

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA
DE *Dioclea grandiflora* (FABACEAE) DO NORDESTE
BRASILEIRO**

LÍVIA BANDEIRA COSTA

**RECIFE
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA
DE *Dioclea grandiflora* (FABACEAE) DO NORDESTE
BRASILEIRO**

LÍVIA BANDEIRA COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração em Patologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelo Centro de Ciências da Saúde, UFPE, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia. Orientada pela Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros e co-orientada pela Prof^a. Dr^a. Eliete Cavalcanti da Silva.

**RECIFE
2011**

Costa, Livia Bandeira

Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de *Dioclea grandiflora* (Fabaceae) do Nordeste brasileiro / Livia Bandeira Costa. – Recife: O Autor, 2011.

77 folhas: il., fig., gráf.; 30 cm.

Orientador: Paloma Lys de Medeiros

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Leishmania. 2. Saúde Pública. 3. Produtos naturais. 4.

***Dioclea grandiflora*. I. Medeiros, Paloma Lys de. II. Título.**

616.96

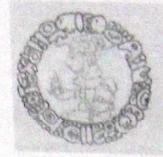
CDD (20. ed.)

UFPE
CCS2011-060



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências da Saúde
 Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
 Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
 Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
 PATOLOGIA.**

AUTORA: **LÍVIA BANDEIRA COSTA**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **PATOLOGIA**

NOME DA DISSERTAÇÃO: **"AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
 LEISHMANICIDA DE *Dioclea grandiflora* (FABACEAE) DO NORDESTE
 BRASILEIRO".**

ORIENTADORA: **DRA. PALOMA LYS DE MEDEIROS**

CO - ORIENTADORA: **ELIETE CAVALCANTI DA SILVA**

DATA DA DEFESA: **21 DE FEVEREIRO DE 2011.**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. **Luiz Lúcio Soares da Silva**

Prof. Dr. **Antônio Fernando Moraes de Oliveira**

Prof.ª. Dr.ª. **Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**REITOR**

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

R E C I F E

2011

Agradecimentos

É muito prazeroso finalizar mais um trabalho, mais uma etapa da minha vida. Agradeço a Deus por está sempre me iluminando e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho, que foram muito importantes durante esses dois anos. Sou muito grata a cada uma delas!

Não tenho palavras para agradecer a "Mainha", sem dúvidas, a pessoa que mais acredita em mim e mais me incentiva todos os dias. Ao meu irmão João Wilson, que sempre está por perto, e pela compreensão. Aos meus familiares e amigos que sempre estão torcendo por mim.

A minha querida amiga Anacássia Lima, minha companheira de estudos mais uma vez. É sempre uma felicidade compartilhar esses momentos com você.

As amigas Juliana Pedrosa e Ana Paula Pinto, pelo prazer imenso de conhecê-las, por terem me apoiado e incentivado durante esses dois anos. Aos demais colegas de mestrado por todo carinho e coleguismo.

Aos meus amigos biomédicos por serem peças fundamentais na minha vida. Estamos crescendo juntos e isso me deixa imensamente feliz!

Ao Prof. Dr. Hilton Justino da Silva e ao Prof. Dr. Nicodemos, ambos do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE, por todo exemplo de vida e pelos ensinamentos que ficarão para sempre.

A querida Tati, sempre colaborando durante o mestrado. Muito obrigada pela paciência!

Aos professores Dr^a. Paloma Lys de Medeiros, Dr^a. Eliete Cavalcanti e Dr. Luis Lúcio Soares, do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE, por terem me orientado e contribuído com a minha formação, além de terem me recebido de braços abertos em seu grupo de pesquisa.

Ao professor Dr. Antônio Fernando Moraes de Oliveira do Departamento de Botânica da UFPE, sempre gentil e paciente, por ter dedicado parte de seu tempo para me ajudar, colaborando com o desenvolvimento deste trabalho e me oferecendo a oportunidade de aprendizados futuros.

As professoras Dr^a. Maria Bernadete e Dr^a. Eulália Ximenes, ambas do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE; e ao colega Gustavo, do Departamento de Antibióticos, pelas valiosas dicas que foram importantíssimas para a formação deste trabalho.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Células por toda ajuda e colaboração. Em especial, a Keicyanne Fernanda e a Mariana Mirele que dedicaram muito do seu tempo fazendo experimentos comigo, além de serem colegas queridas.

E finalmente...

Aos amigos Luís Cláudio, Renato Cezar, Jana Sandes e Amanda Aliança. O que seria de mim sem vocês? Na reta final, dedicando tempo e paciência para me ajudar a finalizar tudo. Amo vocês demais. Muito, muito, muito obrigada!

Não tenho palavras para agradecer a compreensão e o apoio da prof^a. Dr^a. Regina Bressan, do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, que foi fundamental para finalização da minha dissertação. Pelas idéias tão boas e por ter disponibilizado seu laboratório e equipe, além de me encorajar nesse último mês. A Aline, Tacy e Divar, por terem me recebido tão bem, pela paciência e solidariedade ao realizarem experimentos comigo durante suas férias. Muito obrigada pela força!

Que Deus ilumine cada um de vocês!

Lívia Bandeira

Resumo

As leishmanioses atingem dois milhões de pessoas por ano, ocorrendo principalmente em países subdesenvolvidos. Além disso, muitos dos medicamentos usados para tratá-las são tóxicos, difíceis de administrar e pouco efetivos. Nesse sentido, a busca por novas drogas mais eficazes e menos tóxicas ainda é necessária. A atividade leishmanicida dos extratos das folhas de *Dioclea grandiflora* foi avaliada *in vitro* utilizando formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*. O extrato aquoso de *D. grandiflora* apresentou CI_{50} de 300 $\mu\text{g/mL}$ frente as duas espécies e induziu a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais. Alterações na morfologia e motilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* foram observadas através de microscopia confocal após o tratamento com o extrato aquoso. O extrato aquoso também mostrou atividade frente cepas de *Staphylococcus aureus*, causador de infecções secundárias nas úlceras leishmanióticas, com CIM de 1.562 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados, em conjunto, mostram que os extratos de *Dioclea grandiflora* têm potencial para o isolamento de frações e de substâncias com potencial leishmanicida.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania*, saúde pública, produtos naturais, *Dioclea grandiflora*

Abstract

Leishmaniasis are diseases which affects 2 million people annually, besides affecting developed and undeveloped countries. The available therapy for leishmaniasis still causes serious side effects. Many of the drugs used to treat them are toxic, difficult to administer, and are more than 50 years old. In this sense, the search for new drugs more effective and less toxic is still needed. In the present study, leishmanicidal activity of the crude extracts isolated from leaves of the *Dioclea grandiflora* was evaluated *in vitro* using *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* promastigotes. Promastigotes viability was analyzed and the IC₅₀ of aqueous extract was 300 µg/mL against both species. This extract increased more nitric oxide production by the macrophage in comparison to nontreated macrophages. Changes in morphology and motility of promastigotes of *L. amazonensis* were observed by confocal microscopy after treatment for 72 hours with the aqueous extract. Furthermore, the aqueous extract showed activity against strains of *Staphylococcus aureus*, causing secondary infections in leishmanial ulcers, with MIC of 1.562 µg/mL. Take together our results show that extracts of *Dioclea grandiflora* have a great potential to isolation of more selective substances that could be a promising agent against leishmaniasis.

KEYWORDS: *Leishmania*, public health, natural products, *Dioclea grandiflora*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	21
Figura 2. Aspecto geral das folhas, frutos e sementes de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart. Ex. Benth (Fabaceae)	31
Figura 3. Metodologia seguida para CI ₅₀ na placa de cultura de células	44
Figura 4. Placa de cultivo de células com cultura de <i>Leishmania chagasi</i> tratada com os extratos de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart. ex. Benth	44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO ORIGINAL

- Figura 1.** Efeito leishmanicida dos diferentes extratos das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth em promastigotas de *Leishmania chagasi*. Os parasitas foram tratados por 72 h com os extratos aquoso e etanólico nas concentrações 200, 300 e 400 µg/mL, e na ausência dos mesmos. Para o extrato aquoso todas as concentrações foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$), sendo a CI_{50} 300 µg/mL. 61
- Figura 2.** Efeito leishmanicida dos diferentes extratos das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os parasitas foram tratados por 72 h com os extratos aquoso e etanólico nas concentrações 200, 300 e 400 µg/mL, e na ausência dos mesmos. Não foi observada diferença estatística entre as concentrações dos extratos quando comparadas com o controle ($p < 0.05$). 61
- Figura 3.** Observações microscópicas da viabilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 72 h de tratamento sem o extrato aquoso das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth (A), com a CI_{50} (B) e duas vezes a CI_{50} (C). Os parasitas foram analisados através de microscopia confocal. Em A, o grupo controle, onde as células apresentam morfologia normal e flagelos longos (seta). Em B, observam-se pequenas alterações nas formas e aumento celular das promastigotas tratadas com 300 µg/mL do extrato (setas). Em C, a concentração de 600 µg/mL deformou as células para arredondadas, causou perda de flagelo e lise celular (setas). 64
- Figura 4.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth na produção de Óxido Nítrico por macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram tratados com o extrato nas concentrações de 150, 300, 600 e 1200 µg/mL por 72 h. A concentração 0 µg/mL representa o grupo controle (sem o extrato). Os sobrenadantes obtidos da cultura foram usados para determinar a concentração de nitrito pela reação de Griess. Apenas as concentrações de 600 e 1200 µg/mL foram estatisticamente significantes quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). Cada barra representa o desvio padrão do experimento realizado. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabólitos, fase móvel e revelador específico utilizados na análise fitoquímica dos extratos de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart. ex. Benth.	41
Tabela 2 – Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides segundo Matos 2009	42
Tabela 3 – Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> usadas no estudo e susceptibilidade aos antibióticos	47

LISTA DE TABELAS

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1: Cepas de *Staphylococcus aureus* usadas no estudo e susceptibilidade das mesmas aos antibióticos 57

Tabela 2: Cepas de *Staphylococcus aureus* usadas no estudo e susceptibilidade ao extrato aquoso das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth 66

LISTA DE ABREVIATURAS

CCB Centro de Ciências Biológicas

CCS Centro de Ciências da Saúde

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

LEAF Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica

UFPB Universidade Federal da Paraíba

CCD Cromatografia de Camada Delgada

FeCl₃ Cloreto Férrico

LIT *Liver Infusion Broth*

CI₅₀ Concentração de Inibição de 50% do crescimento

SFB Soro Fetal Bovino

PBS *Phosphate Buffered Saline*

RPMI *Roswell Park Memorial Institute Medium*

CIM Concentração Inibitória Mínima

NO Óxido Nítrico

NO₂ Nitrito

H₃PO₄ ácido fosfórico

AN Ágar Nutriente

MHB Caldo Mueller Hinton

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Leishmanioses	19
<i>2.1.1 Considerações Gerais</i>	19
2.2 Formas clínicas	22
2.3 Diagnóstico e tratamento das leishmanioses	25
2.4 Uso de plantas medicinais	28
2.5 <i>Dioclea grandiflora</i> Mart. Ex. Benth	30
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MÉTODOS	37
4.1 Área	37
4.2 Período de Referência	37
4.3 Delineamento da Pesquisa	37
4.4 Método de Coleta	38
<i>4.4.1 Extratos</i>	38
<i>4.4.2 Processamento do material botânico</i>	38
<i>4.4.3 Obtenção dos extratos</i>	38
<i>4.4.3.1 Extrato aquoso</i>	38
<i>4.4.3.2 Extrato etanólico</i>	39

4.4.4 Processamento dos extratos	39
4.4.5 Análise fitoquímica	39
4.4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	40
4.4.5.2 Detecção de Fenóis e Taninos	41
4.4.5.3 Detecção de Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides	42
4.4.6 Parasitas	43
4.4.7 Concentração de Inibição de 50% do Crescimento (CI₅₀)	43
4.4.8 Análise da morfologia celular	45
4.4.9 Macrófagos peritoneais de camundongos	45
4.4.9.1 Produção de Óxido Nítrico (NO)	45
4.4.10 Atividade antimicrobiana	46
4.4.10.1 Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
4.4.10.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	47
4.5 Definição das Variáveis	48
4.6 Método de Análise	48
5. ARTIGO ORIGINAL DE RESULTADOS	50
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. APRESENTAÇÃO

As leishmanioses estão entre as patologias infecciosas parasitárias de maior incidência no mundo, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais (MOITINHO *et al.*, 2009; MONTE NETO *et al.*, 2011). São causadas por protozoários parasitas, pertencentes ao gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos ao homem e a outros mamíferos através da picada da fêmea do inseto *Lutzomyia* spp. (FIGUEIRAL, *et al.*, 2008; NEITZKE *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2010).

As leishmanioses assumem várias formas clínicas, podendo acometer a pele, as mucosas e as vísceras, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro (FIGUEIRAL, *et al.*, 2008; NUNES, 2008). Estas patologias têm ampla distribuição na Ásia, África e América Latina, ocorrendo em 88 países e atingindo mais de 14 milhões de pessoas, com um acréscimo de dois milhões de casos novos e 57.000 mortes por ano. Além disso, estima-se que 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção (NEITZKE *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2010; MONZOTE *et al.*, 2010; MONTE NETO *et al.*, 2011).

