UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito leishmanicida de derivados de lignanas
dibenzilbutirolactônicas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia.

Orientada: Kelly Cristina Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodrigues, Kelly Cristina

Avaliação do efeito leishmanicida de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas.

47 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio de.

1. Leishmania amazonensis. 2. Lignanas dibenzilbutirolactônicas.
3. MTT. 4. Resazurina. 5. Avaliação de substâncias.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kelly Cristina Rodrigues

Avaliação do efeito leishmanicida de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Tânia e José Luiz que, sempre presentes e com muito apoio e carinho, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, pela oportunidade, ensinamento e paciência.

Aos docentes da Disciplina de Parasitologia da FCFRP - USP, pelo convívio e amizade.

À Miriam, Toninha e Georgius, pelo auxílio constante, companhia e amizade.

Aos pós-graduandos do laboratório de Parasitologia da FCFRP - USP, em especial à Mariana Rosa, Mariana Bryan, Christian e Luis Gustavo pelo auxílio na realização dos trabalhos, amizade e companheirismo.

À Profa. Dra. Rosângela da Silva, Prof. Dr. Márcio Luís Andrade Silva, da Universidade de Franca e ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos da FCFRP-USP pelo fornecimento das substâncias.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

“Há duas formas para viver a sua vida:

Uma é acreditar que não existe milagre.

A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.

Fernando Pessoa

RESUMO

RODRIGUES, K.C. Avaliação do efeito leishmanicida de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A leishmaniose é uma infecção causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que causa um impacto social e econômico elevado, sendo a segunda maior incidência mundial de doença parasitária. Com o intuito de encontrar novas substâncias ou medicamentos de menor toxicidade e de custos inferiores que poderiam ser utilizados nos tratamentos de casos de infecção e, principalmente em situações de resistência parasitária, tem sido averiguada a possibilidade de utilização de substâncias de origem natural, tanto animal como vegetal, e substâncias sintéticas. Entre as que recentemente apresentaram propriedades biológicas úteis, estão alguns derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas que apresentam significativa ação tripanocida. Desse modo, propusemos avaliar a atividade biológica dessas lignanas em sistema *in vitro*, sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os compostos utilizados foram **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, **(3)** cubebina, **(D)** 6-6'dinitroinoquinina e **(H)** hinoquinina. Para avaliação da atividade das substâncias foram utilizadas duas metodologias colorimétricas, MTT e Alamar Blue[®] e a contagem microscópica em hemocitômetro. Pelos resultados obtidos verificamos que pela contagem microscópica das formas promastigotas, as substâncias **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, **(3)** cubebina e **(D)** 6-6'dinitroinoquinina apresentaram potencial leishmanicida, sendo encontrados os seguintes valores de IC₅₀: **(1)** = 19,4µM; **(3)** 3,6µM; **(D)** = 15,5µM. Entretanto, os resultados obtidos com as mesmas substâncias em formas amastigotas do parasita não demonstraram atividade leishmanicida. Os métodos colorimétricos não apresentaram correspondência com a contagem microscópica, mostrando-se ineficazes para essa classe de substância.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; Lignanas dibenzilbutirolactônicas; MTT; Resazurina; Avaliação de substâncias.

ABSTRACT

RODRIGUES, K.C. Evaluation of leishmanicidal effect in derivatives of dibenzylbutirolactonic lignans. 2009. 47f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Leishmaniasis is an infection caused by a protozoan parasite of the genus *Leishmania*, being the second great incidence of parasitic diseases in the world. In the search for new drugs or substances with low costs and low toxicity which could be used in case of infection and situations of parasite resistance, being evaluated the possibility to use natural or synthetic substances. Dibenzylbutirolactonic lignans are substances with useful biological properties presenting significant trypanocidal effect. In this way we proposed to evaluate the *in vitro* biological activity of the lignans in of *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote forms. The compounds used were: **(1)** 7'-O-N,N-dimethylamine cubebine, **(3)** cubebine, **(D)** 6-6'-dinitroinokinine e **(H)** hinokinin. For the evaluation of these substances, two colorimetric methods were employed: MTT and Alamar Blue®, followed by microscopic counting in haemocytometer. After the results obtained after the counting of promastigote forms, we could verify that the substances **(1)** 7'-O-N,N-dimethylamine cubebine, **(3)** cubebine, **(D)** 6-6'-dinitroinokinine, and **(H)** hinokinin showed leishmanicidal potential, being founded the followed values of IC₅₀: **(1)** = 19.4µM; **(3)** 3.6µM; **(D)** = 15.5µM. On the other hand the results obtained of the same substances in the parasite amastigote forms showed no leishmanicidal effect. The colorimetric methods showed no correspondence with microscopic counting demonstrating inefficacy of this substance class.

Key words: *Leishmania amazonensis*; Dibenzylbutirolactonics lignans; MTT; Resazurin, Substances evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina.....	13
Figura 2. Estrutura da cubebina.....	13
Figura 3. Estrutura da 6-6'-dinitro-hinoquinina.....	14
Figura 4. Estrutura da hinoquinina.....	14
Figura 5. Correlação entre os valores de absorbância, número de promastigotas por mL e diferentes concentrações de MTT após 4 horas de incubação.....	21
Figura 6. Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em 24 horas.....	22
Figura 7. Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em 72 horas.....	22
Figura 8. Comparação entre a atividade da 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	24
Figura 9. Comparação entre a atividade da cubebina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	24
Figura 10. Comparação entre a atividade da 6-6'-dinitro-hinoquinina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	25
Figura 11. Comparação entre a atividade da hinoquinina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	25
Figura 12. Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas no ensaio colorimétrico com MTT sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em 24 horas.....	26
Figura 13. Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas no ensaio colorimétrico com MTT sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em 72 horas.....	27
Figura 14. Curva dose-resposta dos parasitas em função da concentração das substâncias hinoquinina e 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina no ensaio colorimétrico com Resazurina sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em 24 horas.....	28

Figura 15. Comparação entre as diferentes concentrações das substâncias avaliadas sobre as formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no tempo de 72 horas.....	29
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IC_{50} e da porcentagem de lise e desvio padrão em função da concentração (μM) das substâncias analisadas na contagem microscópica.....	23
Tabela 2. Valores de IC_{50} e da porcentagem de lise e desvio padrão em função da concentração (μM) das substâncias analisadas no ensaio com MTT em 24 e 72 horas.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
μg	Micrograma(s)
IC ₅₀	Dose efetiva 50%
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
mL	Mililitro(s)
μM	Micromolar
μL	Microlitro(s)
nm	Nanômetros
mg	Miligrama(s)
kg	Quilograma(s)
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₉₀	Dose Efetiva 90%
UI	Unidade Internacional
ng	Nanograma(s)
DL50	Dose efetiva 50%
IC90	Concentração de inibição 90%
(1)	7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina
(3)	Cubebina
(D)	6-6'-dinitro-hinoquinina
(H)	Hinoquinina

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Substâncias utilizadas.....	13
3.2. Parasito.....	14
3.3. Manutenção do cultivo celular.....	15
3.4. Avaliação da citotoxicidade das substâncias.....	15
3.5. Padronização do ensaio com MTT.....	16
3.6. Ensaio leishmanicida in vitro sobre as formas promastigotas.....	16
3.6.1. pelo método de contagem em hemocitômetro.....	16
3.6.2. pelo método colorimétrico do MTT.....	17
3.6.3. pelo método colorimétrico da Resazurina (Alamar Blue®).....	17
3.7. Ensaio leishmanicida in vitro sobre as formas amastigotas intracelulares..	18
3.8. Análise dos dados.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Avaliação da citotoxicidade das substâncias.....	21
4.2. Padronização do ensaio com MTT.....	21
4.3. Ensaio leishmanicida in vitro sobre as formas promastigotas.....	22
4.3.1. pelo método de contagem em hemocitômetro.....	22

4.3.2. comparação entre os tempos de 24 horas e 72 horas das substâncias 7'-O-N,N-dimetiletetilamino cubebina, cubebina, hinoquinina e 6-6'-dinitro-hinoquinina.....	23
4.3.3. avaliação pelo método colorimétrico do MTT.....	26
4.3.4. avaliação pelo método colorimétrico da Resazurina (Alamar Blue®).....	28
4.4. Ensaio leishmanicida in vitro sobre as formas amastigotas intracelulares..	29
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Leishmaniose é uma infecção causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que causa um impacto social e econômico elevado, sendo a segunda maior incidência mundial parasitária, logo após a malária (LAINSON & SHAW, 1978).

