 *gratissimum*, Parasitology International 55(2006):99-105.
- 460 [32] Rodrigues J.C., Bernardes C.F., Visbal G., Urbina J.A., Vercesi A.E., de Souza W., Sterol
461 methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania*
462 *amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition, Protist - Journal 158 (2007)
463 447-56.
- 464 [33] Santos, D.O., Coutinho, C.E.R., Madeira, M.F., Bottino, C.G., Vieira, R.T., Nascimento, S.B.,
465 Bernardino, A., Bourguignon, S.C., Corte-Real, S., Pinho, R.T., Rodrigues, C.R., Castro, H.C.,
466 Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review, Parasitology Research 103
467 (2008) 1-10.
- 468 [34] Luque-Ortega J.R., Rivero-Lezcano O.M., Croft S.L., Rivas L., *In vivo* monitoring of
469 intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen
470 drugs targeting bioenergetic metabolism, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45 (2001)
471 1121-5.
- 472 [35] Mehta A., Shaha C., Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron,
473 reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione, Free Radical Biology & Medicine 40 (2006)
474 1857-68.
- 475 [36] Menna-Barreto R.F., Goncalves R.L., Costa E.M., Silva R.S., Pinto A.V., Oliveira M.F., de
476 Castro S.L., The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are
477 mediated by mitochondrial dysfunction, Free Radical Biology & Medicine 47 (2009) 644-53.
- 478 [37] De Souza W., Attias M., Rodrigues J.C., Particularities of mitochondrial structure in parasitic
479 protists (Apicomplexa and Kinetoplastida), The International Journal of Biochemistry & Cell
480 Biology 41(2009) 2069-80.
- 481 [38] Mukherjee P., Majee S.B., Ghosh S., Hazra B., Apoptosis-like death in *Leishmania donovani*
482 promastigotes induced by diospyrin and its ethanalamine derivative, International Journal of
483 Antimicrobial Agents 34 (2009) 596-601.
- 484 [39] Inacio J.D., Canto-Cavalheiro M.M., Menna-Barreto R.F., Almeida-Amaral E.E.,
485 Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania*
486 *amazonensis*, Experimental Parasitology 132 (2012) 151-5.
- 487
488
489
490
491
492

493 **FIGURE LEGENDS**

494

495

496 **FIGURE 1.** (A) Permeability of *L. infantum* plasma membrane incubated with Strychnobiflavone
 497 and assessed with the vital dye SYTOX® Green. Promastigotes were treated with the Triton X-100
 498 for 100% permeabilization. A control group (untreated) was also included. (B) Production of
 499 reactive oxygen species (ROS) in *L. infantum* promastigotes incubated with Strychnobiflavone. A
 500 fluorescent probe (H₂Dcf-DA), was incubated with the cells. Sodium Azide was used as positive
 501 control. A control group (untreated) was also included. (C) Evaluation of the mitochondrial
 502 membrane potencial of *L. infantum* incubated strychnobiflavone. Rhodamina 123 was incubated
 503 with treated and untreated parasites (control group).

504

505

506 **FIGURE 2.** *In vivo* biodistribution profile of ^{99m}Tc-Strychnobiflavone.

507 Notes: (A) Biodistribution profile of ^{99m}Tc-Strychnobiflavone in the tissues and organs at the
 508 different periods of time (1, 3, 6 and 24 hours). (B) Scintigraphic images obtained after intravenous
 509 administration of radiolabeled Strychnobiflavone at different periods of time (1, 3, 6 and 24 hours).

510 Abbreviation: % ID/g, percentage of the injected dose per gram of tissue;

511

512

513 **TABLE 1.** Antileishmanial activity, cytotoxicity, and selective index found for the
 514 strychnobiflavone. The results are expressed as medium ± standard deviation. ^aValue of inhibitory
 515 concentration of 50% of promastigotes of *L.(L.) infantum*. ^bValue of inhibitory concentration of 50% of
 516 murine macrophages. ^cSelectivity Index (ratio between CC50 and IC50). AmpB (amphotericin B) was used
 517 as a control drug. Values are the average of three independent experiments, which presented similar results.

518

519 **TABLE 2.** Activity of strychnobiflavone on *L. infantum* infection in macrophages. ^aThe percentage
 520 of infected macrophages and the number of amastigotes per cell were determined by counting 200 cell per
 521 coverslips, performed in triplicate. Values are representative from four independent experiments, which
 522 presented similar results.

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546
547
548
549
550

Table 1.

Compounds (μM)	$\text{IC}_{50}^{\text{a}}$	$\text{CC}_{50}^{\text{b}}$	SI^{c}
Strychnobiflavone	5.4 ± 0.9	125 ± 4.5	23.1
AmpB	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2	9.9

551
552
553
554

555
556

Table 2.

Compound (μM)	Concentration	Percentage of infected macrophages after treatment/number of amastigotes per cell ^a
Strychnobiflavone	160.0	32.2/2.1
	80.0	47.8/3.2
	40.0	59.0/4.0
	0	65.0/7.3