No Brasil, as leishmanioses estão presentes em áreas urbanas e suburbanas, sendo a espécie *Leishmania chagasi* o principal agente etiológico da leishmaniose visceral, enquanto *Leishmania amazonensis* está associada à forma cutânea da doença (MONTE NETO *et al.*, 2011). Existem aproximadamente 30.000 casos notificados anualmente sendo por esta razão considerada endêmica (MOITINHO *et al.*, 2009). As diferentes formas clínicas da leishmaniose constituem um grave problema de saúde pública em vários países em desenvolvimento (FIGUEIRAL *et al.*, 2008). Apesar dos grandes progressos feitos na compreensão da bioquímica e da biologia molecular do parasita, os tratamentos de primeira

escolha não apresentam eficácia e aplicabilidade desejadas, além de serem tóxicos (GONTIJO e MELO, 2004; NUNES, 2008).

As leishmanioses ainda são parasitoses associadas à pobreza e por tanto, oferecem pouco incentivo comercial para as companhias farmacêuticas, retardando-se o desenvolvimento de medicamentos efetivos e baratos. Considerando as dificuldades em relação à terapêutica e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas, dentre as quais se incluem os fitoterápicos (BEZERRA *et al.*, 2006).

As plantas são importantes fontes para a investigação de produtos biologicamente ativos. Cerca de um quarto dos medicamentos existentes no mercado possuem extratos em suas composições, alguns dos quais têm sido, inclusive, utilizados como matéria-prima de drogas semi-sintéticas (BEZERRA *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2007).

Extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth (Fabaceae), proveniente de regiões da Caatinga e Cerrado do Brasil, são exemplos de produtos naturais que estão sendo investigados (BATISTA, ALMEIDA e BHATTACHARYYA, 1995). A espécie *D. grandiflora*, conhecida popularmente como Olho-de-boi e Mucunã, é usada na medicina popular como analgésicos no tratamento de cálculos renais e doenças de próstata (BATISTA, ALMEIDA e BHATTACHARYYA, 1995; BARREIROS, 2000). Em outros estudos, vários testes específicos foram realizados com modelos animais e *in vitro*, relatando a possibilidade de efeito sedativo, anticonvulsivante e ansiolítico, além das atividades como analgésica e antimicrobiana (DE ALMEIDA *et al.*, 2010; SÁ *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

Pesquisas têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas. Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias descritas na literatura como eficazes na atividade leishmanicida (BEZERRA *et al.*, 2006). Porém, esses tratamentos são empíricos e pouco se

sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na leishmaniose tegumentar americana pode ocorrer a cura espontânea das lesões (MOREIRA *et al.*, 2007).

A investigação dos efeitos antiparasitários de *D. grandiflora*, frente ao gênero *Leishmania*, facilitaria o aprimoramento dos estudos de espécies vegetais para o fornecimento de dados científicos na síntese de novos fármacos, favorecendo o uso de plantas medicinais utilizadas pela população. Esse procedimento constitui um mecanismo dentro da medicina moderna, onde a formulação farmacêutica possa ser segura e eficaz, aliada aos estudos farmacológicos (FETROW e AVILA, 2000). Além disso, metodologias adotadas no presente estudo, como a cultura de parasitas, são relevantes para estudos preliminares de substâncias antiparasitárias, constituindo-se um dos requisitos de pré-seleção para estudos *in vivo*.

O objetivo principal dessa pesquisa foi investigar a atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos de *D. grandiflora*. Para tal, foi feita uma análise preliminar dos extratos por cromatografia de camada delgada; avaliado os efeitos dos extratos na proliferação da *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*, na morfologia dos parasitas e na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais tratados e não tratados com os extratos. Além disso, foi investigada a atividade antimicrobiana de *D. grandiflora* frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, causador de infecções secundárias nas úlceras leishmanióticas.

Este trabalho será desmembrado em duas partes: A primeira, a fundamentação teórica do estudo; e a segunda, o artigo original, referente aos resultados obtidos na avaliação experimental desenvolvida durante o mestrado, intitulado: “Atividade leishmanicida e antimicrobiana *in vitro* de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae”.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leishmanioses

2.1.1 Considerações Gerais

As leishmanioses são doenças endêmicas que ocorrem em várias partes do mundo, ocasionando um elevado índice de morbidade e mortalidade. Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários digenéticos, pertencentes a família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*, possuindo um ciclo de vida que se alterna entre dois hospedeiros, no caso, um vertebrado e um inseto (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; MOREIRA *et al.*, 2007; SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

De acordo com o tipo de lesão que causam e de algumas características imunológicas e moleculares, cerca de 18 espécies de leishmanias foram identificadas (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). Oito principais espécies de leishmanias causam, pelo menos, três formas distintas da doença no homem: Leishmaniose Cutânea (*Leishmania tropica*; *Leishmania major*), Leishmaniose Mucocutânea (*Leishmania braziliensis*; *Leishmania mexicana*; *Leishmania amazonensis*) e Leishmaniose Visceral (*Leishmania donovani*; *Leishmania infantum*; *Leishmania chagasi*) (LAINSON e SHAW, 1978; BARRAL-NETO *et al.*, 1998; HANDMAN, 2000)

As leishmanias apresentam duas formas morfológica e fisiologicamente distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota é extracelular e é encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados ou em meios de cultura apropriados. Essa forma é fusiforme e com longo flagelo livre, mede cerca de 15 micrômetros e possui núcleo, citoplasma e cinetoplasto (NAKAMURA *et al.*, 2006; NUNES, 2008; SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

A forma amastigota é obrigatoriamente parasita intracelular em vertebrados, é encontrada nas células do Sistema Fagocítico Mononuclear, parasitando principalmente macrófagos. É arredondada ou oval e com curto flagelo que não se exterioriza, mede de quatro a seis micrômetros de comprimento por dois micrômetros de diâmetro, contém núcleo, cinetoplasto e um vacúolo. Em ambos os casos, o ciclo de vida consiste em divisão assexuada, ou seja, divisão binária (NAKAMURA *et al.*, 2006; NUNES, 2008; SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

As leishmanias são transmitidas por meio da picada de mosquitos hematófagos pertencentes à subfamília Phlebotominae e ao gênero *Lutzomyia*. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea. Ao picarem o homem ou animais silvestres infectados os insetos ingerem macrófagos contendo formas amastigotas de leishmanias (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

No intestino médio do inseto, as leishmanias se transformam em flagelados pequenos, ovóides e pouco móveis, com alta taxa de multiplicação. Após alguns dias, surgem as formas promastigotas delgadas e longas, que se fixam nas vilosidades intestinais do inseto e estabelecem migração para as porções anteriores do tubo digestório, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicas (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; NUNES, 2008).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas ao picarem suas vítimas (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; NUNES, 2008). As promastigotas são internalizadas através de endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago. Dentro do fagolisossomo, elas se transformam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária (NUNES, 2008). Na ausência de controle parasitário da célula hospedeira, esta se rompe e as amastigotas liberados serão internalizadas por outros macrófagos (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). O ciclo está demonstrado na figura 1.

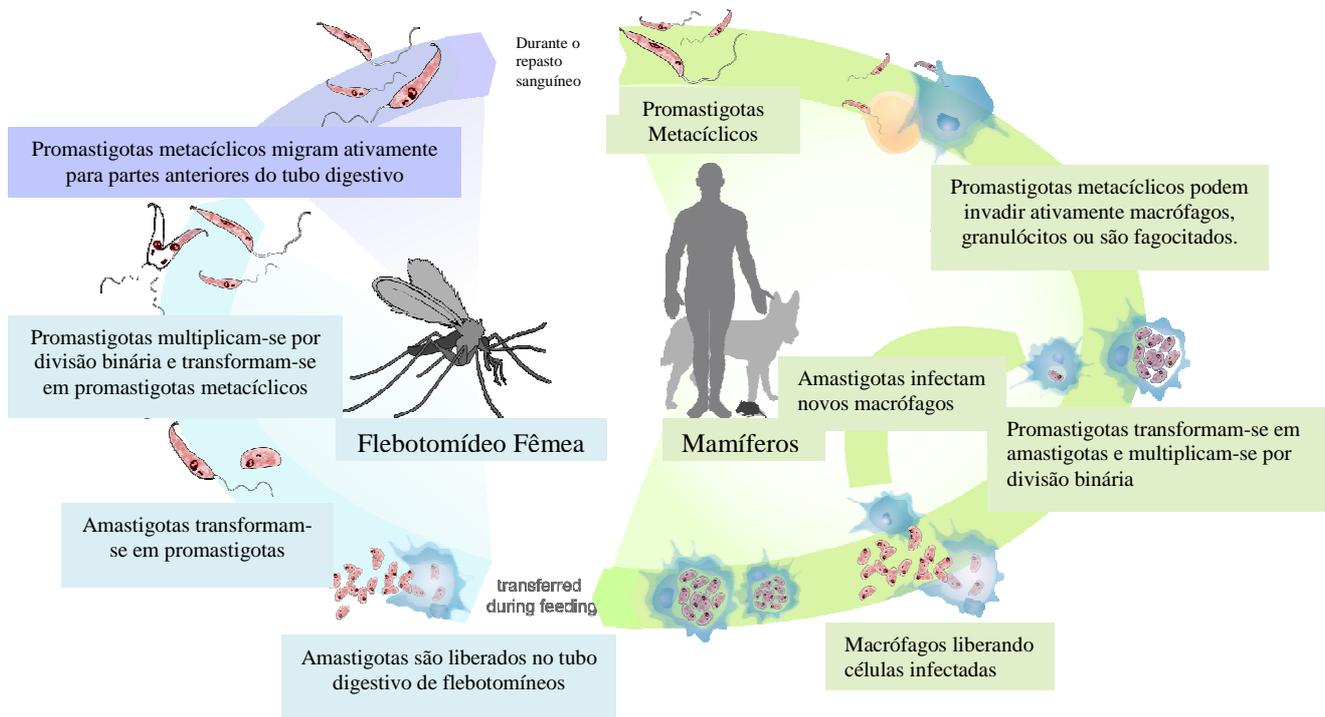


Figura 1- Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Adaptado de: VILLARREAL, 2008.

O período de incubação da infecção vai desde a entrada do agente no organismo até o aparecimento dos sinais clínicos. Varia de 10 dias a 24 meses, sendo em média dois a quatro meses. O período de transmissibilidade ocorre enquanto persistir o parasitismo na pele ou no sangue circulante (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008). No homem, os parasitas se encontram principalmente no baço, medula óssea e fígado, devido à menor temperatura corpórea. Além disso, o indivíduo uma vez contaminado terá o parasita em seu organismo, podendo haver recidivas em casos de queda de imunidade (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

Apesar de serem todas inoculadas na pele, espécies distintas de leishmanias têm preferências por órgãos diferentes, causam lesões maiores ou menores, produzem ou não metástases e podem ser ou não auto-curáveis. Induzem imunidade permanente ou temporária

e às vezes nenhuma. Esses fatores e suas possíveis combinações são os responsáveis pelas diversos quadros clínicos das leishmanioses (CAMARGO e BARCINSKI, 2003).

2.2 Formas clínicas das leishmanioses

A forma tegumentar (cutânea) pode ser, por sua vez, subdivida em leishmaniose cutânea-localizada, cutâneo-difusa e cutânea-mucosa (NAKAMURA *et al.*, 2006). A leishmaniose cutânea caracteriza-se pela formação de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme (geralmente úlceras profundas), principalmente nas áreas expostas do corpo, apresentando grande densidade de parasitas nos bordos das lesões nas fases iniciais, o que tende a reduzir nas úlceras crônicas. (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; NUNES, 2008). Essas úlceras permanecem ativas durante meses, expondo-se à colonização por microrganismos, componentes ou não da flora normal da pele (VERA *et al.*, 2001). Existem poucos relatos sobre a prevalência de bactérias em úlceras leishmanióticas. Segundo estudos realizados no Brasil, Equador e Irã a bactéria mais prevalente nas úlceras leishmanióticas é o *Staphylococcus aureus*. Em caso de sinais inflamatórios perilesionais além dos limites da úlcera, suspeita-se de infecção secundária. Dessa forma, estaria indicada além do tratamento para leishmaniose, a antibioticoterapia oral (VERA *et al.*, 2006).

A leishmaniose cutâneo-difusa é uma variação da forma cutânea que apresenta generalizada disseminação do parasita, formando de lesões difusas não ulceradas por toda a pele, contendo grande número de amastigotas. Evolui para a formação de nódulos e placas com caráter altamente deformante e seu êxito é invariavelmente letal (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; NUNES, 2008). Na Amazônia essa forma extremamente grave de leishmaniose, felizmente raríssima, é provocada pela *Leishmania amazonensis* e é conhecida como leishmaniose anérgica difusa e se manifesta em indivíduos com marcada deficiência

imunológica (por exemplo, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; NUNES, 2008). Algumas formas tegumentares são bastante graves, como a Leishmaniose Mucocutânea que se diferencia da forma cutânea por produzir lesões destrutivas de mucosas e cartilagens, através de extensão direta da lesão primária ou através da disseminação hematogênica (NUNES, 2008).