A leishmaniose é causada por diferentes espécies de protozoário do gênero *Leishmania* (sub reino: Protozoa, filo: Sarcomastigophora, ordem: Kinetoplastida, família: Trypanosomatidae), sendo transmitida pela picada do inseto conhecido como “flebotomíneo” (ordem: Díptera; família: Psychodidae, sub-família: Phlebotominae), (MAGILL *et al.*, 1993).

É uma doença que ocorre em países de clima tropical e subtropical, produzindo lesões no tegumento (cutânea, cutâneo-mucosa, difusa) ou visceral, sendo responsáveis por alto índice de morbidade e mortalidade humana em muitas áreas do mundo (Pearson *et al.*, 1983). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1984), 12 milhões de pessoas são infectadas e cerca de 350 milhões de pessoas, vivem em áreas de risco em contrair a doença.

Anualmente são registrados de um a dois milhões de novos casos, sendo 1 a 1,5 milhão de pessoas infectadas com leishmaniose cutânea e 500 mil a 1 milhão infectadas com leishmaniose visceral (WHO, 1995).

Baily & Nandy (1994), relataram que as leishmanioses são doenças características de países de terceiro mundo, associadas ao desenvolvimento urbano, desmatamento florestal, mudanças ambientais e migração de grupos humanos para áreas endêmicas.

A subnutrição também tem sido claramente identificada como fator de risco para o aumento da gravidade da doença, principalmente pela debilidade da resposta imune. No Brasil, crianças subnutridas são 9 vezes mais susceptíveis ao desenvolvimento de leishmaniose visceral (DESJEUX, 2004).

O aumento de casos de leishmaniose visceral e da AIDS tem levado a uma nova realidade: co-infecções *leishmania*/HIV. Na Europa, usuários de drogas intravenosas têm sido identificados como principal população de risco. No leste da África e na Índia os relatos do problema são mais relacionados com migrantes, trabalhadores temporários, refugiados, profissionais do sexo e motoristas de

caminhão. Trinta e quatro países ao redor do mundo já possuem relatos de casos de co-infecção. A Organização Mundial de Saúde criou uma rede de vigilância mundial incluindo 28 instituições (DESJEUX, 2004).

Cupolillo *et al.* (2000), relata que as espécies de *Leishmania* são classificadas de acordo com o local onde elas se desenvolvem no inseto vetor. Desta maneira, duas classes especiais são conhecidas: uma que se desenvolve dentro do intestino médio e intestino anterior do inseto, designada como Subgênero *Leishmania*, e outra que tem o estágio de desenvolvimento dentro do intestino posterior, designada como Subgênero *Viannia*.

No Brasil, a Leishmaniose tegumentar é conhecida como “Leishmaniose cutânea”, causada pelas espécies de *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi*, sendo que a espécie *L. braziliensis* também causa a leishmaniose “cutâneo-mucosa”. É também válido ressaltar a importância de *L. amazonensis* na determinação do quadro clínico da leishmaniose difusa (GENARO, 2001).

Em relação ao inseto transmissor (vetor biológico), o gênero *Phlebotomus* é prevalente na Europa, Ásia e África, compreendendo cerca de 500 espécies, sendo 30 identificadas como vetores da leishmaniose. Já no Continente Americano, o gênero *Lutzomyia* é predominante (KILLICK-KENDRICK, 1990; YOUNG & ARIAS, 1992).

As fêmeas são hematófagas, sendo os seus ovos depositados em fezes, cômodos, ruínas urbanas, troncos de árvores ou algum lugar onde as larvas possam obter matéria orgânica, calor e umidade para o seu desenvolvimento.

Transmitida por fêmeas do inseto do gênero *Lutzomyia*, a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* é uma zoonose, que impõe como principal característica patogênica uma infecção que varia de casos benignos, apresentando-se como uma lesão cutânea localizada, a casos onde ocorre desfiguramento facial dos indivíduos infectados, tornando-se uma lesão cutâneo-mucosa que às vezes chega a atingir tecidos mais profundos.

Essa linhagem se caracteriza por alta agressividade ao tecido cutâneo-mucoso, escassez e difícil isolamento dos parasitas nos tecidos e resistência ao tratamento por antimonial, podendo ocorrer freqüentes recidivas da doença. Por complicações relacionadas à destruição cutâneo-mucosa, cinco por cento dos pacientes com lesões evoluem para morte (MARSDEN, 1985).

Todas as espécies do gênero *Leishmania* possuem duas diferentes formas evolutivas em seu ciclo vital, que são as formas promastigotas, de vida extracelular no inseto e formas amastigotas, que se desenvolvem no interior dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados.

O vetor adquire a infecção quando faz o repasto sangüíneo em indivíduos infectados ou em reservatório animal, ingerindo macrófagos repletos de amastigotas em seu interior. No estômago, estas formas amastigotas são liberadas e imediatamente se transformam em formas intermediárias, denominadas de paramastigotas, que se apresentam alongadas e com mobilidade, sendo posteriormente transformadas em formas flageladas, agora denominadas de promastigotas. Após quatro a cinco dias do repasto sangüíneo, as formas promastigotas migram para o esôfago e glândulas salivares do vetor, onde vivem extracelularmente e se multiplicando por divisão binária.

Quando o vetor infectado pelo parasito faz novamente o repasto sangüíneo em outro hospedeiro vertebrado, ele perfura a pele com sua probóscida e, junto com a saliva, que contém substâncias com propriedades anticoagulantes e que reduzem a produção de óxido nítrico produzido pelos macrófagos, ele introduz as formas promastigotas, dando continuidade no seu ciclo vital (MARSELLA & GOPEGUI, 1998).

Basu *et al.* (1991), estudaram proteínas de superfície da membrana de *Leishmania*, entre elas a glicoproteína gp63 e lipofosfoglicanos, verificando que essas proteínas são importantes na interação entre parasita/macrófago, desencadeando assim o processo de fagocitose do parasita e, conseqüentemente, o processo de multiplicação do mesmo no hospedeiro vertebrado.

Todos os órgãos contendo macrófagos e fagócitos quando infectados, especialmente o baço, fígado e medula óssea, estimulam o sistema imune do próprio hospedeiro a atuar contra ele mesmo. Há, portanto, um aumento na expressão de determinados genes, dando ao parasita condição de sobreviver nos fagolisossomos destas células infectadas (CHANG *et al.*, 1990).

As formas amastigotas de *Leishmania* sp. são organismos acidófilos, mantidos no interior dos macrófagos, sendo capaz de resistirem à ação microbicida das hidrólises ácidas, liberando isoenzimas para sobreviver e multiplicar por divisão binária no interior dos macrófagos, até causar a sua lise, sendo então fagocitados novamente por outros macrófagos (Zilberstein & Shapira, 1994). Outra característica

das amastigotas é o elevado nível de glicoesfingolipídios, em sua membrana plasmática.

Erel *et al.* (1999), relataram, que esses mecanismos ainda não estão totalmente elucidados para os organismos vertebrados, mas a reação dos intermediários de nitrogênio e oxigênio parece ter um papel de extrema importância nesse processo de sobrevivência do parasito.

Outro aspecto está relacionado à fase metacíclica das formas promastigotas. Sacks & Perkins (1984), observaram que estas formas são morfologicamente iguais às formas promastigotas em fase procíclicas, sendo impossível diferenciá-las. Acredita-se que a quantidade de diversos fosfoglicanos, lipofosfoglicanos expostos na membrana das formas promastigotas, modificam sua conformação durante a transformação (SACKS & SILVA, 1987; SACKS, 1989; SACKS *et al.*, 1995).

Por outro lado, a infecção pelo parasita está diretamente relacionada à espécie infectante, com a interação dos fatores de virulência e resposta imunológica do hospedeiro. Ainda, a infecção humana é dependente, primariamente, de eventos onde está envolvida a imunidade celular, principalmente aquela relacionada às células T (CASTES *et al.*, 1984; CARVALHO *et al.*, 1985; COUTINHO *et al.*, 1987; CONCEIÇÃO *et al.*, 1990; DA-CRUZ *et al.*, 1994; COUTINHO *et al.*, 1996; COUTINHO *et al.*, 1996).