557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575

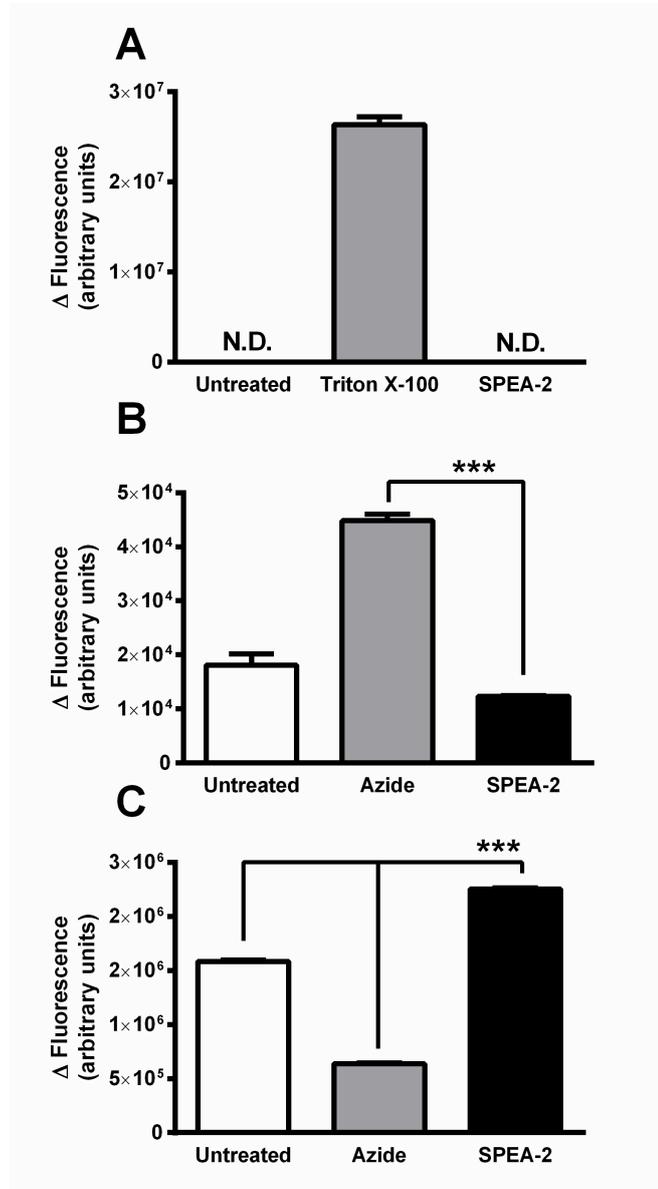
576

577

578

579

Figure 1.



580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

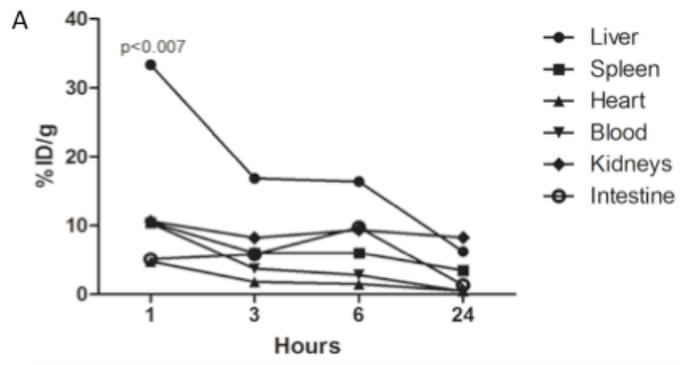
590

591

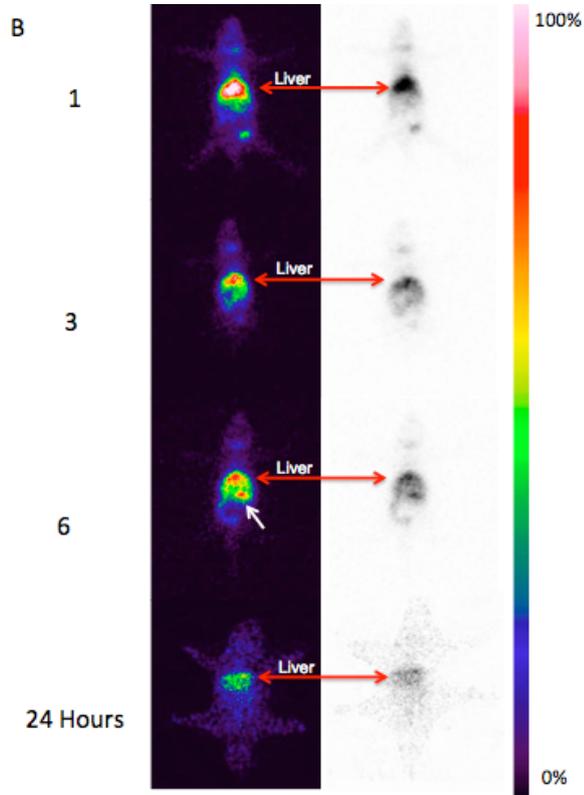
592

Figure 2.

593



594



Research Article

***Strychnos pseudoquina* and Its Purified Compounds Present an Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity**

Paula Sousa Lage,¹ Pedro Henrique Rocha de Andrade,² Amanda de Santana Lopes,³ Miguel Angel Chávez Fumagalli,¹ Diogo Garcia Valadares,⁴ Mariana Costa Duarte,¹ Daniela Pagliara Lage,² Lourena Emanuele Costa,¹ Vivian Tamietti Martins,⁴ Tatiana Gomes Ribeiro,⁵ José Dias de Souza Filho,⁶ Carlos Alberto Pereira Tavares,⁴ Rodrigo Maia de Pádua,⁷ João Paulo Viana Leite,³ and Eduardo Antonio Ferraz Coelho^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil

² Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36.570-000, Brazil

⁴ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil

⁶ Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil

⁷ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31.270-901, Brazil

Correspondence should be addressed to Eduardo Antonio Ferraz Coelho; eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

Received 3 May 2013; Accepted 28 August 2013

Academic Editor: Virginia S. Martino

Copyright © 2013 Paula Sousa Lage et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The development of new and cost-effective alternative therapeutic strategies to treat leishmaniasis has become a high priority. In the present study, the antileishmanial activity of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. was investigated and pure compounds that presented this biological effect were isolated. An ethyl acetate extract was prepared, and it proved to be effective against *Leishmania amazonensis*. A bioactivity-guided fractionation was performed, and two flavonoids were identified, quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone, which presented an effective antileishmanial activity against *L. amazonensis*, and studies were extended to establish their minimum inhibitory concentrations (IC₅₀), their leishmanicidal effects on the intra-macrophage *Leishmania* stage, as well as their cytotoxic effects on murine macrophages (CC₅₀), and in O₊ human red blood cells. The data presented in this study showed the potential of an ethyl acetate extract of *S. pseudoquina*, as well as two flavonoids purified from it, which can be used as a therapeutic alternative on its own, or in association with other drugs, to treat disease evoked by *L. amazonensis*.

1. Introduction

Leishmaniasis is a disease caused by the protozoa of the *Leishmania* genus. The parasites are transmitted through the bite of an infected sandfly, and more than 20 *Leishmania* species are responsible for diseases in humans [1]. Leishmaniasis is endemic in 98 countries throughout Africa,

Asia, Southern Europe, and Latin America. The disease is also emergent in dogs living in the United States, Canada, Northern Italy, and Germany [2–4]. The impact of the disease on human health has been grossly underestimated for many years, and the World Health Organization has classified leishmaniasis as one of the six most important neglected tropical diseases [2].

