

**DANIELA SARAIVA CORRÊA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* E ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* DE ESPECIES VEGETAIS E DO SESQUITERPENO POLIGODIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, para exame de defesa.

**Área de concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública - PLSP

**Orientador:** Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

**SÃO PAULO**

**2010**

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Corrêa, Daniela Saraiva

Avaliação “in vitro” da atividade anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi* de espécimes vegetais / Daniela Saraiva Corrêa - São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

1. Produtos biológicos 2. Leishmaniose 3. Doenças de Chagas 4. Plantas medicinais 5. *Drimys* 6. Sesquiterpenos

SES/CCD/CD-240/10

*Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado e ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura

Ao Dr. André Gustavo Tempone Cardoso, pela orientação, confiança, durante a realização dessa dissertação.

A Dra Patrícia Sartorelli, pela amizade e por todo o apoio durante a iniciação científica, que culminou no primeiro passo para a realização do mestrado.

Ao Prof. Prof Dr. João H. G. Lago (Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema), por ter cedido o polígono testado nesta dissertação e pela sua colaboração primordial no trabalho.

As alunas de mestrado do laboratório de toxicologia, Juliana, Walkyria e Érika pela infinita ajuda na pesquisa, pelo convívio, cumplicidade, amizade e momentos de descontração.

A Juliana Quero Reimão, pela ajuda incondicional no laboratório, pela correção da tese e especialmente por todo apoio no momento final da conclusão do trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Helena Taniguchi pela coleta da espécie *Bidens pilosa* L.

Ao Dr. Harri Lorenzi pela identificação do material vegetal.

Ao Vicente e Matília, pela manutenção do laboratório.

Aos meus amigos pela cumplicidade e pelo infinito apoio durante a elaboração dessa tese.

Aos meus pais Júlia e Pedro, pelo o apoio, confiança e incentivo durante todos os momentos, pois o que sou e tudo que consegui devo a eles.

*“A arte da ciência é tornar certo o incerto”*

*“(...) Quando ignoro a razão das coisas fecho os olhos e aceito a vontade de nosso senhor, especialmente se há vantagem. Mas a curiosidade nunca desaparece do espírito da gente”.*

Graciliano Ramos (2005)

## RESUMO

Dentre as principais doenças tropicais, aquelas causadas por protozoários apresentam alta morbidade e/ou mortalidade, sendo representadas pela Leishmaniose e Doença de Chagas. Afetam grandes populações marginais ao processo econômico globalizado, e desta forma, não são vistas como mercados potenciais. O restrito arsenal terapêutico disponível para estas protozooses, associado aos severos efeitos adversos, demonstra a necessidade imediata de pesquisa por alternativas terapêuticas. Assim, o presente trabalho avaliou a atividade antiparasitária de oito espécies vegetais: *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae), *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. (Rubiaceae), *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl (Rosaceae), *Hedychium coronarium* Koen (Zingiberaceae), *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) e *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae), com o objetivo de selecionar aquelas com atividade anti-*Leishmania*. Os extratos orgânicos foram submetidos aos testes *in vitro* com promastigotas de *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (V.) brasiliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. As espécies *B. pilosa*, *H. coronarium*, *D. brasiliensis* e *P. pseudocaryophyllus* apresentaram atividade anti-*Leishmania*, mostrando valores de Concentração Efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) entre 22,76 e 500 µg/mL. As espécies *B. pilosa*, *H. coronarium* e *D. brasiliensis* foram fracionadas por meio de diferentes técnicas cromatográficas, visando ao isolamento dos compostos ativos. O fracionamento biomonitorado da espécie *D. brasiliensis* levou ao isolamento do composto poligodial. A avaliação da atividade antiparasitária do poligodial demonstrou atividade contra promastigotas de *Leishmania* e tripomastigotas de *T. cruzi*, com valores promissores (CE<sub>50</sub> = 2 µg/mL), quando comparados ao benznidazol (CE<sub>50</sub> = 38 µg/mL). O poligodial não apresentou atividade contra a forma amastigota de *L. (L.) chagasi*, porém, induziu alterações ultraestruturais nas formas promastigotas, conforme observado por microscopia eletrônica de transmissão. Os principais danos foram verificados nas mitocôndrias e núcleo, além de perda de organelas citoplasmáticas e alterações na membrana plasmática. Os dados observados demonstram a importância das plantas medicinais como fonte de estudos para a busca de novos fármacos para doenças tropicais negligenciadas.