Nesse sentido, Sjolander *et al.* (1998), relataram que o controle da infecção está relacionado com a geração de células T-helper, que são capazes de recrutar macrófagos e promover a liberação de citocinas (interferon- γ , interleucina-2 e, em menor quantidade, interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-1), sendo esse um dos principais alvos para o controle terapêutico do parasita.

Com o intuito de encontrar novas substâncias ou medicamentos de menor toxicidade e de custos inferiores, que poderiam ser utilizados nos tratamentos de casos de infecção e, principalmente em situações de resistência parasitária, muitos autores vêm averiguando a possibilidade de utilização de substâncias de origem natural, tanto animal como vegetal, e substâncias sintéticas, sobre as diversas formas da família Trypanosomatidae.

Em relação à busca recente de novos produtos quimioterápicos, (Giorgio *et al.*, 1998) verificaram, que macrófagos infectados com *L. amazonensis*, quando tratados com ribonucleosídeos, expressaram resultados positivos em relação ao grupo controle. O ribonucleosídeo 7-hydro-8-oxo-guanosina (8-OxoGuo) em

concentrações 0,15 mg/mL, causou uma redução na porcentagem de macrófagos infectados por amastigotas.

A síntese e avaliação de dinitroanilinas, bem como a verificação de atividade do albendazol sobre *L. infantum*, foi relatada por Armson *et al.* (1999), onde os autores avaliaram, comparativamente, as atividades dos compostos mediante a verificação da incorporação de [³H] timidina pelas formas amastigotas e promastigotas, aventando assim a hipótese de que a tubulina do parasita, possa ser um dos caminhos para o descobrimento de novas substâncias para o tratamento da leishmaniose.

Em relação a produtos provenientes de animais, Ramos *et al.* (2000) relatam a eficácia de veneno de serpente irradiado sobre as formas promastigotas de *Leishmania*. Os autores constataram uma excelente eficácia desse tipo de composto, uma vez que o IC₉₀ encontrado foi de 95 ng/mL, sendo o mesmo considerado insignificante quando comparado ao DL₅₀ que foi de 0,5 mg/kg.

Fournet *et al.* (1992), observaram camundongos tratados com derivados naftoquinonas, o plumbagim, isolado da espécie vegetal boliviana *Pera benesis*, onde, camundongos tratados com 2,5mg/Kg/dia da substância, desenvolveram lesões semelhantes àqueles tratados com glucantime. Por outro lado, elevadas concentrações de plumbagim não aumentaram a atividade contra *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*, mas sim, produziram efeitos tóxicos, como necrose no sítio de inoculação do tratamento e perda de peso durante as cinco primeiras semanas. Os mesmos autores relataram que a casca de *Pera benesis* é eficiente para a cura de lesões cutâneas, causadas por *L. braziliensis*.

A avaliação de extratos isolados da planta *Ampelocera edentula*, em estudos *in vitro* em cinco diferentes espécies de *Leishmania* (formas promastigotas) e cinco diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* (forma epimastigota) mostraram que após 48 horas de incubação, os valores de IC₉₀ obtidos foram extremamente baixos quando comparados àqueles obtidos da avaliação de Nifurtimox e benzonidazol, que não demonstraram qualquer atividade inibitória sobre a multiplicação dos parasitas em concentração abaixo de 25µg/ml. Estudos *in vivo* mostraram que camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* desenvolveram lesões de tamanho similares àqueles tratados com glucantime, após quatro semanas de tratamento (FOURNET *et al.*, 1994).

Kaiser *et al.* (2000) estudaram uma série de derivados de naftoquinonas monoméricas e diméricas, sobre as formas promastigotas de diversas espécies de *Leishmania*, encontrando uma grande variabilidade de atividades entre as mesmas.

Atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de 2-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4naphthoquinone (Lapachol), contra *L. braziliensis* demonstraram diferenças de níveis de atividade biológica em ambos os sistemas biológicos. Assim mostrando uma importante atividade *in vitro* contra o parasita, o lapachol não protegeu os animais infectados em ensaios realizados *in vivo*. (TEIXEIRA *et al.*, 2001)

Em estudos comparativos entre duas cepas de *Leishmania*, uma resistente ao cetoconazol (*L. braziliensis*) e outra extremamente suscetível (*L. mexicana*), Rangel *et al.* (1996) verificaram que a falta de atividade sobre *L. braziliensis* era devido às diferenças bioquímicas existentes entre as diferentes espécies, principalmente relacionadas aos diferentes tipos de esteróis, presentes na membrana plasmática do parasito. Anteriormente, Ryder & Mieth (1992), relataram que as formas promastigotas do parasita eram suscetíveis; quando tratadas com combinação de azóis e terbinafina, bloqueiam a biossíntese de esterol. Esses estudos corroboram o mesmo efeito sinérgico dessas substâncias também em *Trypanosoma cruzi* (URBINA *et al.*, 1988; MALDONADO *et al.*, 1993; URBINA *et al.*, 1993; URBINA *et al.*, 1995, URBINA *et al.*, 1996).

Na busca de outras alternativas no tratamento da leishmaniose, Santos *et al.* (1997) avaliaram o potencial leishmanicida de uma espécie de *Plumbago* (*Plumbago scandens*), nativo do Brasil, em promastigotas de *L. amazonensis*. Os estudos mostraram que o extrato etanólico do caule de *P. scandens* possui uma acentuada ação inibitória sobre o parasita, não somente sobre as formas promastigotas, mas também sobre as formas amastigotas. Outro relato importante, de acordo com o autor, é que esse extrato inibe potentemente a forma do parasita presente no vetor, indicando um potencial profilático para caso de incursões às áreas endêmicas.

A mefloquina é uma droga de administração oral, com comprovada eficácia na malária e efeitos colaterais pouco freqüentes (Kaltrarine *et al.*, 1993). No Equador, Gomes *et al.* (1995), trataram 16 pacientes com mefloquina, obtendo 100% de cura antes de 6 semanas. O sucesso relatado pode ser explicado pelo fato dos pacientes estarem infectados com *L. panamensis*, que sabidamente responde melhor ao tratamento, em relação a *L. braziliensis*.

Atividades da mefloquina, em pessoas com leishmaniose cutânea em área endêmica de *L. braziliensis*, foram descritas por Victor *et al.* (1999), e relataram que não obtiveram o mesmo sucesso de Gomes *et al.* (1995).

Najim *et al.* (1998), observaram que, o sulfato de zinco inibe o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania major* e *Leishmania tropica*, e que em camundongos infectados com leishmaniose cutânea, quando administrado oralmente, é eficiente no tratamento e profilaxia da infecção.

O sulfato de aminosidina é um aminoglicosídeo com atividade leishmanicida, e tem sido utilizado nas diversas formas de leishmaniose, com eficácia variável (NEAL, 1968; SOTO *et al.*, 1994; THAKUR *et al.*, 1995; CORREIA *et al.*, 1996).

Recentemente Machado *et al.* (2007) analisaram amostras de extratos de própolis coletados no Brasil e na Bulgária sobre quatro espécies de *Leishmania* – *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* do Novo Mundo e *L. major* do Velho Mundo - associado a diferentes formas clínicas de leishmaniose. Considerando as diferenças químicas entre os extratos e o comportamento dos parasitas, foram observadas diferenças significantes nas atividades leishmanicidas com valores de IC50 de 2.8 a 229.3µg/mL. Uma análise global mostrou que para todas as espécies avaliadas, extratos búlgaros eram mais ativos que o extrato etanólico brasileiro. Como os extratos de própolis analisados tinham a composição química determinada, investigações adicionais podem ser feitas para verificar o efeito de componentes individuais ou de combinações deles em cada espécie de *Leishmania*.

Em trabalho realizado por Ueda-Nakamura *et al.* (2006) demonstrou-se a atividade do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e de seu componente principal, o eugenol. O eugenol inibiu progressivamente o crescimento de *L. amazonensis* em concentrações que variaram de 100 a 1000µg/mL. O IC50 do óleo essencial para promastigotas e amastigotas foi respectivamente 135 e 100µg/mL e o IC50 do eugenol foi de 80µg/mL para formas promastigotas. Os resultados obtidos sugeriram que o óleo essencial de *O. gratissimum* e seus compostos podem ser usados como fontes para novas drogas antileishmania.