The treatment of leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimonials; however, increased parasite resistance and side effects, such as arthralgias, myalgias, pancreatitis, leukopenia, and cardiotoxicity, are important problems reported by patients [5–7]. Liposomal amphotericin B (AmpB) is considered effective, though these formulations are very expensive [8]. In addition, leishmaniasis has emerged as an opportunistic infection in human immunodeficiency virus-infected patients [9]; therefore, the development of new and cost-effective alternative therapeutic strategies to treat the disease has become a priority [10].

In recent years, considerable attention has been given to secondary compounds purified from plants in an attempt to search for new antileishmanial drugs [6, 11–13]. Although studies employing extracts and/or purified molecules presenting antileishmanial activity have been undertaken, and to date, no effective and alternative products have been formulated that can be applied to treat leishmaniasis.

The *Strychnos* genus includes approximately 200 plant species, many of which are known for their potential medicinal secondary metabolites [14, 15]. *Strychnos pseudoquina* St. Hil. is a native cinchona-like tree of the Brazilian savanna, popularly known as “quina” and used in the folk medicine to treat hepatic and stomach diseases [16], fever, and malaria [17]. Phytochemical and biological studies employing *S. pseudoquina* have demonstrated the presence of some alkaloids and flavonoids that present antiplasmodial and/or antitumoral activity [18–20]. In the case of flavonoids, results have indicated their pharmacological activity and potential benefit to general human health [21]. Due to the popularity of *S. pseudoquina* as a medicinal plant, the present study was developed to evaluate the antileishmanial activity of an ethyl acetate extract obtained from this plant in an attempt to purify compounds responsible for this biological activity using a bioactivity-guided fractionation. Two flavonoids were isolated, quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone, which presented an effective antileishmanial activity against *Leishmania amazonensis*, and studies were extended to establish their minimum inhibitory concentrations (IC₅₀), their leishmanicidal effects on the intra-macrophage *Leishmania* stage, as well as their cytotoxic effects on murine macrophages (CC₅₀), and in O₊ human red blood cells.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and General Details. Reagents and solvents were obtained from commercial sources and were used as derived. Column chromatography was carried out using silica gel F254 (230–400 mesh) as a stationary phase. Thin layer chromatography (TLC) was carried out using aluminum sheets precoated with silica gel 60 F254 (Merck). 1D and 2D NMR experiments were performed on a Bruker AVANCE DRX400 and DPX200 spectrometers at the Department of Chemistry, Federal University of Minas (UFMG), Brazil, in CD₃OD or DMSO-*d*₆ at 300 K, using tetramethylsilane (TMS) as the chemical shift internal standard for both nuclei. UPLC-MS/MS analyses were carried out using an ACQUITY Ultra Performance LC system (Waters, Milford, MA, USA) linked simultaneously to both PDA 2996 photo diode array

detector (Waters, Milford, MA, USA) and an ACQUITY TQ Detector (Waters MS Technologies, Manchester, UK), equipped with a Z-spray electrospray ionization (ESI) source operating in positive mode. MassLynx software (version 4.1, Waters, Milford, MA, USA) was used to control the instruments, as well as for data acquisition and processing.

2.2. Plant Material and Identification. *Strychnos pseudoquina* St. Hil. stem bark was collected in a Brazilian savanna region, in the district of Uberlândia (Uberlândia, Minas Gerais, Brazil). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Federal University of Uberlândia (UFU) (code HUFU 10936). The vegetable material was selected and air-dried at room temperature for 1 week.

2.3. Bioactivity-Guided Fractionation and Purification. Exactly 480 g of the pulverized stem barks was submitted to percolation with hexane, and the material was sequentially submitted to exhaustive percolation with ethyl acetate at room temperature. The solvent was removed by evaporation to yield the ethyl acetate extract (AESP, 36.30 g, 7.6%). Later, the extract was subjected to silica gel column chromatography and eluted in different gradients of dichloromethane-ethyl acetate followed by ethyl acetate-ethanol 98%, with a progressive increase in the polarity of the mobile phase, providing 456 fractions. Fractions that shown similar TLC data were combined, formulating 29 different groups, which were evaluated in their antileishmanial activity in such a way as to select the groups that presented the best antileishmanial activity and to identify the pure compounds responsible for this biological activity.

2.4. Parasites and Mice. *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) was used. Parasites were grown at 24°C in Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, at pH 7.4. Stationary-phase promastigotes were prepared as described [23]. Murine peritoneal macrophages were obtained from female BALB/c mice (8 weeks old), which were purchased from the Institute of Biological Sciences of UFMG. The Animal Use Committee from UFMG approved the experimental protocol (code 136/2012).

2.5. Antileishmanial Activity. The inhibition of *Leishmania* growth was assessed *in vitro* by cultivating stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* (1 × 10⁶ cells) in the presence of ethyl acetate extract (0.78 to 100 µg/mL), 29 purified fractions (50 µg/mL, each one), quercetin 3-O-methyl ether (1.09 to 140 µM) or strychnobiflavone (0.62 to 79.5 µM), in 96-well culture plates (Nunc, Nunclon, Roskilde, Denmark) for 48 h at 24°C. A previous titration curve was performed to determine the best time of inhibition of *L. amazonensis* growth incubating the evaluated products (data not shown). Cell viability was assessed by measuring the cleavage of 2 mg/mL of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma). Absorbances were measured by using a multiwell scanning spectrophotometer

(LABTRADE, model 660) at a wavelength of 570 nm. Amphotericin B (1 μM) was used as a positive control. The concentration of the products needed to inhibit 50% of the *Leishmania* viability (IC_{50}) was determined by applying the sigmoidal regression of the concentration-response curves, using different concentrations of the compounds. Data shown are representative of four independent experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