## ABSTRAT

Among the major tropical diseases, those caused by protozoa present high morbidity, represented by leishmaniasis and Chagas disease. Affect large populations peripheral to the global economic process, and thus are not seen as potential markets. The limited therapeutic options available for these protozoans, associated with severe adverse effects, demonstrate the immediate need to search for alternative therapies. Thus, this study evaluated the antiparasitic activity of eight plant species: *Bidens pilosa* L. (Asteraceae), *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae), *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. (Rubiaceae), *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae), *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl (Rosaceae), *Hedychium coronarium* Koen (Zingiberaceae), *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) and *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae), with the objective of selecting those with anti-leishmanial activity. The organic extracts were *in vitro* tested with *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes. The species *B. pilosa*, *H. coronarium*, *D. brasiliensis* and *P. pseudocaryophyllus* showed activity against *Leishmania*, showing Effective Concentration 50% (EC<sub>50</sub>) values between 22.76 and 500 µg/mL. The species *B. pilosa*, *H. coronarium* and *D. brasiliensis* were fractionated by different chromatographic techniques, aiming to isolate the active compound. The bioassay-guided fractionation of *D. brasiliensis* led to the isolation of the compound polygodial. The evaluation of antiparasitic activity of polygodial demonstrated activity against *Leishmania* promastigotes and *T. cruzi* trypomastigotes, with promising EC<sub>50</sub> value (2 µg/mL) when compared to benznidazole (EC<sub>50</sub> = 38 µg/mL). Polygodial showed no activity against *L. (L.) chagasi* amastigotes, however, induced ultrastructural changes in promastigotes, as observed by transmission electron microscopy. The main damage was observed in mitochondria and nucleus, loss of organelles and changes in the plasma membrane. The observed data show the importance of medicinal plants as a source of new drugs for neglected tropical diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGAS

AcOEt	acetato de etila
<i>B. Pilosa</i>	<i>Bidens pilosa</i> L.
<i>C. biflora</i>	<i>Capraria biflora</i> L.
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva 50%
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano, cloreto de metileno
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
<i>D. brasiliensis</i>	<i>Drimys brasiliensis</i> Miers
<i>E. japonica</i>	<i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb) Lindl
FPLC	Fluid pressure liquid chromatography
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H	Horas
<i>H. coronarium</i>	<i>Hedychium coronarium</i> Koen
I.S.	Índice de seletividade,
IC 95%	Intervalo de confiança 95%
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania</i> (V) <i>braziliensis</i>
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i>
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i>
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MeOH	Metanol
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-di-phenyltetrazolium bromide
<i>O. gratissimum</i>	<i>Ocimum gratissimum</i> L.
OMS	Organização mundial da saúde
<i>P. pseudocaryophyllus</i>	<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Laudrum
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rpm	Rotação por minuto
Tr	Tempo de retenção
<i>U. guianensis</i>	<i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J. F. Gmel
U.V.	Ultra violeta
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde- OMS)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Atividade anti- <i>Leishmania</i> das frações das espécies vegetais, testadas a 500 µg/mL em formas promastigotas. A viabilidade celular foi verificada pelo método do colorimétrico do MTT.....	<b>78</b>
<b>Tabela II:</b> Determinação da CE <sub>50</sub> das frações ativas em formas promastigotas. A viabilidade celular foi verificada pelo método do colorimétrico do MTT.....	<b>79</b>
<b>Tabela III:</b> Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt das folhas de <i>B. pilosa</i> .....	<b>84</b>
<b>Tabela IV:</b> Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt do caule de <i>B. pilosa</i> .....	<b>87</b>
<b>Tabela V:</b> Valores de CE <sub>50</sub> do poligodial e fármacos padrões obtidos pela incubação com promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> e células LLC-MK2. A viabilidade celular foi verificada pelo método do MTT.....	<b>93</b>
<b>Tabela VI:</b> CE <sub>50</sub> e Índice de Seletividade para <i>T. cruzi</i> do poligodial e do extrato bruto de <i>D. brasiliensis</i> .....	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Taxonomia geral do gênero <i>Leishmania</i> .....	<b>22</b>
<b>Figura 2:</b> Observação microscópica de protozoários do gênero <i>Leishmania</i> . (a) Forma promastigota; (b) Forma amastigota.....	<b>23</b>
<b>Figura 3:</b> Aspecto clínico das leishmanioses. (a) Leishmaniose cutânea - lesão ulcerada única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; (b) Leishmaniose cutânea-mucosa indeterminada - lesões ulceradas em palato mole e lábio superior com áreas de infiltração local (hiperemia nas bordas); (c) Leishmaniose visceral - período final; (d) Leishmaniose cutânea-difusa - polimorfismo lesional (lesões em placa infiltrada, tubérculos em face, orelha e membro superior).....	<b>24</b>
<b>Figura 4:</b> Fêmea de Flebotomíneo adulto .....	<b>25</b>
<b>Figura 5:</b> Ciclo de transmissão da leishmaniose .....	<b>27</b>
<b>Figura 6:</b> Estrutura química proposta do antimoniato de N-metilglucamina.....	<b>28</b>
<b>Figura 7:</b> Estrutura química: (a) anfotericina; (b) pentamidina.....	<b>28</b>
<b>Figura 8:</b> Estrutura química da miltefosina.....	<b>30</b>
<b>Figura 9:</b> Estrutura química da paromomicina.....	<b>30</b>
<b>Figura 10:</b> a) Forma promastigota; b) Forma amastigota e c) Forma epimastigota.....	<b>32</b>
<b>Figura 10:</b> Observação microscópica de protozoários do gênero <i>Trypanosoma</i> . (a) formas amastigotas intracelulares; (b) músculo cardíaco de camundongo infectado. Formas amastigotas (seta); (c) formas tripomastigotas sanguíneas; (d) formas epimastigotas.....	<b>33</b>
<b>Figura 11:</b> Apresentações clínicas da forma crônica da doença de Chagas. (a) coração de paciente chagásico que faleceu com insuficiência cardíaca, mostrando dilatação das cavidades ventriculares e afilamento da ponta dos ventrículos esquerdo e direito; (b) megaesôfago e megaestômago; (d) megacólon.....	<b>35</b>
<b>Figura 12:</b> Morfologia externa do Triatomíneo.....	<b>36</b>
<b>Figura 13:</b> Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 14:</b> Estrutura química: (1) nifurtimox e (2) benzonidazol.....	<b>38</b>
<b>Figura 15:</b> Estruturas químicas de compostos de origem vegetal. Morfina (a),	