Atualmente estão sendo desenvolvidas terapêuticas novas, como o uso de transportadores de drogas que agem especificamente na localização do parasita, assim reduzindo os efeitos adversos da droga; uso de drogas imunomoduladoras; avaliação de produtos naturais; estudo farmacocinético e combinações de drogas. Recentes tentativas clínicas com paramomicina e miltefosine tiveram êxito e estas

drogas parecem ser promessas para a terapia futura de leishmaniose visceral (LOISEAU & BORIES, 1999).

Mussi *et al.* (2007) avaliaram experimentalmente a atividade de duas formulações tópicas de fluconazol e paramomicina em ratos BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) major* ou *L. (L.) amazonensis*. A eficácia da paramomicina foi significativamente maior que a observada para o fluconazol para ambas as espécies de *Leishmania*. Os resultados sugeriram que a formulação da paramomicina pode ser satisfatória para estudos clínicos e pode representar uma alternativa para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea.

Dentre os vários compostos que recentemente apresentaram propriedades biológicas úteis, optamos por avaliar neste trabalho derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas que apresentam significativa ação tripanocida. Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou um grupo de lignanas biologicamente ativas, isoladas das folhas da planta *Zanthoxylum naranjillo* (Rutacea), popularmente denominada “mamica-de-cadela”, na qual são encontradas duas lignanas biologicamente ativas: a cubebina e o metilpluviatolido. Ensaios farmacológicos demonstraram que a cubebina possui discreta atividade tripanocida e elevada atividade antiinflamatória (Bastos *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2001), enquanto que o metilpluviatolido apresenta elevada atividade sobre *Trypanosoma cruzi* (Bastos *et al.*, 1999).

Em ensaios biológicos *in vitro*, sobre as formas tripomastigotas sangüíneas de duas diferentes cepas de *T. cruzi*, o metilpluviatolido foi capaz de determinar uma lise parasitária de 100%, não sendo observadas alterações morfológicas nos elementos figurados do sangue (BASTOS *et al.*, 1999).

Recentemente, Rodrigues (2002) avaliou a toxicidade aguda e crônica de cubebina, onde constatou por meio de vários parâmetros bioquímicos e por parâmetros histopatológicos a segurança de utilização dessa classe de substâncias na terapêutica de patologias.

Além disso, o produto de redução da cubebina gera um derivado que possui elevada atividade tripanocida, a hinoquinina, atividade essa comprovada *in vitro* por nosso grupo de pesquisa, sobre todas as formas do parasito, inclusive sobre as formas intracelulares.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar a atividade de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas sobre diferentes formas de *Leishmania amazonensis*, em ensaios a serem realizados *in vitro* sobre as formas promastigotas e amastigotas do parasito.

Além disso, também será avaliada a citotoxicidade *in vitro* dos mesmos derivados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substâncias utilizadas

No presente estudo foram utilizados, inicialmente, os seguintes agentes terapêuticos:

(1) 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina (Figura 1), **(3)** cubebina (Figura 2), **(D)** 6-6'-dinitro-hinoquinina (Figura 3) e **(H)** hinoquinina (Figura 4)

Figura 1: Estrutura da 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina

Figura 2: Estrutura da cubebina

Figura 3: Estrutura da 6-6'-dinitro-hinoquinina

Figura 4: Estrutura da hinoquinina

3.2. Parasito

Uma cepa de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, isolada de um caso humano atendido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto vem sendo mantida em nosso laboratório, por meio de repiques em camundongos Balb/C, assim como em meio de cultura axênica semanalmente.

O meio de cultura utilizado é o meio 199 (LGC) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina, sendo a cultura mantida em estufa a 22 °C.

3.3. Manutenção do cultivo celular

As células da linhagem LLMCK2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab), penicilina G (25 UI/mL), estreptomicina (25 µg/mL) e ciprofloxacina (10 µg/mL). Essa linhagem celular foi utilizada, para avaliação da toxicidade das substâncias em estudo.

Os cultivos foram mantidos a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade relativa de 70%, sendo o meio renovado a cada três dias, assim como parte das células removidas uma vez por semana.

3.4. Avaliação da citotoxicidade das substâncias

A ação citotóxica das substâncias foi avaliada pelo método de MTT, o qual é utilizado para avaliar *in vitro* a atividade metabólica ou viabilidade de células de cultura. O método é baseado na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] a formazam (SIEUWERTS et al., 1995).

Em microplacas de 96 poços, células da linhagem LLMCK2 (5x10⁵ células/poço) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab), 25 UI/mL penicilina, 25 µg/mL estreptomicina e 10 µg/mL ciprofloxacina. As substâncias foram adicionadas nas concentrações de 0,5; 2; 8; 32 e 128 µM e a placa incubada por 24 h em estufa de 5% de CO₂ a 37°C.

Após este período as células foram incubadas com MTT (5 mg/mL) por 4h, onde então foi adicionado 100 µL de isopropanol-ácido. A placa foi mantida a temperatura ambiente até que os cristais formados fossem dissolvidos e a leitura realizada em espectrofotômetro (Tecan) a 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Como controle positivo utilizamos 10 µL de Triton X-100 20% e, como controle negativo solução fisiológica com 1,0% de dimetilsulfóxido (DMSO).

A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela a seguinte fórmula:

$$\% \text{ citotocixidade} = 100 - \{[(Y-CP)/(CN-CP)] * 100\}$$

onde: Y= leitura da densidade óptica dos poços com células e diferentes concentrações das substâncias; CN= leitura da densidade óptica dos poços com células; CP= leitura da densidade óptica dos poços com células e Triton X-100.

A dose citotóxica para 50% das células (IC_{50}) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal.

3.5. Padronização do ensaio com MTT

Para a escolha do inóculo inicial de *L. amazonensis* e da concentração do MTT foram utilizados inóculos de $5,0 \times 10^4$, $5,0 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^6$ parasitas por mL. As formas promastigotas foram então colocadas em placas de 96 poços, sendo um volume de 100 μ L por poço e incubadas por 24 horas a 22 °C. Após o tempo de incubação, foram adicionados 10 μ L de cada diluição do MTT (1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL, separadamente), sendo as placas incubadas novamente por 4 horas. Após o intervalo de tempo, 90 μ L de isopropanol foram adicionados para que os cristais de formazan se dissolvessem e a leitura foi realizada após 1 hora de repouso do material em temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram obtidos em leitor de microplacas Sunrise Tecan no comprimento de onda 570 nm e referência 620 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6. Ensaio leishmanicida in vitro sobre as formas promastigotas

3.6.1. pelo método de contagem em hemocitômetro

Primeiramente, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas a 22 °C, em meio 199 (LGC) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina.

As formas promastigotas (1×10^7 /mL), obtidas do cultivo em fase logarítmica foram colocadas em placas de 24 poços, a 22° C, onde as várias concentrações das substâncias (0,5, 2, 8, 32 μ M) foram adicionadas, sendo as amostras avaliadas após 24 e 72 horas. Após cada período, 10 μ L do material incubado foi retirado e a avaliação da atividade foi feita por contagem dos parasitos em hemocitômetro, com

a finalidade de validação pela verificação das formas sobreviventes à ação das substâncias.

Como controles foram utilizados apenas o meio de cultura sem parasitas (controle positivo) e o DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias (controle negativo).

3.6.2. pelo método colorimétrico do MTT

Primeiramente formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas a 22 °C, em meio 199 (LGC) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina.

As formas promastigotas (1×10^7 /mL) obtidas do cultivo em fase logarítmica foram colocadas em placas de 96 poços a 22° C, onde as várias concentrações das substâncias (0,5, 2, 8, 32µM) foram adicionadas, sendo as amostras avaliadas após 24 e 72 horas. Após cada período, a avaliação da atividade foi realizada pela técnica colorimétrica de oxidação do MTT. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula, para a técnica de oxidação por MTT:

$$\%AE = \{1 - [(AE - CP)/(CN - CP)]\} \times 100 \text{ onde:}$$

AE = absorbância dos poços tratados;

CP= absorbância dos poços contendo meio de cultura;

CN=absorbância dos poços contendo controle negativo.

A leitura da placa foi feita como descrito anteriormente para a padronização (leitor de microplacas Sunrise Tecan). Como controles foram utilizados apenas o meio de cultura sem parasitas (controle positivo) e o DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias (controle negativo).