2.6. Cytotoxicity Assay and Hemolytic Activity. The inhibition of 50% of the macrophage viability (CC_{50}) was calculated by cultivating macrophages (5×10^5 cells) with ethyl acetate extract (10 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), quercetin 3-O-methyl ether (1.09 to 140 μM), or strychnobiflavone (0.62 to 79.5 μM), in 96-well plates for 48 h at 37°C. A previous titration curve was performed to determine the best time of inhibition of macrophages viability incubating the evaluated products (data not shown). Cell viability was assessed by the MTT assay, and amphotericin B was used as a control. The selectivity index (SI) of the products was calculated by determining the ratio between IC_{50} and CC_{50} . The hemolytic activity was investigated by incubating the products, in the same concentrations used for cytotoxicity evaluation, with a 5% red blood cell (human O^+) suspension for 1 h at 37°C. Briefly, the erythrocyte suspension was centrifuged (1000 $\times\text{g}$ for 10 min), and cell lysis was determined spectrophotometrically (570 nm), as described [24]. The absence of (blank) or 100% presence of hemolysis (positive control) was determined by replacing the products for an equal volume of PBS or distilled water, respectively. The results were determined by the percentage of hemolysis when compared with the negative and positive controls. Data shown are representative of four independent experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

2.7. Inhibition of Infection in Phagocytic Cells. The inhibitory effect of quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone on the *Leishmania* invasion of macrophages was evaluated using promastigotes of *L. amazonensis*. Parasites (1×10^6 cells) were preincubated with different concentrations of quercetin 3-O-methyl ether (0, 70, 140, or 280 μM) or strychnobiflavone (0, 40, 80, or 160 μM) for 4 h at 24°C. A previous titration curve was performed to determine the minimum time incubation of parasites with the compounds, in order to obtain the maximum of inhibition of infection into the host cells (data not shown). After incubation, parasites were washed three times with RPMI 1640 medium, quantified, and incubated for 24 h with murine macrophages, using a ratio of 10 parasites per 1 macrophage. After, cells were washed, set, and stained to determine the percentage of infected macrophages by counting 200 cells in triplicate. Data shown are representative of four independent experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

2.8. Treatment of Infected Macrophages. Murine macrophages (5×10^5 cells) were plated on round glass coverslips inside the wells of a 24-well culture plate (Nunc) in an RPMI 1640 medium supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine,

200 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, at pH 7.4. After 24 h of incubation at 37°C in 5% CO_2 , stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* were added to the wells (5×10^6 cells), and the cultures were incubated for 24 h at 37°C in 5% CO_2 . A previous titration curve was performed to determine the minimum time incubation of parasites with the macrophages, in order to obtain the maximum of infection into the host cells (data not shown). Next, free parasites were removed by extensive washing with an RPMI 1640 medium, and infected macrophages were quantified and treated for 48 h with quercetin 3-O-methyl ether (0, 70, 140, or 280 μM) or strychnobiflavone (0, 40, 80 or 160 μM) for 48 h at 24°C in 5% CO_2 . Cells were washed in RPMI 1640 and incubated with 4% paraformaldehyde for 15 min, at which time they were treated with 70% ethanol in an ice bath for 4 h and again washed three times with sterile PBS. Amphotericin B was used as a control. The percentage of the inhibition of *Leishmania* intra-macrophage viability was determined by counting 200 cells in triplicate. Data shown are representative of four independent experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

2.9. Statistical Analysis. Data were analyzed using the Graph-Pad Prism software (version 5.0 for Windows). The difference among the groups was evaluated by the one-way ANOVA, followed by Bonferroni's post-test for multiple comparisons. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Structural Elucidation of Flavonoids. The 29 different groups identified in a bioactivity-guided fractionation were evaluated in their antileishmanial activity, and four of them were selected. These groups were purified by recrystallization using dichloromethane, and rendered the purification of quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone. The structural and chemical characterizations of the two flavonoids isolated from *S. pseudoquina* in this study are shown in Table 1. In addition, the chemical structures of the described products are shown in Figure 1. All data obtained confirmed the identification of the two pure compounds present in the four selected fractions, which exhibited an effective antileishmanial activity (Table 1 and Figure 1). In addition, the structural identification of quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone were compared with literature records in order to prove to be identical compounds [20, 22].

3.2. Antileishmanial Activity of the Ethyl Acetate Extract and Purified Compounds. The inhibition of *Leishmania* viability using an ethyl acetate extract obtained from *S. pseudoquina* was evaluated against stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis*. It could be observed that this extract was effective against parasites, presenting an IC_{50} value of 24.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 2). In this context, a bioactivity-guided fractionation was performed, and 29 different groups were obtained and individually evaluated in their antileishmanial activity, in which 4 groups were identified as presenting the

TABLE 1: Structural and chemical characterizations of the two flavonoids purified from *S. pseudoquina*. ^1H and ^{13}C chemical shifts (ppm) obtained for quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone.

Positions	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_{H}) ^a	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_{H}) ^c	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_{C}) ^a	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_{C}) ^c	Strychnobiflavone (δ_{H}) ^b	Strychnobiflavone (δ_{H}) ^d	Strychnobiflavone (δ_{C}) ^b	Strychnobiflavone (δ_{C}) ^d
2	—	—	158.5 ^e	157.3	—	—	155.5	157.4
3	—	—	139.7	138.4	—	—	137.4	138.7
4	—	—	180.1	178.9	—	—	178.0	179.1
5	—	—	166.0	161.9	—	—	154.1	162.0
6	6.18; d ($J = 2.0\text{ Hz}$)	6.21	99.9	98.6	6.16; s	6.26; s	97.9	98.8
7	—	—	163.2	164.8	—	—	159.9	164.2
8	6.37; d ($J = 2.0\text{ Hz}$)	6.41	94.8	93.5	—	—	102.8	103.6
9	—	—	158.1 ^e	156.8	—	—	161.2	155.5
10	—	—	106.0	104.7	—	—	104.0	105.5
1'	—	—	123.6	121.8	—	—	121.1	123.0
2'	7.61; d ($J = 2.0\text{ Hz}$)	7.64	116.5 ^f	115.3	7.44; d ($J = 2.0\text{ Hz}$)	7.60; d ($J = 2\text{ Hz}$)	115.9	124.0
3'	—	—	146.6	145.3	—	—	145.1	148.7
4'	—	—	150.1	148.8	—	—	148.6	145.3
5'	6.89; d ($J = 8.4\text{ Hz}$)	6.92	116.6 ^f	115.2	6.71; d ($J = 8.4\text{ Hz}$)	6.82; d ($J = 8\text{ Hz}$)	115.4	115.7
6'	7.51; dd ($J = 8.4\text{ Hz};$ 2.0 Hz)	7.55	122.5	121.2	7.05; dd ($J = 8.4\text{ Hz}; 2.0\text{ Hz}$)	7.29; dd ($J = 8\text{ Hz}; 2\text{ Hz}$)	120.2	121.7
2''	—	—	—	—	—	—	159.1	157.4
3''	—	—	—	—	—	—	138.2	138.7
4''	—	—	—	—	—	—	177.8	179.0
5''	—	—	—	—	—	—	156.3	161.9
6''	—	—	—	—	6.07; d ($J = 1.6\text{ Hz}$)	6.10 ($J = 2\text{ Hz}$)	98.4	98.9
7''	—	—	—	—	—	—	163.9	162.5
8''	—	—	—	—	5.66; d ($J = 1.6\text{ Hz}$)	5.84; d ($J = 2\text{ Hz}$)	92.8	93.6
9''	—	—	—	—	—	—	161.2	156.4
10''	—	—	—	—	—	—	104.2	105.5
1'''	—	—	—	—	—	—	122.3	122.9
2'''	—	—	—	—	—	—	119.7	116.2
3'''	—	—	—	—	—	—	144.2	147.9
4'''	—	—	—	—	—	—	147.5	148.8
5'''	—	—	—	—	6.97; d ($J = 8.4\text{ Hz}$)	7-71; m	114.1	114.9
6'''	—	—	—	—	7.05; d ($J = 8.4\text{ Hz}$)	7-71; m	121.4	119.8