quinina (b); e estricnina (c).....	44
<b>Figura 16:</b> Rota biossintética de produção dos metabólitos secundários.....	45
<b>Figura 17:</b> Compostos de origem vegetal com atividade anti- <i>Leishmania</i> colesterol isolado de <i>Cassia fistula</i> (a); ácido ursólico (b) e ácido linóico, isolado de <i>Miconia</i> sp (c).....	47
<b>Figura 18:</b> Composto 1,4-dihidroxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-Z,6'-octadienil)-benzeno) isolado da espécie <i>Piper crassinervium</i> (Piperaceae).....	48
<b>Figura 19:</b> Espécime de <i>Bidens pilosa</i> . a) parte aérea da planta; b) e C) detalhe da inflorescência.....	50
<b>Figura 20:</b> Estrutura do composto 1-fenol-1,3-diino-5-eno-7-ol-acetato isolado da espécie <i>B. pilosa</i> .....	51
<b>Figura 21:</b> Espécime de <i>Capraria biflora</i> a) Ramo aéreo; b) detalhe da flor.....	52
<b>Figura 22:</b> Espécime de <i>Uncaria guianensis</i> . Detalhe do acúleo em forma de gancho (a); Detalhe da flor (b).....	54
<b>Figura 23:</b> Espécime de <i>Ocimum gratissimum</i> . Ramo aéreo com inflorescências (a); detalhe das floretas da inflorescência (b).....	55
<b>Figura 24:</b> <i>Eriobotrya japonica</i> . Haste do vegetal (a), detalhe dos frutos (b) e detalhe da inflorescência (c).....	57
<b>Figura 25:</b> Espécime de <i>Hedychium coronarium</i> . Ramo ereto (a) e (b); detalhe das flores (c).....	58
<b>Figura 26:</b> Espécime de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> .: Detalhe da folha (a); detalhe das flores (b).....	60
<b>Figura 27:</b> Espécime de <i>Drimys brasiliensis</i> . Ramo aéreo, detalhe da extremidade da inflorescência.....	61
<b>Figura 28:</b> Esquema de obtenção dos extratos orgânicos brutos.....	66
<b>Figura 29:</b> Partição Líquido-líquido .....	67
<b>Figura 30:</b> Esquema geral do fracionamento da fração em acetato de etila (folha) da espécie <i>Bidens pilosa</i> a partir da cromatografia de adsorção em coluna de sílica. Os quadrados pretos indicam as frações com atividade anti- <i>Leishmania</i> .....	69
<b>Figura 31:</b> Esquema geral do fracionamento da fração acetato de etila (caule) da espécie <i>Bidens pilosa</i> a partir da cromatografia de adsorção em coluna de sílica.....	69
<b>Figura 32:</b> Esquema geral do fracionamento da fração acetato de etila (folha)	

da espécie <i>Hedychium coronarium</i> a partir da cromatografia de exclusão molecular. Os quadrados pretos indicam as frações com atividade anti- <i>Leishmania</i> .....	71
<b>Figura 33:</b> Esquema geral do fracionamento da fração em hexano da espécie <i>Drimys brasiliensis</i> a partir da cromatografia de exclusão molecular. Os quadrados pretos indicam as frações originárias do composto isolado poligodial.....	73
<b>Figura 34:</b> Determinação da CE <sub>50</sub> da fração AcOEt da espécie <i>H. coronarium</i> em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. A viabilidade celular foi verificada pelo método do colorimétrico do MTT.....	80
<b>Figura 35:</b> Determinação da CE <sub>50</sub> da fração AcOEt da raiz da espécie <i>B. pilosa</i> em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. A viabilidade celular foi verificada pelo método do colorimétrico do MTT.....	80
<b>Figura 36:</b> Determinação da CE <sub>50</sub> da fração AcOEt da flor da espécie <i>B. pilosa</i> em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. A viabilidade celular foi verificada pelo método do colorimétrico do MTT.....	81
<b>Figura 37:</b> Determinação da CE <sub>50</sub> da fração AcOEt da folha da espécie <i>P. pseudocaryophyllus</i> em formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp. A viabilidade celular foi verificada pelo método do colorimétrico do MTT.....	81
<b>Figura 38:</b> Determinação da CE <sub>50</sub> da fração em hexano da casca do caule da espécie <i>D. brasiliensis</i> em formas promastigotas. A viabilidade celular foi verificada pelo método do colorimétrico do MTT.....	82
<b>Figura 39:</b> Placa cromatográfica dos extratos brutos de caule (c), folha (f), flor (fl) e raiz (r) de <i>B. pilosa</i> . Observação em câmara de ultravioleta à 254 nm.....	83
<b>Figura 40:</b> Cromatograma dos extratos brutos de <i>B. pilosa</i> . Em destaque estão os perfis das frações AcEOt. Observação em câmara de ultravioleta à 254 nm.....	83
<b>Figura 41:</b> Placas cromatográficas obtidas pelo fracionamento do extrato de AcOEt da folha de <i>B. pilosa</i> .....	85
<b>Figura 42:</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração BPFA 5 em coluna de fase reversa C18 em 214 e 254 nm (a) e varredura em arranjo de diodo de 190-400 nm (b).....	86
<b>Figura 43:</b> Observação por CCD das frações obtidas pelo fracionamento do extrato AcOEt do caule de <i>B. pilosa</i> . Revelação com sulfato	