3.6.3. pelo método colorimétrico da Resazurina (Alamar Blue)

O ensaio foi realizado também com formas promastigotas de *L. amazonensis* que foram cultivadas a 22 °C, em meio 199 (LGC) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina.

As formas promastigotas (1×10^7 /mL), obtidas do cultivo em fase estacionária foram colocadas em placas de 96 poços a 22° C, onde as várias concentrações das substâncias (0,5, 2, 8, 32 e 128 μ M) foram adicionadas, sendo as amostras avaliadas após 24 horas. Após esse período, 100 μ L do material incubado foram retirados e adicionados 20 μ L da solução de resazurina (3mM), sendo a placa incubada por 5 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a mesma fórmula empregada para o MTT.

Os valores de absorbância e os controles utilizados foram os mesmos descritos para a técnica do MTT.

3.7. Ensaio leishmanicida in vitro sobre as formas amastigotas intracelulares

Os ensaios foram realizados de acordo com Muelas et al. (2002). Em microplacas de 24 poços contendo lamínulas arredondadas, células da linhagem LLMCK2 (5×10^5 células/poço) foram cultivadas com meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado por 24h, a 37°C em ambiente a 5% de CO₂ e umidade de 95%. Formas promastigotas, obtidas do cultivo axênico foram adicionadas na proporção de 10:1 e incubadas por 4 horas. Após este período, os poços foram lavados com RPMI para retirar os promastigotas restantes e as substâncias em análise foram adicionadas nas concentrações de 0,5, 2, 8 e 32 μ M. Setenta e duas horas depois, o sobrenadante foi retirado e as células contidas nas lamínulas foram fixadas em metanol por 10 minutos e coradas em Giemsa tamponado, pH= 7,2. A porcentagem de amastigotas contidas nas células (n° A/100 células) foi estimada por microscopia. A atividade anti-amastigotas intracelulares (%AA) foi expressa como:

$$\%AA = [1 - (\text{n° A/100 células tratadas}) / (\text{n° A/100 células controles})] \times 100$$

Como controle negativo utilizamos a mesma proporção de solvente (DMSO) e como controle positivo, o meio RPMI 1640 (Sigma) puro. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8. Análise dos dados

Para análise dos resultados deste trabalho, assim como para os cálculos matemáticos envolvidos nos estudos, foi utilizado o programa GraphPad Prism 4.02 Updater. A partir do programa foram construídas as curvas sigmoidais dose-resposta, onde foram calculados os valores de IC_{50} , a porcentagem de lise e o desvio padrão dos valores obtidos pela atividade das substâncias sobre *L. amazonensis*.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da citotoxicidade das substâncias

De acordo com a análise dos valores de absorbância encontrados, as porcentagens de lise celular foram muito baixas ou iguais a zero para as concentrações utilizadas. Sendo assim, as substâncias **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, **(3)** cubebina, **(H)** hinoquinina e **(D)** 6-6'-dinitro-hinoquinina não demonstraram ação citotóxica sobre as células da linhagem LLCMK2. Dessa forma, com as concentrações das substâncias empregadas para tal avaliação, não foi possível calcular os valores de IC₅₀.

4.2. Padronização do ensaio com MTT

Uma diferença significativa na absorbância foi detectada, analisando-se diferentes concentrações de MTT (1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL) e o número de promastigotas por mL (5×10^4 , 5×10^5 e 5×10^6). Pode-se observar na Figura 5 que os maiores valores de absorbância ocorreram com o inóculo de 5×10^6 parasitas/mL, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL, sendo que nessas duas concentrações a absorbância foi praticamente a mesma, não havendo diferença estatisticamente significativa para este ponto das curvas.

Figura 5: Correlação entre os valores de absorbância, número de promastigotas por mL e diferentes concentrações de MTT após 4 horas de incubação.

4.3. Ensaio leishmanicida *in vitro* sobre as formas promastigotas

4.3.1. pelo método de contagem em hemocitômetro

Os valores obtidos pela contagem em hemocitômetro foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.02 Updater e os resultados estão apresentados nas Figuras 6 e 7 e na Tabela 1:

Figura 6: Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em 24 horas.

Figura 7: Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em 72 horas.

Os gráficos acima (Figuras 6 e 7) demonstram os resultados obtidos para as substâncias **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, **(3)** cubebina, **(D)** 6-6'-dinitro-hinoquinina e **(H)** hinoquinina pela contagem microscópica.

Por meio do gráfico da porcentagem de lise em função das concentrações das substâncias, foi possível calcular os valores de IC₅₀ das mesmas, verificando se houve ou não efeito da substância sobre o parasita.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de IC₅₀, calculados a partir dos dados obtidos para cada concentração e plotados nos gráficos acima.

Observou-se que após o período de 24 horas de incubação apenas a substância **(1)** apresentou atividade significativa sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando valor de IC₅₀ inferior a 32 µM. Após 72 horas de incubação verificamos que as substâncias avaliadas **(1)**, **(3)** e **(H)** apresentaram elevado potencial leishmanicida para essa forma do parasito, onde se destacou a substância **(3)** com valor de IC₅₀ igual a 3,6µM, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ e da porcentagem de lise e desvio padrão em função da concentração (µM) das substâncias analisadas na contagem microscópica.

Substância	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
	24 horas	72 horas
(1) 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina	26,18	19,41
(3) cubebina	315,4	3,579
(H) hinoquinina	34,03	15,55
(D) 6-6'-dinitro-hinoquinina	45,05	20938

4.3.2. comparação entre os tempos de 24 horas e 72 horas das substâncias 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, cubebina, hinoquinina e 6-6'-dinitro-hinoquinina

Os valores obtidos pela contagem em hemocitômetro foram analisados pelo programa GraphPad Prism 4.02 Updater e os resultados apresentados nas Figuras 8, 9, 10 e 11.

Figura 8: Comparação entre a atividade da 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Figura 9: Comparação entre a atividade da cubebina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Figura 10: Comparação entre a atividade da 6-6'-dinitro-hinoquinina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Figura 11: Comparação entre a atividade da hinoquinina nos tempos de 24 e 72 horas sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Os gráficos representados nas Figuras 8, 9 10 e 11 demonstram os resultados obtidos do número de parasitas em função da concentração e do tempo das substâncias avaliadas **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, **(3)** cubebina, **(D)** 6-6'-dinitro-hinoquinina e **(H)** hinoquinina.

Pelo observado na Figura 11 verificamos que tanto após o tempo de 24 horas como após 72 horas o padrão de redução do número de formas promastigotas se mantém constante. Sendo assim, o valor referente ao IC₅₀ para 72 horas deveria ser próximo àquele obtido para 24 horas. Esse fato não foi visualizado em virtude de que a variabilidade dos resultados de lise celular para as concentrações de 0,5; 2,0 e 8,0 µM serem mínimas, o que determina uma pequena inclinação na curva da regressão não linear, utilizada para o cálculo de IC₅₀ (Figura 7)

4.3.3. avaliação pelo método colorimétrico do MTT

Após a validação da metodologia e definição dos valores ótimos de concentração de parasitas e do MTT, foram realizados os ensaios com as substâncias propostas utilizando a metodologia que emprega o agente cromóforo.

Os valores de absorbância obtidos no ensaio com MTT foram analisados utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism 4.02 Updater e os resultados apresentados nas Figuras 12 e 13, assim como na Tabela 2:

Figura 12: Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas no ensaio colorimétrico com MTT sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em 24 horas.

Figura 13: Curva dose-resposta em função da concentração das substâncias avaliadas no ensaio colorimétrico com MTT sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em 72 horas.

As Figuras 12 e 13 demonstram os resultados obtidos com as substâncias **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, **(3)** cubebina, **(D)** 6-6'-dinitro-hinoquinina e **(H)** hinoquinina pelo método colorimétrico do MTT.

Por meio do gráfico da porcentagem de lise em função das concentrações das substâncias, houve a tentativa de calcular os valores de IC_{50} das mesmas, verificando se houve efeito ou não da substância sobre o parasita.

Na Tabela 2 estão demonstrados os valores de IC_{50} , calculados a partir dos dados obtidos para cada concentração e plotados nos gráficos acima.

Tabela 2: Valores de IC_{50} e da porcentagem de lise e desvio padrão em função da concentração (μM) das substâncias analisadas no ensaio com MTT em 24 e 72 horas.