TABLE 1: Continued.

Positions	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_H) ^a	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_H) ^c	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_C) ^a	Quercetin 3-O-methyl ether (δ_C) ^c	Strychnobiflavone (δ_H) ^b	Strychnobiflavone (δ_H) ^d	Strychnobiflavone (δ_C) ^b	Strychnobiflavone (δ_C) ^d
3-O-Me	3.77; s	3.80	60.6	59.35	3.79; s	3.82; s	59.8	60.3
3''-O-Me	—	—	—	—	3.43; s	3.63; s	59.6	59.9
5-OH	12.47; s	—	—	—	12.68; s	12.8; s	—	—
5'-OH	—	—	—	—	12.56; s	12.6; s	—	—

^a CD₃OD; ^b DMSO-*d*₆; ^c DMSO-*d*₆ (Guinot et al. 2009 [22]); ^d acetone-*d*₆ (Nicoletti et al. 1984 [20]); ^{e,f}: interchangeable.

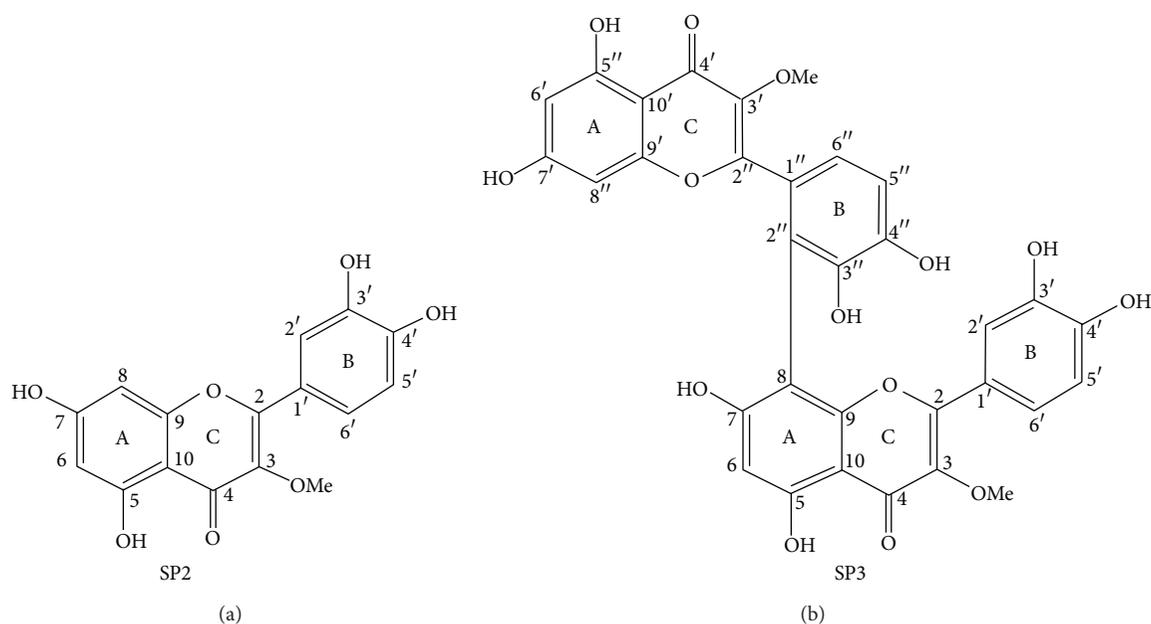


FIGURE 1: Structural characterization of quercetin 3-O-methyl ether (a) and strychnobiflavone (b).

TABLE 2: Antileishmanial activity, cytotoxicity, and selective index found for the ethyl acetate extract of *S. pseudoquina*, quercetin 3-methyl ether, and strychnobiflavone.

Compounds	IC ₅₀ ^a	CC ₅₀ ^b	RBC ₅₀ ^c	SI ^d
Ethyl acetate extract (μg/mL)	24.9 ± 5.2	257.9 ± 35.9	180.8 ± 9.9	10.4
Quercetin 3-methyl ether (μM)	8.1 ± 1.5	199.0 ± 25.9	155.0 ± 33.2	24.6
Strychnobiflavone (μM)	3.2 ± 0.2	125 ± 4.5	209.6 ± 2.5	39.6
AmpB (μM)	0.1 ± 0.13	0.8 ± 0.2	ND ^e	9.9

The results are expressed as medium ± standard deviation. ^aValue of inhibitory concentration of 50% of promastigotes of *L. amazonensis*. ^bValue of inhibitory concentration of 50% of murine macrophages. ^cValue of 50% of human red blood cell lysis. ^dSelectivity Index (ratio between CC₅₀ and IC₅₀). ^eNot Done. AmpB (amphotericin B) was used as a control drug. Values are the average of four independent experiments, which presented similar results.

best biological activity (data not shown). These groups were submitted to rigorous purification processes using NMR, and 3-O-methyl ether and strychnobiflavone identified the levels of antileishmanial activity. As such, these two compounds were individually evaluated in their antileishmanial activity against promastigotes of *L. amazonensis*, where the IC₅₀ values were 8.08 μM and 3.16 μM, respectively (Table 2). Amphotericin B was used as a control.