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa sistêmica e de progressão crônica. A apresentação clínica depende do tempo de evolução da doença, a partir da inoculação do parasita, e está sujeita a determinantes ainda não bem compreendidos. É caracterizada por febre irregular de intensidade média, diária e de longa duração, e marcado emagrecimento (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; SILVA *et al.*, 2000). As leishmanias, inoculadas na pele, atingem o sistema fagocítico mononuclear, chegando aos fagócitos do baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea, e eventualmente também de outros órgãos. É uma doença consumptiva e imunossupressora, ocorrendo hepatoesplenomegalia, acompanhada de sinais biológicos de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, podendo haver linfadenopatia periférica (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; NUNES, 2008). No homem, acomete principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos, podendo progredir para um quadro crônico. O emagrecimento, o edema e o estado de debilidade progressiva contribuem para a caquexia e o óbito, se o paciente não for submetido ao tratamento específico (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; NUNES, 2008).

As três espécies envolvidas com a infecção na leishmaniose visceral dependem da região geográfica: *L. donovani*, na Ásia e África; *L. infantum* na Ásia, Europa e África; e *Leishmania chagasi* nas Américas, onde a doença é denominada leishmaniose visceral americana ou calazar neotropical (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

No Brasil, existem sete espécies distintas do parasita sendo que, destas, seis (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania lansoni*, *Leishmania shawii*,

Leishmania naiffi) são responsáveis pela leishmaniose tegumentar americana – e uma espécie (*L. chagasi*), responsável pela leishmaniose visceral americana (GONTIJO e MELO, 2004; NUNES, 2008).

Em todo o território brasileiro ocorre tanto a forma tegumentar quanto a forma visceral, as quais são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações. Predominam principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão. O estado Maranhão apresenta grande incidência de leishmanioses em 88% de seus municípios (BEZERRA *et al.*, 2006). No estado de Pernambuco, o número de casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana tem crescido nos últimos anos. A região da Zona da Mata de Pernambuco responde por 64,2% do total de casos notificados. É importante registrar que a partir de 2000, verifica-se também um aumento da ocorrência da doença no Sertão, o que demonstra que no estado apresenta-se não só um aumento no número de casos, como também uma importante expansão espacial (ANDRADE *et al.*, 2009). As formas cutâneas da doença prevalecem na Amazônia, mas qualquer reserva florestal de qualquer parte do país pode servir como foco de infecção, como tem ocorrido inclusive em capitais do sudeste do país (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). No estado do Paraná essa enfermidade tem se mostrado endêmica, apresentando uma incidência de 4,2% de casos/100 mil habitantes (ARRAES *et al.*, 2008).

A importância da leishmaniose visceral reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes (GONTIJO e MELO, 2004). Entre 1980 e 2005, o Brasil registrou 59.129 casos de leishmaniose visceral, sendo 82,5% na Região Nordeste. Gradativamente, a leishmaniose visceral expandiu-se para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, passando de 15% dos casos em 1998 para 44% em 2005.

Entre 1998 e 2005, casos autóctones da doença foram registrados em 1.904 (34,2%) diferentes municípios brasileiros (MAIA-ELKHOURY, 2008).

2.3 Diagnóstico e tratamento das leishmanioses

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde tem investido em pesquisas sobre o diagnóstico laboratorial, tratamento dos pacientes, avaliação da efetividade das estratégias de controle, bem como de novas tecnologias que possam contribuir na melhora das ações de vigilância e controle das leishmanioses no Brasil (MAIA-ELKHOURY, 2008). O diagnóstico é baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (GONTIJO e MELO, 2004; SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008). Atualmente, a confirmação diagnóstica pode ser obtida através da demonstração de antígenos de leishmania no tecido pela técnica da imunohistoquímica. Esta técnica utiliza um anticorpo policlonal antileishmania e marca positivamente antígenos de leishmania, sobretudo em macrófagos e células endoteliais (MOITINHO *et al.*, 2009).

O tratamento de doenças causadas por protozoários é difícil, pois, por serem também eucariotos, compartilham muitas características com as células de mamíferos. Dessa forma, a atuação dos agentes antiparasitários ocorre em vias ou em alvos comuns ao parasita e ao hospedeiro (NAKAMURA *et al.*, 2006). Por mais de sessenta anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes (Antimoniato-N-metil-glucamina- Glucantime[®] e o Estibogliconato de sódio- Pentostan[®]), que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, e em outros países de língua não inglesa, e apresentam esquema terapêutico padronizado pela OMS (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008; SAMPAIO, COSTA FILHO e LUCAS, 2009; ALVARENGA *et al.*, 2010).

Os compostos antimoniais se ligam a grupos sulfidrila nas proteínas e podem formar tioantimonidas. Algumas evidências sugerem que a forma pentavalente pode ser reduzida *in vivo* ao antimonial trivalente antes de sua ligação. Os antimoniais trivalentes inibem a fosfofrutoquinase, uma enzima que limita a velocidade na glicólise. Esses fármacos afetam a estrutura celular, a função, a síntese ou a produção de energia. Os microrganismos, cujo crescimento depende do metabolismo anaeróbico da glicose, não podem sobreviver sem a presença da enzima ativa. Ainda não foi estabelecido se esse é o mecanismo pelo qual os antimoniais pentavalentes inibem os protozoários (SCHEIBEL, 2005).

Os antimoniais são irritantes para a mucosa intestinal e, por isso, são administrados por via intramuscular ou intravenosa. As concentrações sanguíneas máximas são obtidas em 2 horas. Esses fármacos ligam-se às células, incluindo aos eritrócitos, e são encontrados em altas concentrações no fígado e no baço. Os antimoniais pentavalentes ligam-se menos fortemente aos tecidos. Isso resulta em níveis sanguíneos mais elevados, excreção mais rápida e menor toxicidade. Embora a administração possa ser parenteral, a infiltração local na lesão da leishmaniose cutânea é eficaz (SCHEIBEL, 2005).

Os derivados antimoniais são ainda os compostos mais usados para o tratamento, mas causam resistência à droga no parasita e toxicidade nos pacientes (CHAGAS *et al.*, 2010; MONZOTE *et al.*, 2010). Drogas secundárias, como a Anfotericina B e Pentamidina (*Pentam 300*) são opções na terapia combinada ou nos casos de falha no tratamento com antimoniais (MONZOTE *et al.*, 2010).

Devido à sua menor toxicidade, a Anfotericina B lipossômica é considerada a escolha de primeira linha para a leishmaniose visceral em lugar dos antimoniais (SCHEIBEL, 2005). A anfotericina B interage especificamente com o ergosterol, esteróide da membrana das leishmanias, causando aumento de permeabilidade e morte do parasita (BERMAN, 1997).

A Pentamidina se liga ao DNA e pode inibir a replicação e a função do DNA do cinetoplasto. Seu efeito, em altas doses, pode atuar sobre a respiração dos microrganismos. Essa droga não é bem absorvida pelo trato intestinal após administração oral e, em geral, também é administrada por injeção intramuscular. A droga liga-se aos tecidos, particularmente no rim, e é lentamente excretada, em sua maior parte na forma inalterada (SCHEIBEL, 2005).

Na leishmaniose visceral essas drogas são usadas em esquemas prolongados, causando efeitos adversos como: alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas (GONTIJO e MELO, 2004; MOREIRA *et al.*, 2007). O principal efeito colateral do Glucantime[®] é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização durante os dois primeiros trimestres de gravidez (GONTIJO e MELO, 2004).

A quimioterapia das leishmanioses está mais promissora com novas drogas e novas formulações. Estudos clínicos têm identificado o Miltefosina (hexadecilfosfocolina), um medicamento originalmente desenvolvido como antineoplásico, como um eficaz agente anti-*Leishmania* (GONTIJO E MELO, 2004; COSTA FILHO, LUCAS e SAMPAIO, 2008; MONZOTE *et al.*, 2010;). Esta droga age interferindo na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, modulando a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolipídeos, induzindo morte celular por apoptose (COSTA FILHO, LUCAS e SAMPAIO, 2008). A Miltefosina é bem tolerada, apresenta menor toxicidade e maior facilidade de administração por ser usada por via oral (GONTIJO E MELO, 2004; COSTA FILHO, LUCAS e SAMPAIO 2008; MONZOTE *et al.*, 2010;).

A importância de uma droga de uso oral, além de efetiva, contra a leishmaniose se destaca pelo fato dessa doença ser mais prevalente em lugares mais pobres e de difícil acesso no Brasil, tais como municípios das Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste onde seria de imensa valia e aumentaria enormemente a adesão ao tratamento (COSTA FILHO, LUCAS e

SAMPAIO, 2008). Entretanto, é relatado a toxicidade gastrointestinal e o potencial efeito teratogênico da Miltefosina, devendo por isso, ser usada com muita cautela em mulheres em idade fértil, necessitando sempre de uso concomitante de método anticoncepcional (GONTIJO E MELO, 2004; COSTA FILHO, LUCAS e SAMPAIO, 2008; MONZOTE *et al.*, 2010).

O custo das novas terapias leva a diferentes práticas de tratamento de acordo com a condição socioeconômica e cultural de cada região. A ausência de uma vacina contra leishmaniose aumenta a necessidade de drogas efetivas para substituir ou suplementar aquelas de uso corrente (GIL *et al.*, 2008). Esse contexto de busca por novos agentes anti-*Leishmania* tem levado a um grande interesse no estudo de medicamentos tradicionais como origem de protótipos para o desenvolvimento de novos compostos quimioterápicos com melhor atividade e menos efeitos colaterais (GIL *et al.*, 2008).

2.4 Uso de plantas medicinais

O reino vegetal é sem dúvidas uma fonte valiosa de novos agentes medicinais (GIL *et al.*, 2008). O uso de espécies vegetais vem sendo realizado desde o início da civilização no processo de cura de inúmeras enfermidades. Nos últimos 15 anos, o interesse pelos agentes fitoterápicos cresceu no mundo inteiro. Toxinas naturais e seus derivados têm sido amplamente utilizados nas pesquisas de fármacos e têm levado ao desenvolvimento de diversos agentes terapêuticos (NAKAMURA *et al.*, 2006).

Os avanços da medicina possibilitam a comprovação da capacidade de cura de determinadas plantas e seu modo de ação, garantindo segurança na utilização das mesmas como medicamento (NAKAMURA *et al.*, 2006; NUNES, 2008). Estima-se que cerca de 65-80% da população mundial dependa diretamente das plantas como medicamentos (NUNES,

2008). Deve-se ressaltar que as drogas derivadas de plantas também podem ser prejudiciais para o organismo, uma vez que são constituídas por centenas de compostos e alguns são muito tóxicos. Todavia, os efeitos adversos dos agentes fitoterápicos são menores quando comparado com o das drogas sintéticas (NAKAMURA *et al.*, 2006).

O Brasil tem uma posição proeminente na biodiversidade mundial, uma vez que contém extensas áreas de biodiversidade: a Mata Atlântica, a Floresta Amazônica, o Cerrado e a Caatinga. Devido à flora imensa e aos aspectos culturais, o uso de plantas sob a forma dos extratos crus, infusões ou os emplastos é uma prática comum para tratar doenças tropicais incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções por fungos e bactérias, entre outras (BEZERRA *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2007).

O uso de plantas no tratamento das leishmanioses é uma prática antiga entre as populações das áreas endêmicas (MONZOTE *et al.*, 2010). As preparações vegetais são utilizadas tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (BEZERRA *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2007). Segundo Chagas *et al.* (2010) infusões das folhas, cascas e sementes de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae) são utilizadas por comunidade de negros descendentes de escravos (quilombolas) para o tratamento, principalmente, de leishmaniose cutânea, feridas, úlceras e impigens.

Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonóides e lactonas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida. Porém, pouco se sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na Leishmaniose Tegumentar pode ocorrer a cura espontânea das lesões (BEZERRA *et al.*, 2006).

No Município de Buriticupu (Amazônia do Maranhão), Brasil, os extratos de folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae), conhecida popularmente como gervão, rinchão e vassourinha-de-botão, são utilizados pela população no tratamento das

úlceras causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. Alguns dos efeitos dessa espécie, preconizados pela população, já foram demonstrados experimentalmente, como a atividade anti-inflamatória, analgésica, gastroprotetora e antimicrobiana (MOREIRA *et al.*, 2007).

Monzote *et al.* (2010) destacam que a literatura têm relatado a espécie *Piper auritum* Kuth (Piperaceae) como agente leishmanicida, e seus óleos essenciais se tornaram um alvo importante dos últimos anos na busca de novos tratamentos antiparasitários. Em seu estudo, o óleo de *P. auritum* inibiu o crescimento de formas amastigotas de *L. donovani*. Os autores ainda afirmam que será feita a avaliação do óleo essencial de *P. auritum* contra a leishmaniose visceral murina (MONZOTE *et al.*, 2010).

2.5 *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth

Casca do caule de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth, planta medicinal distribuída nas regiões da Caatinga e do Cerrado do Brasil, são utilizados pela população de baixa renda na preparação de infusões para doenças renais e prostáticas. É conhecida popularmente como “Mucunã-de-carço”, “Olho-de-boi” ou ainda por “Mucunã-vermelha” (BATISTA, ALMEIDA e BHATTACHARYYA, 1995; BARREIROS, 2000; ALMEIDA 2005).



(SILVA, 2003)

Figura 2- Aspecto geral das folhas, frutos e sementes de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth (Fabaceae).