cérico.....	88
<b>Figura 44:</b> Perfil cromatográfico da fração AcOEt da folha de <i>H. coronarium</i> obtida por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex LH-20 em sistema FPLC. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min de metanol. As setas indicam os picos correspondentes às frações que foram reunidas após leitura da densidade óptica em diferentes comprimentos de onda.....	89
<b>Figura 45:</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração 5 (f5h) em coluna de fase reversa C18 em 214 e 254 nm (a) e varredura em arranjo de diodos de 190-400 nm (b). As setas indicam os picos correspondentes às frações que foram reunidas.....	90
<b>Figura 46:</b> Perfil cromatográfico obtido por CLAE da fração LFAP5 em coluna de fase reversa C18 em 214 e 254 nm (a) e varredura com arranjo de diodos de 190-400 nm (b). As setas indicam os picos correspondentes às frações que foram reunidas.....	91
<b>Figura 47:</b> Estrutura do poligodial, isolado a partir dos extratos hexânico e etanólico das folhas e cascas do caule de <i>D. brasiliensis</i> .....	92
<b>Figura 48:</b> Atividade anti- <i>Leishmania</i> do poligodial em formas promastigotas, atividade anti- <i>T. cruzi</i> em formas tripomastigotas e citotoxicidade em células LLC-MK2. A viabilidade celular foi verificada pelo método do MTT.....	93
<b>Figura 49:</b> Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>Leishmania (L.) chagasi</i> incubados com poligodial. Promastigotas foram incubados em diferentes períodos. a) Controle sem droga; b, c, d) 15 minutos de incubação; e) 1 hora de incubação; f) 2 horas de incubação; g, h) 3 horas de incubação.....	96

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Leishmaniose.....	21
1.1.1 Breve histórico.....	21
1.1.2 Manifestação clínica e taxonomia da <i>Leishmania</i> .....	22
1.1.3 Vetor e reservatório.....	25
1.1.4 Ciclo de vida.....	26
1.1.5 Formas de tratamento.....	27
<b>1.2. Doença de Chagas.....</b>	<b>32</b>
1.2.1 Características gerais.....	32
1.2.2 Aspectos clínicos.....	34
1.2.3 Vetor e reservatório.....	36
1.2.4 Ciclo de transmissão.....	36
1.2.5 Formas de tratamento.....	37
<b>1.3 Metabólitos secundários de vegetais.....</b>	<b>40</b>
1.3.1 Plantas medicinais.....	40
1.3.2 Conhecimento etnobotânico de plantas medicinais.....	41
1.3.3 Metabólitos secundários de plantas.....	43
1.3.4 Metabólicos secundários isolados com atividade anti- <i>Leishmania</i> .....	46
1.3.5 Metabólicos secundários isolados com atividade anti- <i>Trypanosoma</i> .....	47
<b>1.4. Espécies vegetais estudadas: aspecto botânico, atividade biológica, uso e constituintes químicos.....</b>	<b>49</b>
1.4.1. <i>Bidens pilosa</i> L. (Família Asteraceae /compositae).....	49
1.4.1.1 Aspectos Botânicos e características gerais.....	49
1.4.1.2 Usos na medicina tradicional.....	50
1.4.1.3 Constituintes químicos e atividades biológicas.....	51