Substância	IC_{50} (μM)	
	24 horas	72 horas
(1) 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina	0,06180	0,1232
(3) cubebina	0,04920	0,2313
(H) hinoquinina	0,0	150043
(D) 6-6'-dinitro-hinoquinina	0,0	não calculado

Pelo observado nas Figuras 12 e 13 e pela Tabela 2 observamos uma grande variabilidade entre valores de IC_{50} obtidos nos métodos quantitativo manual e quantitativo colorimétrico. É possível observar uma nítida incoerência de resultados para o método colorimétrico (MTT) que demonstra uma total ausência de reprodutibilidade de resultados entre os diferentes métodos utilizados. Nesse caso de avaliação por oxidação do MTT visualiza-se uma baixa inclinação ascendente ou declínio das curvas dose-resposta.

Esses resultados persistiram por diversos ensaios realizados demonstrando total ineficácia desse método colorimétrico para essa classe de substância.

4.3.4. avaliação pelo método colorimétrico da Resazurina (Alamar Blue®)

Os valores de absorbância obtidos nos ensaios sobre formas promastigotas para o ensaio com Resazurina foram analisados também pelo programa GraphPad Prism 4.02 Updater e os resultados apresentados na Figura 14 e na Tabela 4:

Figura 14: Curva dose-resposta dos parasitas em função da concentração das substâncias hinoquinina e 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina no ensaio colorimétrico com Resazurina sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em 24 horas.

A Figura 14 demonstra os resultados obtidos com as substâncias **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina e **(H)** hinoquinina pelo método colorimétrico da Resazurina.

Podemos verificar que por meio da porcentagem de lise em função das concentrações das substâncias houve um comportamento semelhante àquele observado para as avaliações utilizando-se o MTT. Assim o cálculo dos valores de IC_{50} não foi efetuado para as substâncias, pois o comportamento apresentado mostra um efeito inversamente proporcional ao esperado, ou seja, uma curva dose-resposta descendente, característica de efeitos de crescimento parasitário.

4.4. Ensaio leishmanicida *in vitro* sobre as formas amastigotas intracelulares

Os derivados de lignanas também foram avaliados sobre formas promastigotas pelo método quantitativo manual. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 15.

Figura 15: Comparação entre as diferentes concentrações das substâncias avaliadas sobre as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* no tempo de 72 horas.

De acordo com o gráfico (Figura 15), podemos observar que a porcentagem de células infectadas em todas as concentrações aumentou em relação ao controle. Dessa forma, as substâncias avaliadas não apresentaram atividade sobre as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Doenças causadas por protozoários parasitas são um problema de saúde global sério, especialmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Silva et al. 2007).

A Leishmaniose é uma parasitose causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem por insetos flebotômíneos e atualmente endêmica em 88 países (Murray et al. 2005). Todas as espécies de *Leishmania* são obrigatoriamente parasitas intracelulares, desta forma, o parasita é capaz de se multiplicar, lizar as células do hospedeiro e infectar macrófagos adjacentes (Ayres et al., 2007).

Leishmania amazonensis, parasita que foi utilizado no trabalho, provoca lesões cutâneas simples e em baixa porcentagem de indivíduos infectados há evolução para a leishmaniose cutâneo difusa, estando presente principalmente na região Amazônica.

Os compostos antimoniais pentavalentes, glucantime e pentamidina, são as drogas utilizadas na terapia das leishmanioses há mais de 40 anos, sendo o glucantime a droga utilizada no Brasil. Estes compostos são hepatotóxicos, nefrotóxicos, afetam a função cardíaca e podem causar resistência, como têm sido publicado recentemente na literatura (AYRES et al., 2007).

Fármacos como a anfotericina B conjugada a lipossomos também é utilizada como terapia de segunda linha, mas o alto custo e a toxicidade destas substâncias inibem o seu uso em grande escala. Estes efeitos são bastante comuns e tem justificado a pesquisa de novos fármacos contra a leishmaniose (AYRES et al., 2007).

O *screening* de novas substâncias tem envolvido principalmente a contagem microscópica, um processo trabalhoso, que requer tempo e é altamente dependente do observador. Alguns ensaios colorimétricos para avaliação de atividade tripanocida contra epimastigotas, como o uso do MTT (Muelas-Serrano et al. 2000), tem sido relatados e demonstram maior precisão em relação à contagem microscópica (RÓLON et al., 2006).

O ensaio do MTT é baseado na redução do MTT a formazan, é extremamente utilizado para medição *in vitro* de atividade metabólica ou viabilidade de culturas

celulares (Sieuwerts *et al.*, 1995). Este ensaio colorimétrico tem sido usado com células de mamíferos e alguns protozoários, como promastigotas de *Leishmania* (Estevez *et al.*, 2007), tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Souza *et al.*, 2004), tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* (Ellis *et al.*, 1993), *Entamoeba histolytica* (Cedilho-Riviera *et al.*, 1992), trofozoítas de *Giardia duodenalis* (Bénéré *et al.* 2007), *Tetrahymena pyriformes* (DIAS *et al.*, 1999).

Para o ensaio com MTT alguns parâmetros devem ser estabelecidos, como a concentração ótima do MTT, o inóculo do parasita e o tempo de incubação. Foi realizada nesse trabalho uma padronização para o ensaio com o MTT, onde foram utilizadas três concentrações (1,0, 2,5 e 5,0 mg/mL) e três inóculos diferentes do parasita (5×10^4 , 5×10^5 e 5×10^6 parasitas/mL), sendo o tempo de incubação de 4 horas, como descrito por Muelas-Serrano *et al.* (2000).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que os inóculos com número menor de parasitas (5×10^4 e 5×10^5) e a concentração de 1,0 mg/mL de MTT apresentaram uma absorbância baixa. Nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/mL os valores de absorbância foram mais elevados e praticamente iguais para o inóculo de 5×10^6 , sugerindo-se que ambos possam ser usados como concentração padrão. O tempo de incubação foi de 4 horas, baseando-se em trabalhos já publicados (Muelas-Serrano *et al.* 2000).

Outra forma de ensaio colorimétrico bastante empregado é o uso da Resazurina. Ela pode ser utilizada como um método simples e quantitativo de medida para proliferação celular, viabilidade e citotoxicidade.

A Resazurina é uma substância não-tóxica, solúvel em água e que muda de cor devido à atividade celular, de azul não fluorescente para rosa fluorescente e tem correlação direta entre a sua redução no meio e a proliferação dos organismos vivos (Rólon *et al.* 2006). O mecanismo das reações químicas ou enzimáticas da redução da resazurina, quando adicionado a células viáveis, não é conhecido.

Neste trabalho também foi usado a Resazurina como método de ensaio colorimétrico, o qual já foi usado em vários trabalhos como apresentado por Bénéré *et al.* (2007), Rolón *et al.* (2006), Pettit *et al.* (2005) e O'Brien *et al.* (2000). A padronização desse método ainda será realizada, como descrito anteriormente para o MTT.

Para avaliar se realmente o uso do MTT e da Resazurina podem substituir a contagem microscópica no *screening* de drogas, também foi realizada a

determinação da atividade biológica sobre as formas promastigotas do parasita por meio da contagem celular, observando-se divergência de valores de porcentagem de lise parasitária obtidos após a utilização dos diferentes métodos (Figuras 12, 13 e 14).

Aqui foram testados derivados da cubebina e da hinoquinina (lignanas dibenzilbutirolactônicas) que apresentam significativa ação tripanocida. A cubebina possui discreta atividade tripanocida e elevada atividade antiinflamatória (Bastos *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2001) e o produto de sua redução, a hinoquinina, tem atividade sobre todas as formas do parasito, inclusive intracelulares.

A avaliação pelo método quantitativo realizado pela contagem microscópica das formas promastigotas demonstraram potencial leishmanicida para as substâncias **(1)**, **(3)** e **(D)**, onde foi verificada uma redução aproximada do número de parasitos, em relação ao grupo controle, de 62%, 74% e 68%, respectivamente, após um período de 72 horas de incubação.

As mesmas substâncias avaliadas pelos métodos de ensaios colorimétricos, apresentaram um comportamento totalmente diferenciados em relação ao método por contagem microscópica. Nesses casos ocorreu uma variabilidade muito grande entre os resultados obtidos para os diferentes ensaios realizados.