D. grandiflora tem sido identificada como uma planta que se adapta muito bem a Caatinga, sendo encontrada principalmente nos estados de Pernambuco, Paraíba e Bahia (BARREIROS, 2000). Apresenta uma capacidade excelente de rebrota e ramos jovens relativamente macios e com poucos espinhos. Ocorre sob forma de um "cipó" vigoroso, trepador, que pode atingir a copa das árvores ou subir em conjunto com arbustos (BATISTA, ALMDEIDA e BHATTACHARYYA, 1995).

Os primeiros estudos com *D. grandiflora* foram realizados por Chaves em 1948 no campo da nutrição. Só após 36 anos é que foi publicado algo sobre as propriedades químicas da lectina de *D. grandiflora* (SILVA, 2006). Em estudo acerca da atividade biológica da lectina encontrada nas sementes de *D. grandiflora*, foi observado uma reação inflamatória cutânea. Análises histológicas revelaram um quadro de ulceração hemorrágica com reação exudativa acompanhada por um influxo de leucócitos polimorfonucleados e macrófagos. Isto

demonstra que a lectina de *D. grandiflora* atua como um agente inflamatório, provavelmente promovendo exocitose e liberação de mediadores químicos (LIMA *et al.*, 1993).

Em 1995 foi publicado o efeito analgésico de *D. grandiflora*, constatando sua ação no sistema nervoso central envolvendo um mecanismo semelhante aos opióides (BATISTA, ALMEIDA e BHATTACHARYYA, 1995). No mesmo ano a atividade ansiolítica das suas sementes foi avaliada em animais de laboratório, onde foi sugerido que *D. grandiflora* apresente um perfil de droga depressora (MATTEI, LEITE E TUFIK, 1995). Já em 1999 foi detectado um potencial vaso relaxante no endotélio da aorta de ratos a partir do *dioclein* (flavonóide) (LEMOS *et al.*, 1999). A ação da lectina de *D. grandiflora* também foi descrita na produção de óxido nítrico pela via linfocítica (ANDRADE *et al.*, 1999). Posteriormente, um *screening* farmacológico revelou a atividade antinociceptiva do *dioclenol* e *dioflorin* (dihidroflavonóide e flavonóide, respectivamente) em camundongos (ALMEIDA *et al.*, 2000).

Os estudos com esta planta avançaram muito a partir de 2002. Neste ano, foi relatado o efeito do *dioclein* (flavonóide) sobre a circulação coronariana em ratos, onde foi mostrado um efeito vasodilatador direto sobre as artérias coronarianas, independente da participação do óxido nítrico e ciclooxigenase (ALMEIDA *et al.*, 2002).

Em 2003, um estudo verificou em ratos e camundongos, após o tratamento agudo com extrato hidroalcoólico de sementes de *D. grandiflora*, uma ação analgésica significativa no movimento da cauda e testes em chapa quente. Os resultados sugeriram que o extrato tenha uma ação analgésica central destituída de tolerância, efeito típico de drogas opióides (ALMEIDA *et al.*, 2003). Ainda em 2003, também foram observadas as atividades antitumorais, frente ao sarcoma 180, do extrato etanólico e aquoso da casca do caule. Efeitos típicos importantes sobre fígado e rins foram observados em ambos os extratos (SILVA, 2003).

Em um estudo publicado em 2006, a lectina de *D. grandiflora* mostrou ação frente aos microrganismos, inibindo a adesão de estreptococos, como o *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*, no biofilme formado na superfície do esmalte dentário (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Silva *et al.* (2010) relatou a atividade bacteriostática do extrato aquoso e hidroalcoólico da casca do caule de *D. grandiflora* que inibiu o crescimento de *S. aureus*. Já o extrato hidroalcoólico das folhas e raízes inibiu o crescimento de dois fungos: *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*. Durante o procedimento experimental, foi isolada uma fração acetato de etila do extrato aquoso da folha que inibiu o crescimento de *Streptococcus epidermides*, *Candida albicans*, *T. metagrophytes* e *M. canis*. Para o extrato etanólico do caule, foi isolada uma fração aquosa que inibiu *S. epidermides* e *S. aureus* (SILVA *et al.*, 2010).

Ainda em 2010, De Almeida *et al.* (2010) publicaram um estudo, feito em ratos, mostrando o efeito ansiolítico e anticonvulsivante de uma fração da casca do caule de *D. grandiflora* e do *dioclenol*, um flavonóide isolado da mesma. A análise fitoquímica feita nesse estudo revelou que a fração alcoólica tem alta concentração do flavonóide ativo (*dioclenol*).

Devido à presença dos flavonóides em *D. grandiflora*, e das possíveis atividades biológicas dos mesmos, pesquisas estão sendo realizadas para verificar as propriedades farmacológicas potenciais dessa espécie. Entretanto, há carência de estudos das ações de *D. grandiflora* frente aos microrganismos (bactérias, fungos e parasitas). Considerando a disponibilidade existente de *D. grandiflora* na flora brasileira e o seu potencial como fonte de moléculas bioativas a serem estudadas e exploradas, acredita-se que seus extratos possam apresentar efeitos promissores no tratamento de patologias como as leishmanioses.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal dessa pesquisa foi investigar a atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Analisar os extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth por cromatografia de camada delgada.

3.2.2 Investigar os efeitos dos extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth na proliferação da *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*.

3.2.3 Analisar os efeitos do extrato de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth na morfologia dos parasitas através da microscopia confocal.

3.2.4 Investigar a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais tratados e não tratados com o extrato de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth.

3.2.5 Verificar a atividade antimicrobiana do extrato de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth frente às cepas de *Staphylococcus aureus*.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Área

Este estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia – Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Em colaboração, utilizaram-se as dependências do Laboratório de Microbiologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, do Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica–LEAF do Departamento de Botânica (CCB/UFPE) e do Laboratório de Genética de Microrganismos no Departamento de Antibióticos (CCB/UFPE).

4.2 Período de Referência

O presente estudo foi iniciado em Agosto de 2009 e finalizado em Janeiro de 2011.

4.3 Delineamento da Pesquisa

O presente estudo investigou a hipótese do extrato de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth possuir atividade leishmanicida, tratando-se de uma pesquisa Analítica e também sendo classificada como Experimental, pois foram realizadas intervenções através de testes laboratoriais *in vitro*.

4.4 Método de Coleta

4.4.1 Extratos

Folhas de *D. grandiflora* foram coletadas no município de Santa Rita no Estado da Paraíba, no mês de Junho de 2001. O material botânico foi identificado pela Professora Dr^a. Maria de Fátima Agra, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e encontra-se catalogado sob o código 444-JPB, MO, no Herbário Lauro Pires Xavier (PPB), da UFPB.

Os extratos foram cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Lúcio Soares da Silva do Departamento de Histologia e Embriologia (CCB/UFPE). Foram utilizados os extratos aquoso e etanólico das folhas.

4.4.2 Processamento do material botânico

Após a coleta, a secagem e a conservação das folhas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da UFPE. O material ficou disposto em bandejas de alumínio, a temperatura ambiente, em dependências arejadas, durante dez dias.

4.4.3 Obtenção dos extratos

4.4.3.1 Extrato aquoso

Na obtenção do extrato aquoso, foram utilizados 100 g de folhas secas, previamente trituradas em moinho circular de bancada. O material foi colocado em um becker e foi adicionada água destilada, até cobrir por completo todo conteúdo, perfazendo um volume

final de 800 mL. Após esse procedimento, o material foi submetido à agitação mecânica por 1 hora, permanecendo em repouso para maceração por 24 horas em um refrigerador.

Em seguida, realizou-se o processo de liofilização e dessecação até peso constante. O extrato foi armazenado, em um freezer, até o momento dos testes de atividade biológica.

4.4.3.2 Extrato etanólico

O extrato etanólico foi feito a partir de 100 g de folhas secas e trituradas em moinho circular de bancada. O material foi colocado em extrator Soxhlet e extraído com etanol 95% por esgotamento, em uma temperatura de 81 ° C, por um período de 72 horas. Após essa etapa, o extrato foi submetido à evaporação a vácuo para retirada do solvente e dessecado até peso constante. O extrato foi mantido, em um freezer, até o momento dos testes de atividade biológica.

4.4.4 Processamento dos extratos

Para realização dos testes de atividade biológica, os extratos foram diluídos em água destilada e filtrados através de membranas *Syringer- Filter* (0,22 µm).

4.4.5 Análise Fitoquímica

Os extratos foram submetidos a uma análise fitoquímica. O procedimento foi realizado no Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica– LEAF do Departamento de Botânica (CCB/UFPE).

Cerca de 3 g dos extratos foram submetidos à solubilização em metanol, sob aquecimento, em um agitador magnético, durante 15 minutos. Posteriormente, os mesmos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores específicos (WAGNER e BLADT, 1996).

Foi investigada a presença alcalóides, cumarinas, derivados cinâmicos, esteróides e flavonóides. Utilizou-se também uma metodologia para detecção de fenóis e taninos e outra para antocianinas, antocianidinas e flavonóides, propostas por Matos (2009).

4.4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Cerca de 15 µL dos extratos foram submetidos à CCD, utilizando placas de sílica gel (Fluka 60778- indicador de fluorescência 224 nm), com sistema de desenvolvimento e reveladores específicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Metabólitos, fase móvel e revelador específico utilizados na análise fitoquímica dos extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth*.

Metabólitos	Fase Móvel	Revelador	Controle Positivo
Alcalóides	Solução metanólica de Piridina 20%	Dragendorff	Warifteína
Cumarinas	Tolueno Éter Ácido acético 10% 1:1:0,5 v/v	KOH- etanólico	Folhas de <i>Justicia pectoralis</i> (Jacq.) (Anador)**
Derivados cinâmicos	Acetato de Etila Ácido Fórmico Água 8:1:1 v/v	Reagente de NEU	Ácido Clorogênico, Ácido p-Cumárico, Ácido Caféico
Flavonóides	Acetato de Etila, Ácido Fórmico e água 8:1:1 v/v	Reagente de NEU	-

* Wagner e Bladt, 1996 ** Extrato etanólico

4.4.5.2 Detecção de Fenóis e Taninos

O teste para identificação de fenóis e taninos foi realizado de acordo com a metodologia de Matos (2009).

Em tubos de ensaio foram colocados alíquotas dos extratos e adicionado, em seguida, três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3). Após a agitação dos tubos foi observado a presença de um precipitado escuro abundante. Foi preparado um teste “branco”, com água destilada e FeCl_3 para comparações.

A presença de fenóis ou taninos foi determinada de acordo com o aparecimento da coloração indicada para cada substância quando o teste “branco” for negativo. A coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis. A formação de um precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

4.4.5.3 Detecção de Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides

O teste para identificação de antocianinas, antocianidinas e flavonóides foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009).

Em tubos de ensaio foram colocados alíquotas dos extratos em triplicata. Em seguida, cada extrato foi acidificado em pH 3 com HCl e alcalinizado em pH 8,5 e 11 com NaOH. Foi observada a mudança de qualquer coloração. Os resultados foram analisados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2- Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides segundo Matos 2009

Constituintes	Cor em Meio		
	Ácido (pH 3)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e Antocianidinas	vermelha	lilás	azul-púrpura
Flavonas, Flavóides e Xantonas	-	-	amarela
Chaconas e Auronas	vermelha	-	vermelha púrpura
Flavonóis	-	-	vermelha laranja

4.4.6 Parasitas

Os parasitas foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães–FIOCRUZ. Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*, em fase exponencial de crescimento, para os testes de atividade antiparasitária *in vitro*.

Uma alíquota de 200 µL de parasitas foram cultivados em tubos Falcon de 15 mL com 2 mL de meio LIT (*Liver Infusion Broth*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,1 % de antibióticos (estreptomicina e penicilina) e 0,2% de hemoglobina, em estufa de BOD a 26° C, em duplicata. A expansão das culturas era feita em tubo Falcon de 50 mL, onde 1,5 mL de parasitas foram cultivados em 15 mL de meio LIT, por 72 horas em estufa BOD a 26 ° C.

4.4.7 Concentração de Inibição de 50% do Crescimento (CI₅₀)

Após a expansão das culturas, *L. chagasi* e *L. amazonensis* foram distribuídas em placas de cultura de células de 12 poços com 2 mL de meio LIT em cada poço, em uma concentração de 2×10^6 parasitas por mL, contendo os extratos nas seguintes concentrações: 400, 300, 200 µg/mL. Como controle negativo, os parasitas foram incubados na ausência dos extratos (Figura 2 e Figura 3).

Os parasitas foram diluídos (1:1000) em solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) mais formalina a 10%, e contados após 72 horas em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico. Os testes foram repetidos, na própria placa, em triplicata.

	1	2	3	4
A	Controle	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL
B	Controle	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL
C	Controle	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL

Figura 2. Metodologia seguida para CI_{50} na placa de cultura de células.