1.4.2 <i>Capraria biflora</i> L. (Família Scrophulariaceae).....	52
1.4.2.1 Aspectos botânicos e características.....	52
1.4.2.2 Uso na medicina tradicional.....	52
1.4.2.3 Constituintes químicos e atividade biológicas.....	52
1.4.3 <i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J. F. Gmel. (Família Rubiaceae).....	53
1.4.3.1 Aspectos botânicos e características gerais.....	53
1.4.3.2 Uso na medicina tradicional.....	53
1.4.3.3 Constituintes químicos e atividades biológicas.....	54
1.4.4 <i>Ocimum gratissimum</i> L. (Família Lamiaceae /Labiatae).....	55
1.4.4.1 Aspectos botânicos e características .....	55
1.4.4.2 Uso na medicina tradicional.....	56
1.4.4.3 Constituintes químicos e atividades biológicas.....	56
1.4.5 <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl. (Familia Rosaceae).....	56
1.4.5.1 Aspectos botânicos e características gerais.....	56
1.4.5.2 Uso na medicina tradicional.....	57
1.4.5.3. Constituintes químicos e atividades biológicas.....	57
1.4.6 <i>Hedychium coronarium</i> Koen (Família Zingiberaceae).....	58
1.4.6.1 Aspectos botânicos e características gerais.....	58
1.4.6.2 Uso na medicina tradicional.....	59
4.6.3 Constituintes químicos e atividades biológicas.....	59
1.4.7 <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	59
1.4.7.1 Aspectos botânicos e características gerais.....	59
1.4.7.2 Uso na medicina tradicional.....	60
4.7.3 Constituintes químicos e atividades biológicas.....	60
1.4.8. <i>Drimys brasiliensis</i> Miers (família Winteraceae).....	61
1.4.8.1 Aspectos botânicos e características gerais.....	61
1.4.8.2 Uso na medicina tradicional.....	61
1.4.8.3 Constituintes químicos.....	62
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
2.1 Objetivo Geral.....	63

2.2 Objetivo Específico .....	63
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	65
3.2 Obtenção dos extratos vegetais.....	66
3.3 Estudo da espécie <i>Bidens pilosa</i> L.....	67
3.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	67
3.3.2 Cromatografia em coluna.....	68
3.3.3 Cromatografia analítica em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).....	68
3.4 Estudo químico da espécie <i>Hedychium coronarium</i> Koen.....	70
3.4.1 Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex LH-20.....	70
3.4.2 Cromatografia analítica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	70
3.5 Estudo da espécie <i>Drimys brasiliensis</i> Miers.....	72
3.6 Avaliação da atividade biológica.....	74
3.6.1 Parasitas .....	74
3.6.2 Determinação da concentração efetiva 50% (CE <sub>50</sub> ) em <i>Leishmania sp</i> e <i>Trypanosoma. cruzi</i> .....	74
3.6.2.1 <i>Leishmania sp</i> .....	74
3.6.2.2 <i>Trypanosoma.cruzi</i> .....	75
3.6.3 Determinação da concentração efetiva 50% (CE <sub>50</sub> ) de compostos ativos em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> .....	75
3.6.3.1 Animais.....	76
3.6.4 Avaliação da citotoxicidade.....	76
3.7 Estudos ultraestruturais.....	76
3.8 Análises estatísticas.....	77
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>
4.1 Triagem das espécies vegetais e determinação da concentração efetiva 50% (CE <sub>50</sub> ) em <i>Leishmania</i> .....	78

4.2	Análise cromatográfica e atividade biológica de <i>Bidens pilosa</i> .....	82
4.2.1	Obtenção dos extratos e atividade anti- <i>Leishmania</i> .....	82
4.2.2	Análise dos constituintes do extrato AcOEt de folhas de <i>B. pilosa</i> .....	84
4.2.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência: fracionamento de BFFA 5.....	86
4.2.3	Análise dos constituintes do extrato AcOEt do caule de <i>B. pilosa</i> .....	87
4.3	Fracionamento cromatográfico e atividade biológica da espécie <i>Hedychium coronarium</i> .....	89
4.3.1	Cromatografia de exclusão molecular em coluna sephadex LH-20.....	89
4.3.2	Fracionamento de 5 (f5h) por CLAE.....	90
4.3.3	Análise da fração LFAP5 por CLAE.....	91
4.4	Estudo do poligodial.....	92
4.4.1.	Determinação da CE <sub>50</sub> em formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> e citotoxicidade.....	92
4.4.2	Estudo ultraestrutural do poligodial em <i>L.(L.) chagasi</i> .....	94
4.4.3	CE <sub>50%</sub> da atividade anti-Trypanosoma cruzi do poligodial.....	95
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>102</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>104</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>120</b>
	<b>Anexo 1:</b> Comitê de ética.....	<b>121</b>
	<b>Anexo 2:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do poligodial (δ, CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz).....	<b>122</b>
	<b>Anexo 3:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do poligodial (δ, CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).....	<b>123</b>

# 1.INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas causam um grande sofrimento a milhões de pessoas em todo mundo, principalmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, causando um forte impacto na economia e problemas à Saúde Pública (Trouiller *et al.*, 2001). Dentre as principais doenças tropicais, as causadas por protozoários apresentam alta morbidade e/ou mortalidade, sendo representadas pela leishmaniose e pela doença de Chagas. Essas enfermidades afetam grandes populações marginais ao processo econômico globalizado, e desta forma, não são vistas como mercados potenciais para indústrias farmacêuticas (Croft and Yardley, 2002; Who, 2010).