3.3. Cytotoxicity and Hemolytic Activity. The cytotoxicity of the ethyl acetate extract, 3-O-methyl ether, and strychnobiflavone was investigated using murine macrophages. The *in vitro* assay demonstrated no significant toxicity in cells after incubation with these products. The values of CC₅₀ were of 258 μg/mL, 199 μM, and 125 μM, respectively, and the calculated selectivity index (SI) was 10.4, 24.62, and 39.55, respectively (Table 2). The hemolytic activity in O⁺ human red blood cells was also determined to be an additional cytotoxic parameter, and no significant damage to human erythrocytes could be observed after incubation with the ethyl acetate extract, quercetin 3-O-methyl ether, or strychnobiflavone products (Table 2).

3.4. Inhibition of Infection and Treatment of Infected Macrophages. The *Leishmania* infectivity treated with quercetin 3-O-methyl ether or strychnobiflavone was also evaluated in murine macrophages. For this purpose, *L. amazonensis* were preincubated with quercetin 3-O-methyl ether (0, 70, 140, or 280 μM) or strychnobiflavone (0, 40, 80, or 160 μM) for 4 h at 24°C. These parasites were able to infect 46.1% and 23.8% of the macrophages, respectively, while parasites that were not preincubated with the products were able to infect about 87% of the macrophages. In this context, parasites presented reductions in their infectivity in the order of 47% and 72.6% after treatment with quercetin 3-O-methyl ether or strychnobiflavone, respectively (Table 3). An evaluation of the capacity of the quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone in treating macrophages previously infected with *L. amazonensis* was performed. Cells were preinfected with promastigotes of *L. amazonensis* (in a ratio of 10 parasites per 1 macrophage) and later treated with 70, 140, or 280 μM of quercetin 3-O-methyl ether, or with 40, 80, or 160 μM of strychnobiflavone, for 48 h at 24°C and 5% CO₂. The results shown that macrophages that were infected and later treated with quercetin 3-O-methyl ether

TABLE 3: Infection of macrophages using pre-treated promastigotes of *Leishmania amazonensis*.

Compounds	Concentration	Percentage of infected macrophages after treatment/number of amastigotes per cell ^a
Ethyl acetate extract ($\mu\text{g/mL}$)	100	47.5/2.6
	50	54.5/2.8
	25	63.1/7.1
	0	87.0/8.4
Quercetin 3-O-methyl ether (μM)	280	46.1/2.4
	140	61.9/3.9
	70	67.8/4.5
	0	87.0/8.4
Strychnobiflavone (μM)	160	23.8/1.2
	80	47.8/2.2
	40	53.0/3.0
	0	87.0/8.4

^aThe percentage of infected macrophages and the number of amastigotes per cell were determined by counting 200 cell coverslips, performed in triplicate. Values are representative from four independent experiments, which presented similar results.

or strychnobiflavone presented reductions in the parasite number in the order of 40% and 87%, respectively (Table 4).

4. Discussion

Plants of the genus *Strychnos* are known for their bioactivity in folk medicine. Nevertheless, few studies have been performed to evaluate their biological activity or to identify and characterize the compounds responsible for this effect. *Strychnos pseudoquina* is a plant used in Brazilian folk medicine in the treatment of diseases, such as malaria [17]. One previous study demonstrated the activity of a methanolic extract obtained from the leaves of *S. pseudoquina* in protecting mice against injuries to the gastric mucosa caused by nonsteroidal anti-inflammatory drugs [25]. Phytochemical studies developed by Monache et al. [26] and Nicoletti et al. [20] led to the biochemical isolation of bisnordihydrotoxiferine, diabolone, and 11-methoxydiabolone alkaloids purified from *S. pseudoquina* leave extracts to show certain biological activities.

In this context, only limited data are available in the literature concerning the biological properties and chemical composition of stem bark extracts obtained from *S. pseudoquina*, and in relation to the identification of the pure compounds of this plant, that may be responsible for these biological effects. In this light, the purpose of this study was to evaluate the antileishmanial activity of an ethyl acetate extract obtained from *S. pseudoquina* and to perform the bioactivity-guided fractionation in an attempt to identify the active and isolate components. This strategy led to the isolation of two flavonoids after a rigorous purification process by adsorption chromatography and recrystallization. These isolated compounds were the main

TABLE 4: Treatment of infected macrophages.

Products	Concentration	Percentage of infected macrophages after treatment/number of amastigotes per cell ^a
Ethyl acetate extract ($\mu\text{g/mL}$)	100	48.9/1.7
	50	50.0/1.8
	25	70.3/4.4
	0	87.0/8.4
Quercetin 3-O-methyl ether (μM)	280	46.3/1.7
	140	68.0/ 4.4
	70	72.4/5.6
	0	87.0/8.4
Strychnobiflavone (μM)	160	9.6/0.4
	80	26.3/1.3
	40	37.9/1.5
	0	87.0/8.4

^aThe percentage of infected macrophages and the number of amastigotes per cell were determined by counting 200 cell coverslips, performed in triplicate. Values are representative from four independent experiments, which presented similar results.

factors responsible for the antileishmanial activity observed in the ethyl acetate extract evaluated in this study. Therefore, the obtained spectroscopic data performed here, and their comparison with assignments reported for quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone led to a unique proposal of identification of structures of the two isolated flavonoids. 2D NMR techniques, in particular HMBC (Figure 2), allow us to unambiguously establish the structural assignment of strychnobiflavone without requiring chemical modification, as used by Nicoletti et al. [20].