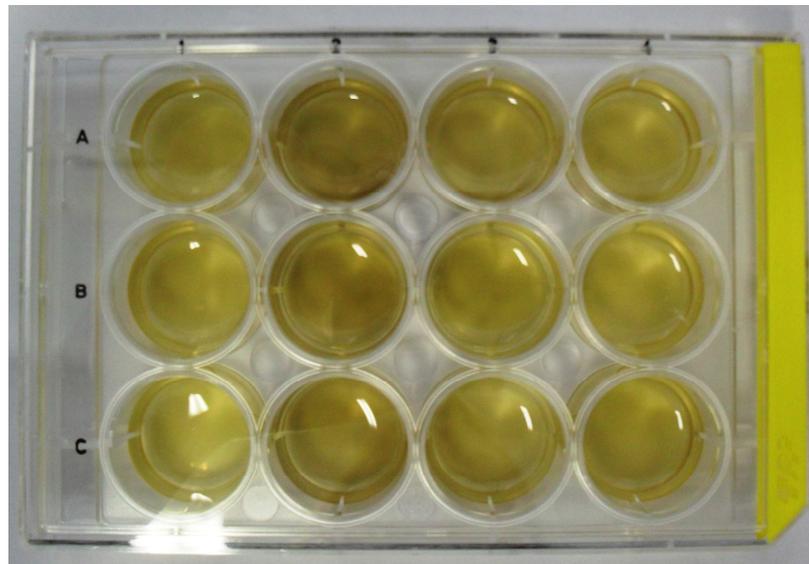


Figura 3. Placa de cultivo de células com cultura de *Leishmania chagasi* tratada com os extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth.

4.4.8 Análise da morfologia celular

Para análise da morfologia dos parasitas, culturas de promastigotas de *L. amazonensis* em fase exponencial de crescimento foram incubadas com a CI_{50} do extrato aquoso de *D. grandiflora*, com duas vezes a CI_{50} e sem o extrato. Após 72 horas de incubação as culturas foram observadas por microscopia confocal, usando um microscópio Leica SPII-AOBS (Heidelberg, Alemanha), equipado com laser ArKr (488 nm) e HeNe (543 nm).

4.4.9 Macrófagos peritoneais de camundongos

Para obter os macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos BALB/c ($\geq 20g$), eutanasiados em câmara de CO_2 . Todos os procedimentos utilizando animais experimentais foram permitidos pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ, Protocolo: L- 0001/08).

Os macrófagos peritoneais foram coletados em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) suplementado com 20% de SFB, e incubados por 24 horas em placas de cultura de células de 96 poços, a $37^\circ C$, 5% CO_2 . Os macrófagos não aderidos foram removidos, e aqueles aderidos foram lavados com meio de cultura RPMI, e novamente incubados por 72 horas na presença e ausência do extrato aquoso de *D. grandiflora*.

4.4.9.1 Produção de Óxido Nítrico (NO)

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais tratados e não tratados com o extrato aquoso de *D. grandiflora*, nas concentrações da metade da CI_{50} , a CI_{50} , o dobro e quatro vezes a CI_{50} , foram analisados para verificar a produção de óxido nítrico (NO). O NO

foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO_2^-) resultante de sua oxidação no sobrenadante da cultura detectado pela reação colorimétrica de Griess.

O reagente de Griess foi preparado na hora do uso na proporção de 1:1 de 1% de sulfanilamida em 2,5% de H_3PO_4 (ácido fosfórico) e 0,1% de diamina-di-hidroclorido naftatelo (NEED) em 2,5% de H_3PO_4 (Hibbs et al., 1988). Após 10 minutos a absorbância, à 595 nm, das diferentes amostras foi comparada com os valores da curva padrão, obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI.

4.4.10 Atividade antimicrobiana

4.4.10.1 Cepas de Staphylococcus aureus

Todas as cepas de *S. aureus* testadas foram isoladas de material clínico e fornecidas pelo Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), onde suas susceptibilidades aos antibióticos foram determinadas previamente (Tabela 3). Todas as bactérias foram mantidas em meio de cultura Ágar Nutriente (AN) e armazenadas a 4 ° C.

Tabela 3: Cepas de *Staphylococcus aureus* usadas no estudo e susceptibilidade das mesmas aos antibióticos.

Cepa	Fonte	Susceptibilidade aos Antibióticos			
		Oxacillina	Cefoxitina	Eritromicina	Clindamicina
UFPEDA 02	ATCC- Cepa padrão	S	S	S	S
UFPEDA 670	Urina	R	R	R	R
UFPEDA 672	Sangue	R	R	R	R
UFPEDA 677	Secreção de ferida	S	R	R	S

R- resistência; S- sensibilidade

4.4.10.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”. Uma dupla diluição seriada do extrato aquoso de *D. grandiflora* foi preparada em caldo Mueller Hinton (MHB) e 100 µL da suspensão de bactérias foram adicionados. Os inóculos microbianos na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) foram diluídos 1/10 em solução salina esterilizada (0.9%). As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas. Decorrido este intervalo de tempo foi adicionado a cada um dos orifícios 15 µL de uma solução de Resazurina (0,01%) e as microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 35°C. A solução de Resazurina (0,01%) foi utilizada como indicador de viabilidade celular. A leitura realizada de forma visual foi observada pela mudança da cor azul (original da Resazurina) para rosa, caracterizando

redução desse corante nas cavidades onde havia viabilidade bacteriana; em contrapartida, nas cavidades onde a cor permaneceu azul, não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana; podendo-se desta forma determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de um produto (extrato) capaz de inibir o crescimento bacteriano (CATÃO et al., 2010). Clorafenicol e Ampicilina foram utilizadas como controle positivo.

4.5 Definições das Variáveis

Para a realização do presente estudo foram consideradas as seguintes variáveis: Tipo de extrato (aquoso e etanólico) e as concentrações utilizadas.

4.6 Método de Análise

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os resultados foram expressos através da média \pm S.E.M. Os testes paramétricos t de Student ou ANOVA foram aplicados para as variáveis normalmente distribuídas. Para as variáveis que violaram os pressupostos de normalidade foram utilizados os testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para determinação da significância estatística nas comparações entre os grupos.

Para determinar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, o teste de comparação múltipla de Dunnett, para comparar cada concentração do extrato testado com o grupo controle, e de Tukey para comparar cada concentração testada entre si. Os resultados de todas as análises estatísticas foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

ARTIGO ORIGINAL DE RESULTADOS

5. ARTIGO ORIGINAL DE RESULTADOS

**Atividade leishmanicida e antimicrobiana *in vitro* de *Dioclea grandiflora*
Mart. ex. Benth., Fabaceae**
***In vitro* leishmanicidal and antibacterial activity of *Dioclea grandiflora*
Mart. ex. Benth., Fabaceae**

*Lívia B. Costa^{1,2}, André S. B. Oliveira¹, Regina Célia B. Q. de Figueiredo³, Antônio Fernando M. de Oliveira⁴, Eliete C. Silva², Luiz Lúcio S. Silva², Paloma L. de Medeiros^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco- UFPE- Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Prédio da Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde, Avenida Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP 50670-901

² Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia. Rua Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife-Brasil

³Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Departamento de Biologia Celular e Ultraestruturas. Rua Moraes Rego s/n Campus da UFPE. Engenho do Meio 50670-420 - Recife, PE - Brasil - caixa-postal: 7472.

⁴ Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica. Rua Prof. Moraes Rego s/n Cidade Universitária 50670-901 - Recife, PE - Brasil

Endereço para correspondência: Lívia Bandeira Costa, Universidade Federal de Pernambuco- Programa de Pós-Graduação em Patologia/CCS. Prédio da Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde, Rua Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP 50670-901. E-mail: livbandeira@bol.com.br. Telefone: (081) 2126-8529.

RESUMO: As leishmanioses atingem dois milhões de pessoas por ano, ocorrendo em países subdesenvolvidos. Muitos dos medicamentos usados para tratá-las são tóxicos, difíceis de administrar e pouco efetivos. Nesse sentido, a busca por novas drogas mais eficazes e menos tóxicas ainda é necessária. A atividade leishmanicida dos extratos das folhas de *Dioclea grandiflora* foi avaliada *in vitro*, utilizando formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*. O extrato aquoso de *D. grandiflora* apresentou CI_{50} de 300 $\mu\text{g/mL}$ frente as duas espécies, e induziu a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais. Alterações na morfologia e motilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* foram observadas através de microscopia confocal, após o tratamento com o extrato aquoso. Além disso, o extrato aquoso mostrou atividade frente cepas de *Staphylococcus aureus*, causador de infecções secundárias nas úlceras leishmanióticas, com CIM de 1.562 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados, em conjunto, mostram que os extratos de *Dioclea grandiflora* têm potencial para o isolamento de frações e de substâncias com potencial leishmanicida.

UNITERMOS: *Dioclea grandiflora*, Fabaceae, *Leishmania*, atividade leishmanicida

ABSTRACT: Leishmaniasis is a group of diseases, which affects 2 million people per annum, besides affecting developed and undeveloped countries. The available therapy for leishmaniasis still causes serious side effects. Many of the drugs used to treat them are toxic, difficult to administer, and are more than 50 years old. In this sense, the search for new drugs more effective and less toxic is still needed. In the present study, leishmanicidal activity of the crude extracts isolated from leaves of the *Dioclea grandiflora* was evaluated *in vitro* using *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* promastigotes. Promastigotes viability was analyzed and the IC_{50} of aqueous extract was 300 $\mu\text{g/mL}$ against both species. This extract increased more nitric oxide production by the macrophage in comparison to nontreated macrophages. Changes in morphology and motility of promastigotes were observed by confocal microscopy after treatment for 72h with the aqueous extract. Furthermore, the aqueous extract showed activity against strains of *Staphylococcus aureus*, causing secondary infections in leishmanial ulcers, with MIC of 1.562 $\mu\text{g/mL}$. Take together our results show that extracts of *Dioclea grandiflora* have a great potential to isolation of more selective substances that could be a promising agent against leishmaniasis.

KEYWORDS: *Dioclea grandiflora*, Fabaceae, *Leishmania*, leishmanicidal activity

INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças endêmicas de regiões tropicais e subtropicais, causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, e permanecem como problema de saúde pública em pelo menos 88 países, atingindo 14 milhões de pessoas (Guimaraes et al., 2010; Monzote et al., 2010). São doenças polimórficas que apresentam manifestações clínicas acometendo a pele, as mucosas e as vísceras (Chagas et al., 2010; Alvarenga et al., 2010). A lesão cutânea ulcerada, manifestação clínica da leishmaniose tegumentar, permanece ativa durante meses, expondo-se à colonização por microrganismos, sendo *Staphylococcus aureus* a bactéria mais prevalente (Vera et al., 2001; Vera et al., 2006).

No tratamento dessas enfermidades, as quimioterapias utilizadas apresentam vários efeitos adversos e baixa eficácia (Siqueira et al., 2010). Além disso, nas infecções bacterianas secundárias, o desenvolvimento de cepas de microrganismos resistentes aos antibióticos utilizados é uma preocupação permanente para a saúde pública (Schinor et al., 2006).

Produtos naturais têm um grande potencial na pesquisa por novos agentes para o tratamento de importantes doenças causadas por protozoários (Nakamura et al., 2006; Dutra et al., 2009). Muitas pessoas que vivem em áreas endêmicas usam extratos vegetais no tratamento tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (Monzote et al., 2010). Estudos realizados com extratos etanólicos de plantas da família Fabaceae, entre outras como Apocynaceae, Araliaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae e Gentianaceae, mostraram ação citotóxica para diferentes espécies do gênero *Leishmania* spp. (Rocha et al., 2009).

Dioclea grandiflora Mart. Ex. Benth (Fabaceae), conhecida popularmente como “Olho-de-boi” ou “Mucunã”, é uma planta da Caatinga e do Cerrado brasileiro (Mattei et al., 1995). As sementes e a casca da raiz e do caule de *D. grandiflora* são amplamente utilizadas na medicina popular na preparação de infusões para doenças renais e prostáticas (Batista,

Almeida, e Bhattacharyya, 1995). Vários testes específicos já foram realizados com modelos animais e *in vitro*, sugerindo o efeito sedativo, anticonvulsivante e ansiolítico, além de atividades como analgésica e antimicrobiana (Sá et al., 2010; Silva et al., 2010). Há carência de estudos das ações de *D. grandiflora* frente aos microrganismos (bactérias, fungos e parasitas).

Assim, este trabalho tem como objetivo principal investigar a atividade leishmanicida de *D. grandiflora*, frente *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*, além de verificar a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos tratados e não tratados com os extratos, facilitando o aprimoramento dos estudos de espécies vegetais para o fornecimento de dados científicos na síntese de novos fármacos. Adicionalmente, avaliou-se a atividade antimicrobiana da planta, devido ao aparecimento das infecções secundárias nas lesões leishmanióticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae, foram coletadas no município de Santa Rita no Estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Professora Dr^a. Maria de Fátima Agra, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e sua exsicata encontra-se catalogada sob o código 444-JPB, MO no Herbário Lauro Pires Xavier (PPB) da UFPB.

Preparação de extratos para os ensaios

Para preparação dos extratos aquoso e etanólico foram utilizadas 100 g de folhas secas e pulverizadas de *D. grandiflora*, de acordo com a metodologia utilizada por Silva et al., (2010a). Para realização dos testes de atividade biológica os extratos foram diluídos em água destilada e filtrados através de membranas *Syringer- Filter* (0,22 µm).

Análise fitoquímica

Os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de sílica gel (Fluka 60778- indicador de fluorescência 224 nm), empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores específicos (Wagner e Bladt, 1996). Foi investigada a presença alcalóides, cumarinas, derivados cinâmicos, esteróides e flavonóides. Utilizou-se também uma metodologia para detecção de compostos

fenólicos e taninos (reação de precipitação com cloreto férrico), e outra para antocianinas, antocianidinas e flavonóides (acidulação e alcalinização), propostas por Matos (2009).