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, pois representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (Ministério da Saúde, 2007).

Apesar de acometerem, todos os anos, cerca de dois milhões de pessoas, espalhadas em 88 países de quatro continentes, as leishmanioses são doenças negligenciadas, ou seja, ignoradas pelas grandes indústrias farmacêuticas. Isso se explica por elas atingirem majoritariamente as populações menos favorecidas. Desse modo, devido ao baixo poder aquisitivo dos pacientes e em virtude dos recursos escassos dos países onde normalmente estas moléstias acontecem, a produção de medicamentos para enfrentá-las não geraria um lucro satisfatório para a iniciativa privada (Ferreira, 2010).

A leishmaniose visceral (LV), dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade (Ministério da Saúde, 2006).

Atualmente, a LV é endêmica em 62 países, com um total estimado de 200 milhões de pessoas sob risco de adquirirem a infecção. Aproximadamente

90% dos casos ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (OMS, 2001). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (Ministério da Saúde, 2006).

Por mais de noventa anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®), que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento. Estes medicamentos são tóxicos, nem sempre efetivos e com relatos de resistência (Croft e Coombs, 2003). O principal efeito adverso do Glucantime® é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização durante os dois primeiros trimestres de gravidez. Como tratamentos alternativos no Brasil, são utilizados a anfotericina B e suas formulações lipossomais e as pentamidinas, as quais são igualmente tóxicas ou possuem um custo elevado e difícil administração (Croft e Coombs, 2003).

A doença de Chagas, assim como a leishmaniose, apresenta dados alarmantes: é a maior causadora de mortalidade em algumas regiões da América do Sul, sendo responsável por 16 a 18 milhões de casos, tendo uma incidência de 700 a 800 mil novos casos por ano, sendo que 90 milhões de pessoas da América Latina estão expostas ao risco de adquirirem a doença (Who, 2010).

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitida ao homem através de insetos triatomíneos. Desde o final da década de 60 e início dos anos 70, dois fármacos têm sido usados para o tratamento específico da doença: o nifurtimox e o benznidazol. Porém, o nifurtimox não é mais comercializado no Brasil desde a década de 80 (Tempone *et al.*, 2007 e Who, 2010).

Esses medicamentos parecem ser eficientes apenas nas fases aguda ou crônica recente da doença (menos de 10 anos de contaminação), sendo contraindicados na fase crônica, onde a cura é bastante difícil. Além disso, possuem graves efeitos adversos, como alterações do sistema digestivo, náuseas, vômito, cólicas, intestinais e diarreia, além de manifestações cutâneas severas (Urbina, 2010).

Considerando as dificuldades do tratamento de ambas protozooses, verifica-se a relevância do estudo de novas alternativas terapêuticas, dentre as quais se incluem promissoramente os metabólitos secundários encontrados em plantas (Carvalho e Ferreira, 2001; Anthony *et al.*, 2005; Tempone *et al.*, 2007; Polonio e Efferth, 2008).

O reino vegetal é uma promissora ferramenta para investigação científica de novos medicamentos que possam vir a ser utilizados no tratamento das infecções do homem. A pesquisa por produtos oriundos de espécies vegetais tem se intensificado pela grande diversidade molecular, sendo primordial para produção de novos fármacos.

A flora é uma rica fonte de novos protótipos de fármacos, principalmente no Brasil, que abriga de 15% a 20% de toda a biodiversidade mundial, com cerca de 55 mil espécies vegetais (Lopes *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma* de diversas espécies vegetais da flora brasileira, evidenciando seu potencial para descoberta de novos compostos (Iwu *et al.*, 1994; Torres-Santos, 1999; Rocha *et al.*, 2005; Bezerra *et al.*, 2006; Braga *et al.*, 2007; Silva Filho *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2008, Lopes *et al.*, 2008, Menna-Barreto *et al.*, 2008 e Santos *et al.*, 2008, Calderón *et al.*, 2010).