Natural compounds are an important source of new and selective agents for the treatment of tropical diseases caused by protozoans, such as leishmaniasis [27–29]. The antileishmanial activity observed in total extracts prepared from these materials has been attributed to compounds belonging to diverse chemical groups, such as isoquinoline alkaloids, indole alkaloids, quinones, terpenes, steroids, carbohydrates, lignans, proteins, and flavonoids [28, 30–32]. In the present study, the quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone proved to be responsible for the antileishmanial activity observed in the ethyl acetate extract of *S. pseudoquina* against *L. amazonensis*. Results shown that the quercetin 3-O-methyl ether presented an IC_{50} value in the order of $8.08 \mu\text{M}$, while the strychnobiflavone presented an IC_{50} value of $3.16 \mu\text{M}$. Previous reports have shown that flavonoids are known to have anti-inflammatory activity in mammalian cells, and their action in inflammatory responses has been attributed to an antioxidant effect [33–35]. Tasdemir et al. [36] demonstrated an antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavonoids that had been purified from natural compounds, as well as by their analogues in *in vitro* and *in vivo* experiments. In addition, Marín et al. [31] shown that flavonoids purified from *Consolida oliveriana* were able to

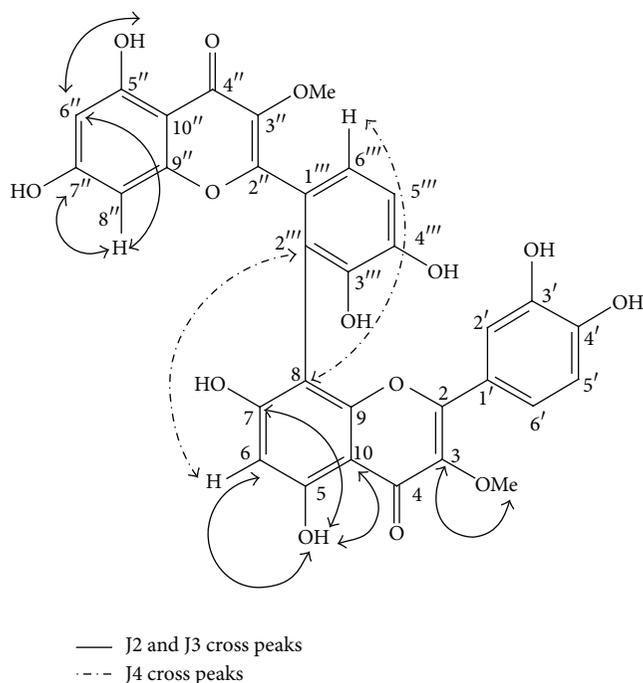


FIGURE 2: Key HMBC correlations of strychnobiflavone.

activate macrophages and were highly effective in *in vitro* experiments against *L. peruviana*.

Both quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone shown an effective leishmanicidal activity against *in vitro* promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis* and proved to be effective in inhibiting the infection of phagocytic cells by parasites that had been preincubated with them, as well as in reducing the parasite burden in first infected macrophages, which were later treated with the products. In addition, the two substances presented a low cytotoxicity in murine macrophages and a null hemolytic activity in human red blood cells. Recently, da Silva et al. [18] shown that a methanolic extract prepared from *S. pseudoquina* was unable to induce toxicity in BALB/c mice. In this study, no signal or symptom of toxicity was observed in the treated cells [18]. There were no significant differences in organ weight, in water or food intake, or in the amount of faces produced by treated and control mice. On the other hand, amphotericin B proved to be quite efficient in eliminating parasites *in vitro* but was highly cytotoxic in mammalian cells, thus demonstrating some of its reported adverse effects in the patients [18].

Results presented here shown that quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone, purified from an ethyl acetate extract of *S. pseudoquina* stem bark, were more potent in combating *Leishmania* in *in vitro* experiments, as compared with an ethyl acetate extract of this plant. Since these compounds are present in relatively high concentrations in *S. pseudoquina* stem bark, the cultivation or sustainable management of this plant species may become viable for the commercial production of these flavonoids, representing an alternative to the sustainable use of the Brazilian savanna biome.

5. Conclusion

The results presented in this study shown the identification and first use of antileishmanial and atoxic products, based on two flavonoids purified from a common Brazilian medicinal plant. Further studies are in progress to evaluate the activity of quercetin 3-O-methyl ether and strychnobiflavone in treating murine models experimentally infected with *L. amazonensis*.

Authors' Contribution

Rodrigo Maia de Pádua, João Paulo Viana Leite, and Eduardo Antonio Ferraz Coelho contributed equally to this work.

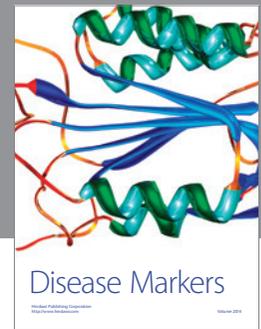
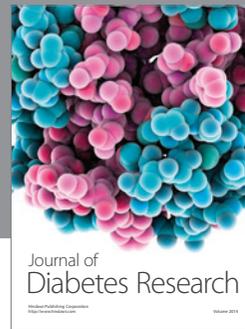
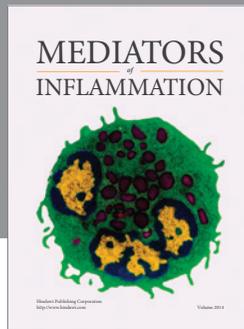
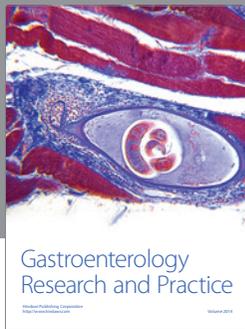
Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Manuel Soto (CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Spain) for providing invaluable scientific assistance in this study. This work was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa from UFMG (Edital 03/2013), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (INCT-NanoBiofar), FAPEMIG (CBB-APQ-00496-11 and CBB-APQ-01051-12), and CNPq (APQ-472090/2011-9). EAFC is a grant recipient of CNPq. JPVL and MACF are grant recipient of FAPEMIG/CAPES.