Parasitas

Os parasitas foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*, em fase exponencial de crescimento, foram utilizadas para os testes de atividade antiparasitária *in vitro*. Os parasitas foram mantidos em meio LIT (*Liver Infusion Broth*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,1 % de antibióticos (estreptomicina e penicilina) e 0,2% de hemoglobina e incubados em estufa de BOD (*Biological Oxygen Demand*) a 26 °C.

Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos foi avaliada pela Concentração de Inibição de 50% (CI₅₀) do crescimento das formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (2x10⁶ parasitas/mL) em meio LIT, as quais foram distribuídas em placas de cultura de células, em triplicata, e incubadas a 26 °C por 72 h sem os extratos e com as concentrações de 400, 300, 200 µg/mL dos extratos. Após 72 h os parasitas foram diluídos em solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e formalina a 10%, e contados em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico invertido.

Análise da morfologia celular

Para análise da morfologia dos parasitas, culturas de promastigotas de *L. amazonensis* em fase exponencial de crescimento foram incubadas com a CI_{50} do extrato aquoso de *D. grandiflora*, com duas vezes a CI_{50} e sem o extrato. Após 72 h de incubação as culturas foram observadas por microscopia confocal, usando um microscópio Leica SPII-AOBS (Heidelberg, Alemanha), equipado com laser ArKr (488 nm) e HeNe (543 nm).

Macrófagos peritoneais de camundongos

Para obter os macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos BALB/c (≥ 20 g), eutanasiados em câmara de CO_2 . Todos os procedimentos utilizando animais experimentais foram permitidos pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ, Protocolo: L- 0001/08). As células foram coletadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), suplementado com 20% de SFB, e incubados em placas de cultura de células de 96 poços a $37^\circ C$, 5% CO_2 . Os macrófagos não aderidos foram removidos e aqueles aderidos foram lavados com meio de cultura RPMI.

Produção de Óxido Nítrico (NO)

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais tratados e não tratados com a metade da CI_{50} , a CI_{50} , o dobro, e quatro vezes a CI_{50} do extrato aquoso de *D. grandiflora* foram analisados para verificar a produção de óxido nítrico (NO). O NO foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO_2^-) resultante de sua oxidação no sobrenadante

da cultura, detectado pela reação colorimétrica de Griess. A absorvância, à 595 nm, das diferentes amostras foi comparada com os valores da curva padrão, obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI.

Atividade antimicrobiana

Cepas de *Staphylococcus aureus*

As cepas de *S. aureus* testadas foram isoladas de material clínico e fornecidas pelo Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), onde suas susceptibilidades aos antibióticos foram determinadas previamente (Tabela 1). Todas as bactérias foram mantidas em meio de cultura Ágar Nutriente (AN) e armazenadas a 4° C.

Tabela 1: Cepas de *Staphylococcus aureus* usadas no estudo e susceptibilidade aos antibióticos.

Cepa	Fonte	Susceptibilidade aos Antibióticos			
		Oxacillina	Cefoxitina	Eritromicina	Clindamicina
UFPEDA 02	Cepa padrão	S	S	S	S
UFPEDA 670	Urina	R	R	R	R
UFPEDA 672	Sangue	R	R	R	R
UFPEDA 677	Secreção de ferida	S	R	R	S

R- resistência; S- sensibilidade

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”. Uma dupla diluição seriada do extrato aquoso de *D. grandiflora* foi preparada em caldo Mueller Hinton (MHB) e 100 µL da suspensão de bactérias foram adicionados. Os inóculos microbianos na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) foram diluídos 1/10 em solução salina esterilizada (0.9%). As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas. Decorrido este intervalo de tempo foi adicionado a cada um dos orifícios 15 µL de uma solução de Resazurina (0,01%) e as microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 35°C. A solução de Resazurina (0,01%) foi utilizada como indicador de viabilidade celular. A leitura realizada de forma visual foi observada pela mudança da cor azul (original da Resazurina) para rosa, caracterizando redução desse corante nas cavidades onde havia viabilidade bacteriana; em contrapartida, nas cavidades onde a cor permaneceu azul, não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana; podendo-se desta forma determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de um produto (extrato) capaz de inibir o crescimento bacteriano (CATÃO et al., 2010). Clorafenicol e Ampicilina foram utilizadas como controle positivo.

Análise Estatística

Para determinar a atividade leishmanicida dos extratos, as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Os resultados foram expressos através da média \pm S.E.M. Os testes paramétricos t de Student ou ANOVA foram aplicados para as variáveis normalmente distribuídas. Para as variáveis que violaram os pressupostos de normalidade foram utilizados

os testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para determinação da significância estatística nas comparações entre os grupos.

Para determinar a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, o teste de comparação múltipla de Dunnett, para comparar cada concentração do extrato testado com o grupo controle, e de Tukey para comparar cada concentração testada entre si. Os resultados de todas as análises estatísticas foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com publicações anteriores, este é o primeiro relato na literatura no qual os extratos de *D. grandiflora*, aqui investigados, são submetidos a ensaios de atividade anti-*Leishmania*. O fracionamento dos extratos, e a identificação e purificação de metabólitos secundários de *D. grandiflora*, pode ser uma alternativa para potencializar tanto a ação antiparasitária como antimicrobiana. Apesar dos estudos já realizados nessa área, ainda existem muitas espécies vegetais com potencial atividade leishmanicida a serem avaliadas (Moreira et al., 2007).

No presente estudo, foi investigado o efeito leishmanicida de dois extratos, obtidos a partir de folhas de *D. grandiflora*. A escolha da espécie vegetal foi baseada nas já relatadas atividades biológicas da mesma, análises fitoquímicas realizadas em trabalhos anteriores, além do uso popular e disponibilidade na flora brasileira. Através da análise fitoquímica dos extratos aqui utilizados, foi possível identificar a presença de flavonóides, flavonas, xantonas e taninos flobabênicos (taninos condensados). Não foi verificada a presença dos demais metabólitos secundários investigados.

Os extratos testados interferiram na viabilidade das formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (Figuras 1 e 2). O extrato aquoso de *D. grandiflora* apresentou melhor ação, frente às duas espécies, com CI_{50} de 300 $\mu\text{g/mL}$ sendo, por tanto, investigada outras atividades do mesmo, considerando o valor de sua CI_{50} .

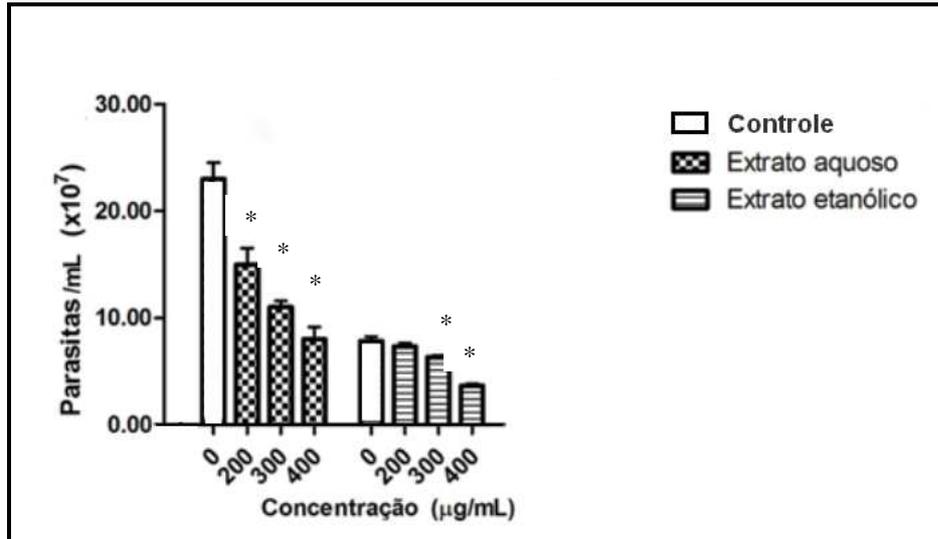


Figura 1. Efeito leishmanicida dos diferentes extratos das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth em promastigotas de *Leishmania chagasi*. Os parasitas foram tratados por 72 h com os extratos aquoso e etanólico nas concentrações 200, 300 e 400 µg/mL, e na ausência dos mesmos. Para o extrato aquoso todas as concentrações foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$), sendo a CI_{50} 300 µg/mL.

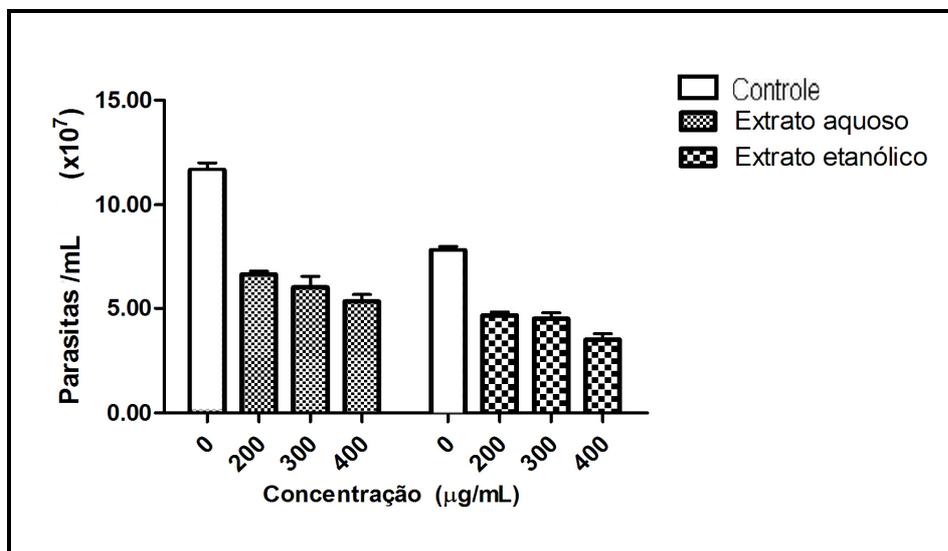


Figura 2. Efeito leishmanicida dos diferentes extratos das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os parasitas foram tratados por 72 h com os extratos aquoso e etanólico nas concentrações 200, 300 e 400 µg/mL, e na ausência dos mesmos. Não foi observada diferença estatística entre as concentrações dos extratos quando comparadas com o controle ($p < 0.05$).

O estudo de Dutra et al. (2009) ao investigar a atividade leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (Leguminosae) frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, relata ação efetiva apenas para *L. amazonensis*. Pode-se supor que este efeito diferencial esteja relacionado ao fato de que *L. amazonensis* seja mais susceptíveis em cultura que *L. chagasi* (Dutra et al. 2009). Diferentemente, neste estudo os valores de CI_{50} foram iguais para o extrato aquoso de *D. grandiflora* nas duas espécies investigadas, sugerindo-se um mecanismo de ação semelhante em ambas (Figuras 1 e 2).

Moreira et al. (2007) investigaram o efeito anti-*Leishmania* do extrato hidroalcoólico de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) que se mostrou mais ativo para a espécie *L. braziliensis* que para *L. amazonensis*. A CI_{50} para promastigotas de *L. braziliensis* foi de 73,7 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a CI_{50} requerida para matar *L. amazonensis* foi de 382,5 $\mu\text{g/mL}$ (Moreira et al., 2007). O resultado da CI_{50} do extrato hidroalcoólico de *S. cayennensis* para *L. amazonensis* foi semelhante aos valores encontrados utilizando os extratos de *D. grandiflora* neste estudo para as duas espécies avaliadas (Figuras 1 e 2), que apesar de mostrarem atividade contra o parasita, apresentaram uma concentração inibitória acima da maioria relatada pela literatura. Dutra et al. (2009), em seus estudos, consideram que os valores de CI_{50} acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ não apresentam atividade frente às formas promastigotas das espécies de *Leishmania*. Diferentemente, há relatos de extratos de plantas com CI_{50} de até 160 $\mu\text{g/mL}$ registrados como apresentando eficácia moderada (Bezerra et al., 2006).

As folhas de *S. cayennensis* têm sido usadas no tratamento da lesão ulcerada da leishmaniose tegumentar, possuindo dentre os seus constituintes químicos alcalóides, glicosídeos e flavonóides, substâncias com efeito leishmanicida comprovado (Moreira et al., 2007). A atividade apresentada por *D. grandiflora* pode estar relacionada com a presença dos compostos flavonóidicos, detectados nas folhas desse vegetal.

De acordo com o valor da CI_{50} obtida neste estudo, 100% de morte celular ocorreria apenas quando são usadas maiores concentrações dos extratos. Colaborando com esses resultados, as análises realizadas através da microscopia confocal mostram alterações morfológicas nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, após o tratamento por 72 h com o extrato aquoso.