Pelo método colorimétrico utilizando-se o MTT observamos que apenas a hinoquinina **(H)** e seu derivado químico **(D)** demonstraram uma pequena atividade biológica. Entretanto, os valores observados foram totalmente diferentes da avaliação por contagem microscópica das formas promastigotas.

Contrariamente, a cubebina **(3)** e seu derivado **(1)** apresentaram comportamento típico de crescimento celular, ou seja, curva dose-resposta descendente, resultados esses que se repetiram por diversas avaliações biológicas realizadas.

Situação semelhante pode ser verificada pelo método da Resazurina onde as substâncias apresentaram comportamento bastante semelhante ao demonstrado pelo método do MTT, ou seja, apresentaram comportamento diferenciado em relação ao método de contagem microscópica.

Quando observamos os resultados obtidos para a padronização dos métodos, onde estavam envolvidas apenas diferentes concentrações de formas promastigotas e diferentes concentrações dos agentes colorimétricos, verificamos que a viabilidade

da realização dos por essas metodologias ensaios era extremamente grande, onde os resultados obtidos coincidiam com aqueles apresentados pela literatura.

Entretanto, a partir do momento em que adicionamos as substâncias ao meio reacional os dados de absorbância obtidos passaram a ser inconsistentes, não refletindo uma reação entre os agentes cromóforos (corantes) e os seus substratos (parasitos viáveis).

Sendo assim, como hipótese da situação ocorrida de ineficácia na realização dos ensaios com metodologias já consagradas na literatura, aventamos a possibilidade de estar ocorrendo uma interferência direta dessa classe de substância no processo de redução dos agentes cromóforos.

Em vasta procura na literatura não encontramos nenhuma situação semelhante a esta aqui encontrada, onde alguma substância pode influenciar diretamente na natureza cinética do ensaio biológico colorimétrico.

Esse é um fato que deve ser investigado de uma maneira mais significativa, na tentativa de elucidação do nível de interferência.

Em relação aos resultados referentes à avaliação biológica sobre as formas amastigotas intracelulares, os resultados indicam claramente a ausência de atividade biológica sobre essa forma do parasito.

Diferentemente do ocorrido para *T.cruzi* os derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas não apresentaram a mesma eficácia nas avaliações *in vitro*. Pelos resultados apresentados por Saraiva e colaboradores (2007) algumas das substâncias aqui avaliadas demonstraram significativa atividade sobre o agente etiológico da doença de Chagas, tanto no desenvolvimento *in vitro* do parasito, como *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A avaliação *in vitro* realizada sobre as formas promastigotas do parasito demonstraram potencial leishmanicida para as substâncias **(1)** 7'-O-N,N-dimetiletilamino cubebina, **(3)** cubebina e **(D)** 6-6'-dinitro-hinoquinina após o período de 72 horas;

2. Os métodos colorimétricos utilizados, MTT e Resazurina (Alamar Blue[®]), não foram correspondentes ao método de contagem microscópica. Foi observada uma grande variabilidade entre os resultados obtidos nos diferentes ensaios, desse modo, mostrando-se ineficazes para essa classe de substâncias;

3. A avaliação *in vitro* realizada sobre as formas amastigotas intracelulares mostraram claramente a ausência de atividade biológica das substâncias avaliadas sobre essa forma do parasito.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ARMSON, A.; KAMAU, S.W.; GRIMM, F; REYNOLDSON, J.A.; BEST, W.M.; MacDONALD, L.M.; THOMPSON, R.C.A. The comparison of effects of a benzimidazole and the dinitronitriles against *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 73, p. 303-11.Oct. 1999.

AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p. 215-20. May. 2007

BAILY, G.G.; NANDY, A. *Visceral leishmaniasis*: more prevalent and more problematic. **Journal of Infection**, London, v. 29, n.1, p. 241-47. Nov.1994.

BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta medica**, Germany, v. 65, n. 6, p. 541-44. Aug. 1999.

BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T.; SOUZA, G.H.B.; PEDRAZZI, A.H.P.; SARTI, S.J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum Naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 279–82. May. 2001.

BASU, N.; SETT, R.; DAS, P.K. Down-regulation of mannose receptors on macrophages after infection with *Leishmania donovani*. **Biochemical Journal**, London, v. 277 (Pt 2), p. 451-56. Jul. 1991.

BÉNÉRÉ, E.; da LUZ, R.A.I.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L. A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 101-6. Nov. 2007.

CEDILHO-RIVERA, R.; RAMIREZ, A.; MUNÓZ, O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. **Archives of Medical Research**, United States, v. 23, p. 59-61. 1992.

CARVALHO, E.M; JOHNSON, W.D; BARRETO, E; MARSDEN, P.D; COSTA, J.L.M; REED, S; ROCHA, H. Cell mediated immunity in american cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 135, n. 6, p. 4144-48. Dec. 1985.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; RONDON, A.J. Mechanisms associated with immunoregulation in human american cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 279-86. Aug. 1984.

CHANG, K.P.; CHAUDURI, G.; FOND, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 499-529. 1990.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R.C.C.; PRIMEZ, C.; SCHUBACH, A.; COUTINHO, S.G. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 221-26. Feb. 1990.

CORREIA, D.; MACÊDO, V.O.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; MAGALHÃES, A.V.; ABREU, M.V.A.; ORGE, M.G.O.; MARSDEN, P.D. Estudo comparativos entre antimoniato de meglumina, isotionato de pentamidina e sulfato de aminosidine, no tratamento de lesões primárias causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 29, p. 447-53. 1996.

COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M.; OLIVEIRA, M.P.; MENDONÇA, S.C.F.; BERTHO, A.L.; DE LUCA, P.M. CD4⁺ and CD8⁺ T cell immune responses of immunocompetent and immunocompromised (AIDS) patients with american tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 3, p. 381-84. May-Jun. 1996 a.

COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; DA-CRUZ, A.M.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.F.; BERTHO, A.L.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. T-cell responsiveness of american cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigotas antigens and *Leishmania braziliensis* promastigotes antigens. Immunologic patterns associated with cure. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 84, n. 2, p. 144-55. Nov. 1996 b.

COUTINHO, S.G.; PRIMEZ, C.; MENDONÇA, S.C.F.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R.C.C. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 1, p. 214-28. Nov. 1987.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRINALDI-JR, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 142-44. Apr 2000.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, England, v. 27, n. 5, p. 305-18. Sep. 2004.

DIAS, N.; NICOLAU, A.; CARVALHO, G.S.; MOTA, M.; LIMA, N. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. **Journal of Basic Microbiology**, Germany, v. 39, n. 2, p. 103-08. 1999.

ELLIS, J.A.; FISH, W.R.; SILEGHEM, M.; MCODIMBA, F. A colorimetric assay for trypanosome viability and metabolic function. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 50, n. 1-2, p. 143-9. Oct. 1993.

EREL, O.; KOCYGITA, A.; BULUT, V.; GUREL, M.S. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients with cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 179-83. Mar-Apr. 1999.

ESTEVEZ, Y.; CASTILHO, D.; PISANGO, M.T.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 114, n. 2, p. 254-9. Nov. 2007.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L.venezuelensis*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, England, v. 43, n. 4, p. 219-22. Dec. 1992.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Antileishmanial activity of a tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. **Planta medica**, Germany, v. 60, n. 1, p. 8-12. Feb. 1994.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana, São Paulo, p. 36-53. 2001.

GIORGIO, S.; BARÃO, S.C.; AUGUSTO, O.; KWEE, J.K. *Leishmania amazonensis* infection is reduced in macrophages treated with guanine ribonucleosides. **Acta tropica**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 119-22. Jun. 1998.

GOMES, L.E.; ANDRIAL, M.; HOSOKAWA, A.; NONADE, S.; HASHIGUCHI, Y. Oral treatment of new world cutaneous leishmaniasis with mefloquine and artesunate in

Ecuador: a preliminary clinical trial. **Nippon Nettai Igakkai Zasshi**, Nagasaki, v. 23, n. 3, p. 151-57. 1995.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI J.; SHIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 26, n. 1, p. 131-8. Oct. 1982.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 307-14. Dec. 2000.

KILLILCK - KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmanioses. **Medical and Veterinary Entomology**, England, v. 4, p. 1-24. 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniosis in Latin-America. **Nature**, London, v. 273, n. 5664, p. 595-600. Jun. 1978.

LOISEAU, P.M.; BORIES, C. Recent strategies for the chemotherapy of visceral leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, United States, v. 12, n. 6, p. 559-64. Dec. 1999.