References

- [1] G. Grimaldi Jr. and R. B. Tesh, "Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 6, no. 3, pp. 230–250, 1993.
- [2] WHO, "Control of the leishmaniasis," *World Health Organization Technical Report Series*, no. 949, pp. 1–186, 2010.
- [3] C. A. Petersen, "Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States," *Topics in Companion Animal Medicine*, vol. 24, no. 4, pp. 182–188, 2009.
- [4] P. D. Ready, "Leishmaniasis emergence in Europe," *Euro Surveillance*, vol. 15, no. 10, Article ID 19505, 2010.
- [5] J. Berman, "Current treatment approaches to leishmaniasis," *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 16, no. 5, pp. 397–401, 2003.
- [6] S. L. Croft and G. H. Coombs, "Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs," *Trends in Parasitology*, vol. 19, no. 11, pp. 502–508, 2003.
- [7] L. F. Oliveira, A. O. Schubach, M. M. Martins et al., "Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World," *Acta Tropica*, vol. 118, no. 2, pp. 87–96, 2011.
- [8] S. Mondal, P. Bhattacharya, and N. Ali, "Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis," *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 8, no. 8, pp. 919–944, 2010.
- [9] M. Tremblay, M. Olivier, and R. Bernier, "Leishmania and the pathogenesis of HIV infection," *Parasitology Today*, vol. 12, no. 7, pp. 257–261, 1996.
- [10] F. Frézard, C. Demicheli, and R. R. Ribeiro, "Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs," *Molecules*, vol. 14, no. 7, pp. 2317–2336, 2009.

- [11] T. Khaliq, P. Misra, S. Gupta et al., "Peganine hydrochloride dihydrate an orally active antileishmanial agent," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 19, no. 9, pp. 2585–2586, 2009.
- [12] T. S. Tiuman, T. Ueda-Nakamura, D. A. G. Cortez et al., "Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no. 1, pp. 176–182, 2005.
- [13] M. C. Vendrametto, A. O. D. Santos, C. V. Nakamura, B. P. D. Filho, D. A. G. Cortez, and T. Ueda-Nakamura, "Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoide-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *palescens*," *Parasitology International*, vol. 59, no. 2, pp. 154–158, 2010.
- [14] P. Thongphasuk, R. Suttisri, R. Bavovada, and R. Verpoorte, "Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*," *Phytochemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 897–901, 2003.
- [15] G. Philippe, L. Angenot, M. Tits, and M. Frédérick, "About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids," *Toxicol*, vol. 44, no. 4, pp. 405–416, 2004.
- [16] P. Corrêa, *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Cultivadas Exóticas*, 1952.
- [17] V. F. Andrade-Neto, M. G. L. Brandão, J. R. Stehmann, L. A. Oliveira, and A. U. Krettli, "Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 87, no. 2-3, pp. 253–256, 2003.
- [18] M. A. da Silva, B. P. M. Rafacho, C. A. Hiruma-Lima et al., "Evaluation of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. leaves extract on gastrointestinal activity in mice," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 53, no. 8, pp. 881–885, 2005.
- [19] M. Frederick, M. Hayette, M. Tits, P. de Mol, and L. Angenot, "In vitro activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 43, no. 9, pp. 2328–2331, 1999.
- [20] M. Nicoletti, M. O. F. Goulart, R. A. de Lima, A. E. Goulart, F. D. Monache, and G. B. M. Bettolo, "Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*," *Journal of Natural Products*, vol. 47, no. 6, pp. 953–957, 1984.
- [21] G. Toker, E. Küpeli, M. Memisoğlu, and E. Yesilada, "Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 95, no. 2-3, pp. 393–397, 2004.
- [22] P. Guinot, A. Gargadennec, P. La Fisca, A. Fruchier, C. Andary, and L. Mondolot, "*Serratula tinctoria*, a source of natural dye: flavonoid pattern and histolocalization," *Industrial Crops and Products*, vol. 29, no. 2-3, pp. 320–325, 2009.
- [23] E. A. F. Coelho, C. A. P. Tavares, F. A. A. Carvalho et al., "Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 7, pp. 3988–3994, 2003.
- [24] S. E. Löfgren, L. C. Miletti, M. Steindel, E. Bachère, and M. A. Barracco, "Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals," *Experimental Parasitology*, vol. 118, no. 2, pp. 197–202, 2008.
- [25] F. V. Santos, I. M. S. Colus, M. A. Silva, W. Vilegas, and E. A. Varanda, "Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, no. 9, pp. 1585–1589, 2006.
- [26] F. D. Monache, E. Corio, and G. B. Marini-Bettolo, "Research on the alkaloids of *Strychnos*. XVI. The alkaloids of *Strychnos mitscherlichii* Baillon and *Strychnos gardneri* A. DC," *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, vol. 3, no. 2, pp. 190–192, 1967.
- [27] J. C. Delorenzi, M. Attias, C. R. Gattass et al., "Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, no. 5, pp. 1349–1354, 2001.
- [28] I. O. Pereira, D. M. Assis, M. A. Juliano et al., "Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors," *Journal of Medicinal Food*, vol. 14, no. 6, pp. 557–562, 2011.
- [29] D. G. Valadares, M. C. Duarte, J. S. Oliveira et al., "Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species," *Parasitology International*, vol. 60, no. 4, pp. 357–363, 2011.
- [30] C. A. C. Araujo, L. V. Alegrio, and L. L. Leon, "Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrobium sclerophyllum*," *Phytochemistry*, vol. 49, no. 3, pp. 751–754, 1998.
- [31] C. Marín, S. Boutaleb-Charki, J. G. Díaz et al., "Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*," *Journal of Natural Products*, vol. 72, no. 6, pp. 1069–1074, 2009.
- [32] L. G. Rocha, J. R. G. S. Almeida, R. O. Macêdo, and J. M. Barbosa-Filho, "A review of natural products with antileishmanial activity," *Phytomedicine*, vol. 12, no. 6-7, pp. 514–535, 2005.
- [33] S. R. Afonso-Cardoso, C. V. Silva, M. S. Ferreira, and M. A. Souza, "Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages," *Experimental Parasitology*, vol. 128, no. 1, pp. 61–67, 2011.
- [34] H. K. Kim, B. S. Cheon, Y. H. Kim, S. Y. Kim, and H. P. Kim, "Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships," *Biochemical Pharmacology*, vol. 58, no. 5, pp. 759–765, 1999.
- [35] H. Matsuda, T. Morikawa, S. Ando, I. Toguchida, and M. Yoshikawa, "Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 11, no. 9, pp. 1995–2000, 2003.
- [36] D. Tasdemir, M. Kaiser, R. Brun et al., "Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 50, no. 4, pp. 1352–1364, 2006.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>