O grupo de promastigotas não tratado apresenta morfologia normal típica (alongada) e flagelo longo. As análises dos grupos tratados sugerem que injúrias nos parasitas, que não podem ser revertidas, causam diminuição da motilidade, alterações estruturais e perda da viabilidade celular. As células aparecem com o volume aumentado, arredondadas, com ausência de flagelo, formando rosetas e muitas vezes lisadas (Figura 3). Observações semelhantes foram descritas por Oliveira et al. (2009), que assim como no presente estudo, destacaram a forma redonda e estrutura deformada das células tratadas. Mendonça-Filho et al. (2004), observaram mudanças semelhantes na morfologia das formas promastigotas de *L. amazonensis*, ao incubar as células com o extrato de *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) var. *typical* A, e mostrou que a lise das promastigotas foi observada após 60 min. de incubação.

Coletivamente, esses resultados sugerem que os extratos de *D. grandiflora* podem possuir um efeito citostático, porém não tão efetivos para serem citotóxicos frente ao gênero *Leishmania*, considerando que após 72 h de tratamento, quando os parasitas entram na fase estacionária de crescimento, ainda observou-se a presença de células viáveis em cultura.

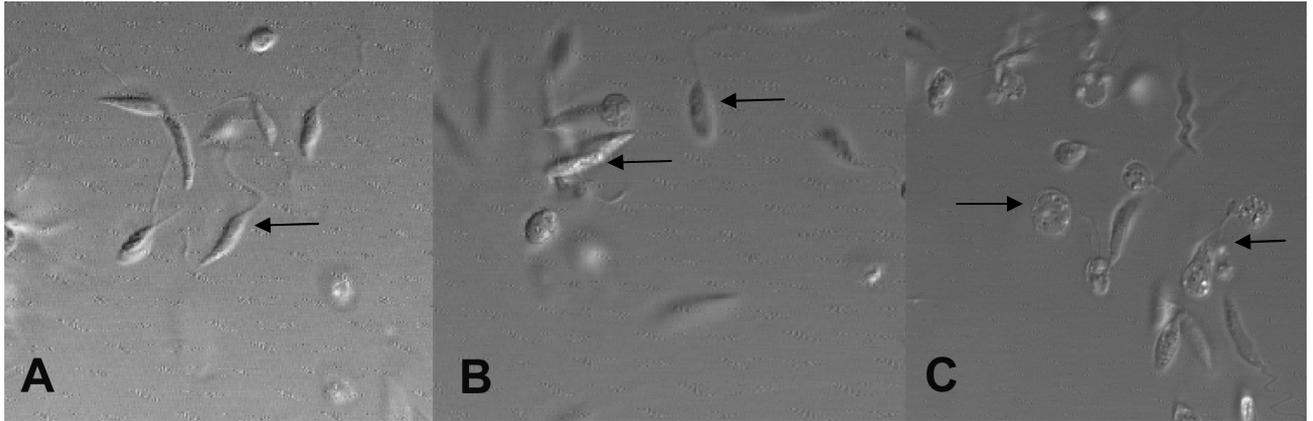


Figura 3. Observações microscópicas da viabilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 72 h de tratamento sem o extrato aquoso das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth (A), com a CI_{50} (B) e duas vezes a CI_{50} (C). Os parasitas foram analisados através de microscopia confocal. Em A, o grupo controle, onde as células apresentam morfologia normal e flagelos longos (seta). Em B, observam-se pequenas alterações nas formas e aumento celular das promastigotas tratadas com 300 $\mu\text{g/mL}$ do extrato (setas). Em C, a concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ deformou as células para arredondadas, causou perda de flagelo e lise celular (setas).

Diversos extratos de plantas têm sido relatados por afetar a produção de NO por macrófagos de murinos (Napolitano et al., 2005). Macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com o extrato aquoso por 72 h, e comparados com o controle, e os sobrenadantes das suas culturas foram avaliados para verificar a concentração de nitrito. A figura 4 mostra que os macrófagos quando tratados com 600 e 1200 $\mu\text{g/mL}$ do extrato produzem significativamente mais NO do que o grupo controle. Os macrófagos tratados com a CI_{50} (300 $\mu\text{g/mL}$) produzem o dobro de NO em comparação aos não tratados, porém esses valores não foram estatisticamente significantes.

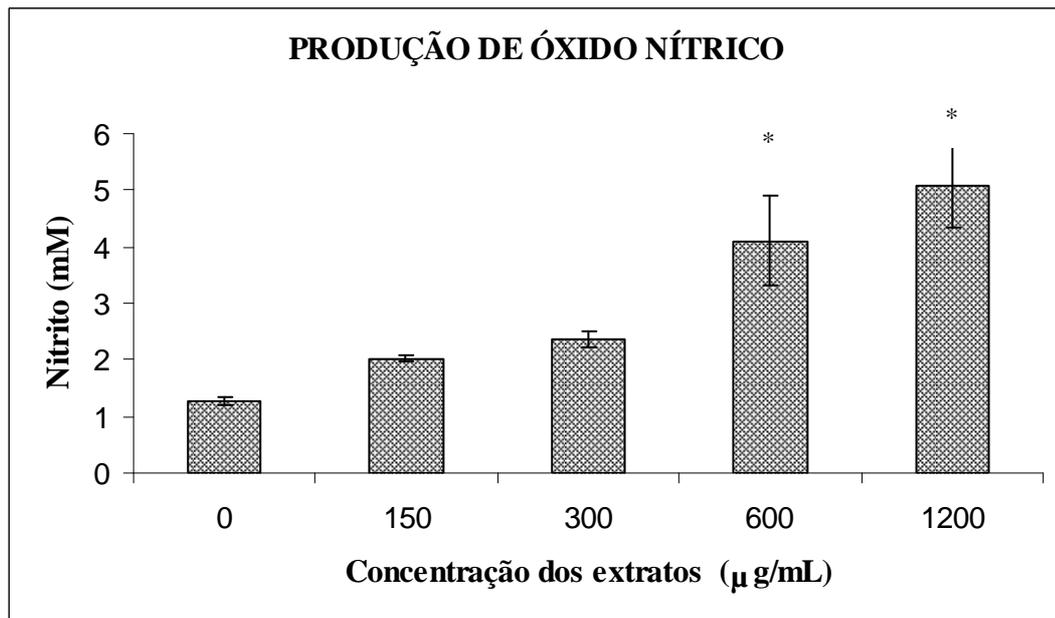


Figura 4. Efeito do extrato aquoso das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth na produção de Óxido Nítrico por macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram tratados com o extrato nas concentrações de 150, 300, 600 e 1200 µg/mL por 72 h. A concentração 0 µg/mL representa o grupo controle (sem o extrato). Os sobrenadantes obtidos da cultura foram usados para determinar a concentração de nitrito pela reação de Griess. Apenas as concentrações de 600 e 1200 µg/mL foram estatisticamente significantes quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). Cada barra representa o desvio padrão do experimento realizado.

Os resultados sugerem que o extrato aquoso de *D. grandiflora* é capaz de ativar os macrófagos e estimular a produção de NO por essas células em cultura. Como o extrato influencia a produção de NO ainda é desconhecido. Resultados semelhantes foram obtidos por Andrade et al. (1999), que relataram a produção de NO por células peritoneais de murinos, estimulada pela lectina de *D. grandiflora*, *in vitro* e *in vivo*.

Segundo Mendonça-Filho et al. (2004), o NO inibe a atividade cisteína proteinase das leishmanias, um fator de virulência destes microrganismos, levando à inibição metabólica dos resíduos reativos de cisteína, além do bloquear o processo de diferenciação das amastigotas em promastigotas. O NO é um oxidante leishmanicida que exerce efeitos estáticos e/ou lítico em ambas as fases de desenvolvimento do parasita, sendo mais citotóxico para as formas amastigotas intracelulares (Mendonça-Filho et al., 2004). Futuros estudos

podem investigar a infecção de macrófagos em cultura por parasitas do gênero *Leishmania*, tratados com a espécie *D. grandiflora*, a fim de explorar a indução da produção de NO em macrófagos ativados por microrganismos e verificar sua atuação no controle parasitário.

A busca de plantas com atividade antimicrobiana também tem aumentado nas últimas décadas em muitos países, devido a sua riqueza de constituintes, como os compostos fenólicos e flavonóides, os quais possuem potente ação antibacteriana (Silva et al, 2010a). No presente estudo, o extrato aquoso também foi avaliado quanto à atividade antibacteriana, contra cepas de *S. aureus* com perfil de resistência, obtidas de isolados clínicos, mostrando efeito inibitório sobre o crescimento de todas as cepas testadas. Os resultados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Cepas de *Staphylococcus aureus* usadas e susceptibilidade ao extrato aquoso das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth.

Cepa	CIMs ($\mu\text{g/mL}$)		
	Extrato	Clorafenicol	Ampicilina
02	3.125	0,098	0,012
670	3.125	R	R
672	1.562,5	6,25	0,78
677	3.125	0,195	R

R- resistência

Segundo Aligianis et al. (2001), extratos vegetais com CIM até 500 $\mu\text{g/mL}$ são considerados como agentes de forte inibição, CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g/mL}$ possuem inibição moderada e acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ fraca inibição. Deste modo, na tabela 2 pode-se observar que houve uma fraca inibição do crescimento microbiano pelo extrato aquoso de *D. grandiflora*. Por outro lado, Davet et al. (2009) relataram que a concentração inibitória mínima acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ é alta, uma vez que a inibição pode ocorrer por outros mecanismos que não os tradicionais (processos de inibição de síntese de ácidos nucleicos, de enzimas ou mesmo por alterações no pH do meio).

Através dos resultados da CCD, pode-se afirmar que os extratos de *D. grandiflora* contêm flavonóides e taninos, substâncias que se mostram ativas contra microrganismos (protozoários, bactérias e fungos), conforme relatado anteriormente na literatura (Schinor et al., 2006; Silva et al., 2009; Silva et al., 2010b). Os efeitos observados no presente estudo podem ser devido à presença dos mesmos.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais ocorre pela ação conjunta de compostos químicos presentes nas plantas, e não pela atividade de compostos isolados (Schinor et al., 2006). A ausência dos demais metabólitos secundários no extrato aquoso de *D. grandiflora*, pode sugerir a baixa atividade em relação às cepas testadas. Este resultado não indica ausência de atividade antimicrobiana, mas sim que o uso destes extratos para fins terapêuticos seria inviável por ser necessária uma dose elevada para o efeito esperado (Davet et al., 2009).

CONCLUSÃO

O extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* apresentou melhor atividade *in vitro* para *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Os resultados da microscopia confocal sugerem uma atividade citostática, sendo necessárias concentrações mais elevadas para obter uma ação citotóxica frente aos parasitas. Ainda foi constatada a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais tratados com o extrato aquoso, e sua ação frente a cepas de *S. aureus* com perfil de resistência, obtidas de isolados clínicos. A atividade antimicrobiana, junto com a atuação citostática dos extratos frente às leishmanias, pode ser favorável contra as infecções secundárias nas úlceras leishmanióticas. A estimulação da produção de NO reforça a atuação dos macrófagos frente aos microrganismos. Pesquisas futuras são importantes para investigar o caráter citotóxico dos extratos, além da utilização de modelos de infecção *in vivo* para melhor avaliar as atividades dessa espécie. É necessário o fracionamento dos extratos e isolamento de metabólitos secundários de *D. grandiflora*, a fim de identificar os componentes ativos responsáveis pelas ações encontradas.

REFERÊNCIAS

- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, and Ioanna BC 2001. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *J Agric Food Chem* 49(9): 4168-4170.
- Alvarenga DD, Escalda PMF, Da Costa ASV, Monreal MTFD 2010. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. *Rev Soc Bras Med Trop* 43(2): 194-197.
- Andrade JL, Arruda S, Barbosa T, Paim, Ramos MV, Cavada BS, Barral-Neto M 1999. Lectin induced NO production. *Cell Immunol* 194(1): 98-102.
- Batista JS, Almeida RN, Bhattacharyya J 1995. Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. *J Ethnoph* 45(3): 207-210.
- Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM, Amaral FMM, Rebelo JMM, Guerra RNM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF 2006. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 16 (Supl.): 631-637.
- Catão RMR, Barbosa-Filho JM, Lima EO, Pereira MSR, Silva MAR, Arruda TA, Antunes RMP 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. *Ver Bras Anal Clin* 42(1): 9-14.
- Chagas AP, Muller AH, Soares MBP, Garcez LM 2010. Potencial anti-leishmania e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). *Rev Pan-Amaz Saúde* 1(1): 117-124.
- Davet A, Virtuoso S, Dias JFG, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG 2009. Atividade antibacteriana de *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae. *Rev Bras Farmacogn* 19(2B): 561-564.
- Dutra RC, Braga FG, Coimbra ES, Silva AD, Barbosa NR 2009. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. *Rev Bras Farmacogn* 19(2A): 429-435.
- Guimarães LRC, Rodrigues APD, Marinho PSB, Muller AH, Guilhon GMS, Santos LS, Nascimento JLM, Silva EO 2010. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasitol Res* 107(5): 1075-81.
- Matos FJA 2009. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Editora da UFC.
- Mattei R, Leite JR, Tufik S 1995. A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandiflora* martius ex bentham. *São Paulo Med J* 113(1): 687-692.
- Mendonça-Filho RR, Rodrigues IA, Alviano DS, Santos ALS, Soares RMA, Alviano CS, Lopes AHCS, Rosa MSS 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Res Microbiol* 155(3): 136-146.