MACHADO, G.M.; LEON, L.L.; DE CASTRO, S.L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p.73-7. Feb. 2007.

MAGILL, A.J.; GROGL, M.; GASSER, R.A.Jr.; SUN, W.; OSTER, C.N. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. **The New England Journal of Medicine**, Washington, v. 328, n. 19, p. 383-7. May. 1993.

MALDONADO, R.A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas` disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1353-59. Jun. 1993.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia", ESCOMEL, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, n. 6, p. 859-76. 1986.

MARSELLA, R.; GOPEGUI, R. R. Leishmaniasis, a re-emerging zoonosis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 37, n. 11, p. 801-14. Nov. 1998.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, Brazil, v. 24, n. 1, p. 105-11. 2001.

MUELAS, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Germany, v.86, n. 12, p. 999-1002. Dec. 2000.

MUELAS, S.; SUAREZ, M.; PEREZ, R.; RODRIGUEZ, H.; OCHOA, C.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. In vitro and in vivo assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 2, p. 269-272. Mar. 2002.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, England, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577. Oct-Nov. 2005.

MUSSI, S.V.; FERNANDES, A.P.; FERREIRA, L.A. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology Research**, Germany, v. 100, n. 6, p. 1221-6. May. 2007.

NAJIM, R.A.; SHARQUIRE, K.E.; FARJOU, I.B. Zinc Sulphate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: an in vitro and animal study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 6, p. 831-37. Nov-Dec. 1998.

NEAL, R.A. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**., Liverpool, v. 62, n. 1, p. 54-62. Mar. 1968.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 267, n. 17, p. 5421-6. Sep. 2000.

PALMER, K.J.; HOLLIDAY, S.M.; BROGDEN, R.N. Mefloquine a review of its antimalarial activity, pharmacokinetics properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, Auckland, v. 45, n. 3, p. 430-75. Mar. 1993.

PEARSON, R.D.; LAREAU, S.M.; JERONIMO, S.M. Leishmaniasis at the of the mellennium. **Current Infectious Disease Reports**, Philadelphia, v. 1, n. 5, p. 448-52. Dec. 1999.

PETTIT, R.K.; WEBER, C.A.; KEAN, M.J.; HOFFMANN, H.; PETTIT, G.R.; TAN, R.; FRANKS, K.S.; HORTON, M.L. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, United States, v. 49, n. 7, p. 2612-7. Jul. 2005.

RAMOS, D.C.C.; CARDOSO, A.G.T.; SPENCER, P.J.; NASCIMENTO, N.; MESTRINER, C.L.B.; COTRIM, P.C. Growth inhibition of *Leishmania* spp. by irradiated snake venoms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, suppl. II, p. 311-2. 2000.

RANGEL, H; DAGGER, F; HERNANDEZ, A; ANDREINA, L; URBINA, J.A. Natural azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine comparative study with azoles- susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 40, n. 12, p. 2785-91. 1996.

Rodrigues, E.R. Estudos pré-clínicos de possíveis efeitos adversos da Cubebina. Ribeirão Preto, 2002. (Tese Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP).

RÓLON, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Germany, v. 99, n. 2, p. 103-107. Jul. 2006.

RYDER, N. S.; MIETH, H. Allylamine antifungal drugs. **Current topics in medical mycology**, Spain, v. 4, p. 158-88. 1992.

SACK, D.L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 69, n.1, p.100-3. Jul. 1989.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. D. Identification of infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, Washington, v. 223, n. 4643 p. 1417-19. Mar. 1984.

SACKS, D. L.; PIMENTA, P. F. P.; McCONVILLE, M. J.; SCHNEIDER, P.; TURCO, S. J. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **The Journal of experimental medicine**, United States, v. 181, n. 2, p. 685-97. Feb. 1995.

SACKS, D. L.; SILVA, R. M. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a

developmentally regulated glycolipid. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 139, n.9, p. 3099-06. Nov. 1987.

SANTOS, E. C. T.; PAIVA, S. R.; KAPLAN, M. A. C.; BERGMANN, B. R. Atividade anti-Leishmania de *Plumbago scandens* (Plumbaginaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 13-15. 1997.

SARAIVA, J.; VEGA, C.; ROLON, M.; da SILVA, R.; E SILVA, M.L.; DONATE, P.M.; BASTOS, J.K.; GOMEZ-BARRIO, A.; de ALBUQUERQUE, S. *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, Germany, v. 100, n. 4, p. 791-5. Mar. 2007.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC-50-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlin, v. 33, n. 11, p. 813-823. 1995.

SILVA, L. E.; JOUSSEF, A. C.; PACHECO, L. K.; SILVA, D. G.; STEINDEL, M.; REBELO, R. A. Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 24, p. 7553–60. Dec. 2007.

SJOLANDER, A.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J. M.; HANDMAN, E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.160, n. 8, p. 3949-57. Apr. 1998.

SOTO, J.; GROGI, M.; BERMAN, J.; OLLIARO, P. Limited efficacy of injectable aminosidine as single-agent therapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Rio de Janeiro, v. 88, n.6, p. 695-98. Nov-Dec. 1994.

SOUZA, V. A.; SILVA, R.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; SOUZA, G. H. B.; SILVA FILHO, A. A.; GRANDO, M. D.; DONATE, P. M.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Trypanocidal activity of (–)-cubebin derivatives against amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, England, v. 15, n. 2, p. 303–307. Jan. 2005.

TEIXEIRA, M. J.; ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; FILHA, J. G. H.; RODRIGUES, T.P.; PRATA-JR, J. R. C.; COÊLHO, I. C. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. *In vitro*

and in vivo leishmanicidal Activity of 2- Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (Lapachol). **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 1, p. 44-8. Feb. 2001.

THAKUR, C. P.; BROWMICK, S.; DOLFI, L.; OLLIARE, P. Aminosidine plus sodium stibogluconate for the treatment of Indian Kala-zar: a randomized dose-finding clinical trial. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, n.2, p. 219-23. Mar-Apr. 1995.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONCA-FILHO, R.R.; MORGADO-DIAZ, J.A.; KOREHISA MAZA, P.; PRADO DIAS FILHO, B.; APARICIO, G.C.D., ALVIANO, D.S.; ROSA M.S. LOPES AH, ALVIANO, C.S.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol. Int.**, v.55, n.2, p.99-105. 2006.

URBINA, J. A; LAZARDI, K; AGUIRRE, T; PIRAS, M. M; PIRAS, R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF-86327 and Ketoconazole on epimastigotes and amastigotas of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 32, p. 1237-42. 1988.

URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; VIVAS, J.; VISBAL, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; PAYARES. G.; RANGEL, H.; DAGER, F.; HERNANDEZ, A.; GREAVES, M. A. Recent advances in experimental chemotherapy of Chagas disease and leishmanioses with the use of sterol biosynthesis inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, suppl.1, p. 85-7. 1993.

URBINA, J. A.; VIVAS, J.; VISBAL, G.; CONTRERAS, M. L. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes sterol methyl tranferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 199-10. Jul. 1995.

URBINA, J.A.; VIVAS, J.; LAZARDI, K.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R. Antiproliferative effects of sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. **Chemotherapy**, New York, v. 42, n. 4, p. 294-7. Jul-Aug. 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Las Leishmaniasis. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de Informe Técnicos, p.701. 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Second WHO Meeting on Emerging Infection Diseases. Document WORLD HEALTH

ORGANIZATION/CDS/BVI/95 2. Geneva, Switzerland: World Health Organization. January. 1995.

YOUNG, D. G.; ARIAS, J.R. Flebotomos: vectores de leishmaniasis em Las Americas. Pan American Health Organization: **Cuaderno Técnico**, n. 33, Washington. 1992.

Yunes, R.A.; Pedrosa, R.C.; Filho, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, Brazil, v. 24, n. 1, p.147-52. 2001.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 48, p. 449-70. 1994.

RODRIGUES, K. C. **Avaliação do efeito leishmanicida de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas**. 2009. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ERRATA

Folha	Parágrafo/linha	Onde se lê	Leia-se
23	4/4	(1), (3) e (H)	(1), (3) e (D)
23	Tabela/4	15,55	20938
23	Tabela/5	20938	15,55
28	3/3	e na Tabela 4	
36		5. Conclusões	6. Conclusões