- Monzote L, García M, Montalvo AM, Miranda RSM 2010. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105(2): 168-173.
- Moreira RCR, Costa GC, Lopes TC, Bezerra JL, Guerra RNM, Rebelo, JMM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, COSTA JML 2007. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). *Rev Bras Farmacogn* 17(1): 59-63.
- Nakamura CV, Santos AO, Vendrametto MC, Luize OS, Dias Filho BP, Cortez DAG, Nakamura TU 2006. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Rev Bras Farmacogn* 16 (1): 61-66.
- Napolitano DR, Mineo JR, de Souza MA, de Paula JE, Espindola LS, Espindola FS 2005. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *Journal of Ethnopharmacol* 99: 37-41.
- Oliveira VCS, Moura DMS, Lopes JAD, Andrade PP, Silva NH, Figueiredo RCBQ 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotas. *Parasitol Res* 104(5): 1053-1059.
- Rocha LG, Aragão CFS, Loiola MIB, Bezerril RA, Paiva NRF, Holanda CMCX, Brito MEF 2009. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn* 19(1A): 51-56.
- Sá RCS, De Oliveira LEG, Nóbrega FFF, Bhattacharyya J, De Almeida RN 2010. Antinociceptive and Toxicological Effects of *Dioclea grandiflora* Seed Pod in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1-6.
- Schinor EC, Salvador M J, Tomaz JC, Pral EMF, Alfieri SC, Albuquerque S, Ito IY, Dias DA 2006. Biological activities and chemical composition of crude extracts from *Chresta exsucca*. *Rev Bras Cienc Farm* 42 (1): 83-90.
- Silva JG, Pereira MSV, Gurgel APD, Siqueira-Junior JP, Souza IA 2009. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. *Rev Bras Farmacogn* 19(3): 790-794.
- Silva LLS, Lima OE, Nascimento SC, Mota DL, Silva NH, De Almeida ER, Silva MGS 2010a. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae. *Rev Bras Farmacogn* 20(2): 208-214.
- Silva CF, Athayde ACR, Silva WW, Rodrigues OG, Vilela VLR, Marinho PVT 2010b. Avaliação da eficácia de taboa (*Typha domingensis* Pers.) e batata-de-purga [*Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples] *in natura* sobre nematóides gastrintestinais de caprinos, naturalmente infectados, em clima semi-árido. *Rev Bras Pl Med* 12(4): 466-471.

Siqueira EP, Souza-Fagundes EM, Sobral MEG, Alves TMAA, Rabello A, Zanil CL 2010. Leishmanicidal activities of the extract from *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, Myrtaceae. *Rev Bras Farmacogn* 20(3): 416-421.

Vera LA, Santos JB, Macêdo VO, Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG 2001. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 34(3): 233-237.

Vera LA, Santos JB, Macêdo VO, Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG, Santo JB 2006. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbicas isoladas de úlceras leishmanióticas, em Corte de Pedra, BA. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(1): 47-50.

Wagner H, Bladt S 1996. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas* Springer, Second edition, XV, 384 p.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A análise fitoquímica dos extratos das folhas de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth evidenciou a presença de flavonóides, flavonas, xantonas e taninos condensados.
- O extrato aquoso apresentou melhor atividade *in vitro*, em relação ao extrato etanólico, para *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, apresentando CI_{50} de 300 $\mu\text{g/mL}$.
- Através da microscopia confocal, foram observadas alterações na morfologia típica dos parasitas e perda da motilidade celular.
- Os resultados da CI_{50} e da análise microscópica sugerem uma atividade citostática, sendo necessárias concentrações mais elevadas para obter uma ação citotóxica frente aos parasitas.
- O extrato aquoso induziu a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais.
- O extrato aquoso mostrou atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* com perfil de resistência, obtidas de isolados clínicos.
- Pesquisas futuras são necessárias para a investigação do caráter citotóxico dos extratos, da atividade em infecções *in vivo*, assim como o fracionamento dos extratos e isolamento de metabólitos secundários de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth, a fim de identificar os componentes ativos responsáveis pela ação encontrada contra parasitas do gênero *Leishmania*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA R.N.; NAVARRO D. S; Analgesic effect of dioclenol and dioflorin isolated from *Dioclea grandiflora*. **Pharmaceutical Biology**, 38(5): 394–5, 2000.

ALMEIDA A.P. CÔRTEZ S.F.; FERREIRA A.J.; LEMOS V.S. Increase on the coronary flow induced by dioclein in isolated rat heart. **Life Sciences**, 70(10): 1121-8, 2002.

ALMEIDA E.R.; ALMEIDA R.N.; NAVARRO D.S.; BHATTACHARYYA J.; SILVA B.A.; BIRNBAUM J.S.J. Central antinociceptive effect of a hydroalcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. **Ethnopharmacol**, 88(1): 1-4, 2003.

ALMEIDA, L.L. **Estudo Morfoquantitativo dos Rins de Camundongos (*Mus musculus*) Tratados com Extrato Aquoso de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth. (FABACEAE)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2005.

ALVARENGA, D.D.; ESCALDA, P.M.F.; DA COSTA, A.S.V.; MONREAL, M.T.F.D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(2): 194-7, 2010.

ANDRADE J.L; ARRUDA S.; BARBOSA T.; PAIM L. RAMOS M.V.;CAVADA B.S.; BARRAL-NETTO M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunology**, 194 (1): 98-102, 1999.

ANDRADE M.S.; BRITO, M.E.F.; DA SILVA, S.T.; ISHIKAWA E.; CARVALHO S.M.S.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Novo surto de leishmaniose tegumentar americana em área de treinamento militar na Zona da Mata norte do Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(5): 594-6, 2009.

ARRAES, S.M.A.A; MARINI, M.T., MARTELLO D.; SILVEIRA T.G.V.; LONARDONI, M.V.C; NANNI, M.R. Investigação sorológica de casos subclínicos de leishmaniose tegumentar após um surto em uma localidade endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(2): 205-8, 2008.

BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, M.E.; BARRAL, A. Human Leishmania cytokines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Bahia, 31(1): 149-155, 1998.

BARREIROS, A.L.B.S. **Contribuição ao estudo fotoquímico de *Dioclea lasiophylla***. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 2000.

BATISTA, J. S.; ALMEIDA, R. N.; BHATTACHARYYA, J. Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 45(3): 207-10, 1995.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. **Clinical Infectious Diseases**, 24(4): 684-703, 1997.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(Supl): 631-7, 2006.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, Feridas Bravas e Kalazar. **Ciência e Cultura, Edemias/ Artigos**, São Paulo 55(1): 34-7, 2003.

CATÃO, RM. R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.R.; SILVA, M.A.R.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 42(1): 9-14, 2010.

CHAGAS A.P.; MULLER A.H.; SOARES M.B.P.; GARCEZ L.M. Potencial anti-leishmania e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 1(1): 117-24, 2010.

COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMAPAI, R.N.R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(4): 424-7, 2008.

DE ALMEIDA, E.R.; XAVIER H.S.; CHAVES T.M.; COUTO G.B.L.; ARAGÃO-NETO A.C.; SILVA A.R.; DA SILVA L.L.S. Anxiolytic and anticonvulsant effects of dioclenol flavonoid isolated from stem bark of *Dioclea grandiflora* on mice. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, 2(4): 44-51, 2010.

FETROW, C. W., AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 743p., 2000.

FIGUEIRAL, L.P.; ZANOTTIL, M.; PINHEIROL, F.G.; FRANCOL, A.M.R. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania sp* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(5): 512-14, 2008.

GIL, E.S.; PAULA, J.R.; NASCIMENTO, F.R.F.; BEZERRA, J.C.B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 29(3): 223-30, 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7(3): 338-49, 2004.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, 44: 1-39, 2000.

HIBBS, J. B. Jr., TAINTOR, R., VAVRIN, Z. & RACHLIN, E., Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule, **Bioch. Biophys. Res. Commun**, 157(1): 87-94.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-American. **Nature**, 273: 595-600, 1978.

LEMOS V.S.; FREITAS M.R.; MULLER B.; LINO Y.D.; QUEIROGA C.E.G; CORTES S.F. Dioclein, a new nitric oxide and endothelium– dependent vasodilator flavonoid. **European Journal of Pharmacology**, 386(1): 41-6, 1999.

LIMA MS, ALBUQUERQUE DA, IBAÑEZ OM, SANT'ANNA O. Inflammatory cutaneous reaction induced by the lectin of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 88(4): 599-603, 1993.

MACHADO, J.G.; HOFFMANN J.L.; KRAUSE, V.L.K.; DA SILVA, A.V.; DIAS-MELICIO, L.A.; LANGONI, H. Cell-mediated immune response to *Leishmania chagasi* experimental infection of BALB/c immunosuppressed mice. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 16(1): 131-46, 2010.

MAIA- ELKHOURY, A.N.S. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(12): 2941-7, 2008.

MARZOCHI, M.A.C.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentar and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthrozoosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, 10(Supl. 2): 359- 75, 1994.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Editora da UFC, 2009.

MATTEI, R.; LEITE, J.R.; TUFIK, S. A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandiflora* martius ex benth. Department of Psychobiology, Escola Paulista de Medicina - São Paulo, Brazil. **São Paulo Medical Journal/RPM**, 113(1), 1995.

MOITINHO, L.M.N.; de FREITAS, L.A.R.; MARBACK, E.F.; MARBACK, R.L. Papel da imunoistoquímica no diagnóstico das alterações oculares na leishmaniose tegumentar americana. Relato clínico-patológico de cinco casos. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, 68 (3): 152-5, 2009.

MONTE NETO, R.L.; SOUSA, L.M.A.; DIAS, C.S.; BARBOSA FILHO, J.M.; OLIVEIRA, M.R.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, 127(1): 215–21, 2011.

MONZOTE L.; GARCÍA M.; MONTALVO A.M.; MIRANDA R.S.M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 105(2): 168-73, 2010.

MOREIRA, R.C.R.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; BEZERRA, J.L.; GUERRA, R.N.M.; REBELO, J.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; COSTA, J.M.L. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, 17(1): 59-63, 2007.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, T.U. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 16(1): 61-6, 2006.

NEITZKE, H.C.; SCODRO, R.B.L.; CASTRO, K.R.R.; SVERSUTTI, A.C.D.; SILVEIRA, T.G.V.; TEODORO, U. Pesquisa de infecção natural de flebotomíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(1): 17-22, 2008.

NUNES, R.K. **Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora mato-grossense**. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

SÁ, R.C.S.; DE OLIVEIRA, L.E.G.; NÓBREGA, F.F.F.; BHATTACHARYYA, J.; DE ALMEIDA, R.N. Antinociceptive and Toxicological Effects of *Dioclea grandiflora* Seed Pod in Mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

SAMPAIO, R.N.R.; LUCAS, I.C.; COSTA FILHO, A.V. O uso da associação azitromicina e N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 84(2): 125-8, 2009.

SANTOS, T.A.B.; YOSHIOKA, M.K., MIYAGUI, M.L. Leishmaniose visceral. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2(25): 260, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=260>.

SCHEIBEL, L.W., 2005. Antiprotozoários. In: CRAIG, C. R., STITZEL, R. E. *Farmacologia moderna: com aplicações clínicas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 572-585.

SILVA, E.S.; CONTJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIÚZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 96(3): 285-91, 2000.

SILVA, L.L.S. **Aspectos Farmacológicos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth. (FABACEAE): Atividade Antimicrobiana, Citotóxica e Antitumoral**. 124p. Tese (Doutorado-Área de concentração em Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2003.

SILVA, L.L.S.; LIMA, E.O.; NASCIMENTO, S.C.; LEITE, S.P. Estudo toxicológico do extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde-REBRASA**, 7(2): 113-20, 2003.

SILVA, A.F.V.P. **Aspectos Morfológicos e Morfométricos de Hepatócitos de Camundongos (*Mus musculus*) Tratados com Extrato Aquoso de *Dioclea grandiflora* (FABACEAE)**. 49p. Dissertação (Mestrado- Área de concentração em Morfologia Aplicada) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

SILVA, L.L.S.; LIMA, DE OLIVEIRA, E.; DO NASCIMENTO, S.C.; DA MOTA, D.L.; DA SILVA, N.H.; DE ALMEIDA, E.R.; DA SILVA, M.G.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(2): 208-14, 2010.

TEIXEIRA E.H.; NAPIMOGA M.H.; CARNEIRO V.A.; DE OLIVEIRA T.M.; CUNHA R.M.; HAVT A; MARTINS J.L.; PINTO V.P.; GONÇALVES R.B.; CAVADA B.S. In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J. Appl. Microbiol.** 101(1): 111-6, 2006.

VERA, L.A.; SANTOS, J.B.; MACÊDO, V.O.; MAGALHÃES, A.V.; CIUFFO, I.A.; SANTOS, C.G. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34(3): 233-7, 2001.

VERA, L.A.; SANTOS, J.B.; MACÊDO, V.O.; MAGALHÃES, A.V.; CIUFFO, I.A.; SANTOS, C.G.; SANTOS, J.B. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbicas isoladas de úlceras leishmanióticas, em Corte de Pedra, BA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(1): 47-50, 2006.

VILLARREAL, MARIANA RUIZ. In: Life cycle of the parasites from the genus *Leishmania*, the cause of the disease Leishmaniasis: <http://en.wikipedia.org/wiki/Leishmania> [On line, 2008] acessado em 03 de Março de 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas**. Springer, Second edition, XV, 384 p.,1996.