## 1.1 Leishmaniose

### 1.1.1 Breve histórico

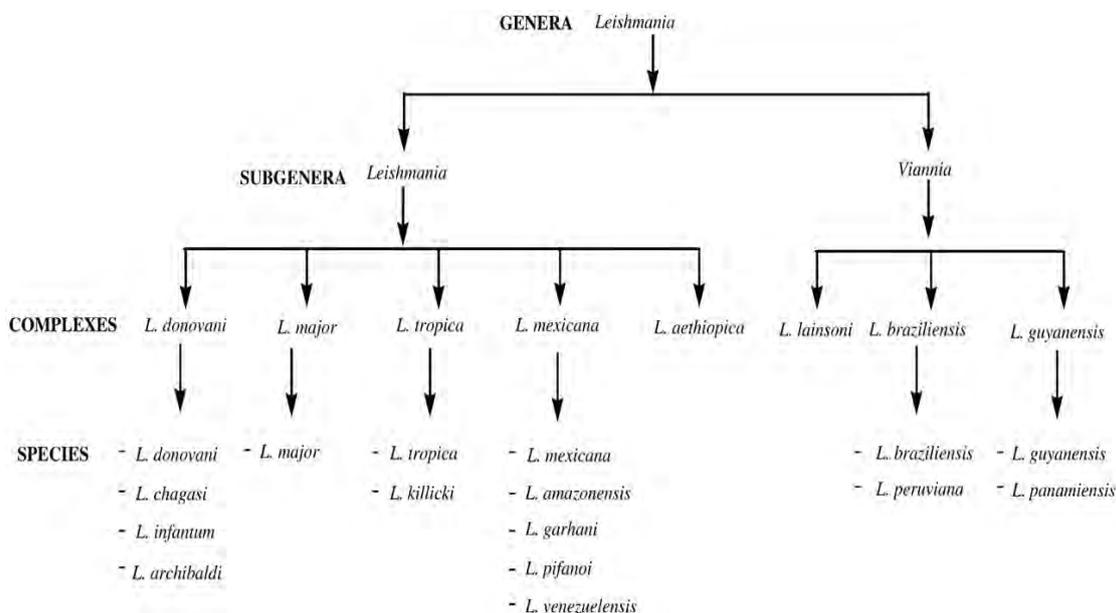
Existem relatos sobre a doença, no continente americano, desde a época colonial. Em 1571, Pedro Pizarro relatou que os povos situados nos vales quentes do Peru eram dizimados por uma doença que desfigurava o nariz, a qual foi posteriormente caracterizada como leishmaniose. A importância desta doença era tamanha, que as deformações provocadas chegaram a ser registradas em peças cerâmicas por artistas da época. A descoberta dos agentes etiológicos das leishmanioses, entretanto, só ocorreu o final do século XIX, quando Cunningham em 1885, na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de Calazar. Em 1898, o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do Botão do Oriente. Em 1903, Leishman e Donovan realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo Calazar indiano, denominado mais tarde de *Leishmania donovani*. Igualmente em 1903, Wright descreveu o parasita do Botão do Oriente, conhecido atualmente como *Leishmania tropica*. No continente americano, várias doenças que criavam lesões, freqüentes em determinadas regiões, eram chamadas de úlcera de Bauru ou ferida brava. A correlação destas lesões com um protozoário do gênero *Leishmania* foi estabelecida por Gaspar Vianna, em 1909, no Instituto Oswaldo Cruz, recebendo o nome de *Leishmania braziliensis* (apud Lainson e Shaw, 1978). Em 1993, a Organização Mundial da Saúde considerou a leishmaniose como a segunda doença de importância pública, causada por protozoário (OMS, 2001).

No Brasil, o primeiro caso de LV foi descrito por Mignone, em 1913. Tratava-se de um paciente procedente do município de Boa Esperança, no Mato Grosso (Alencar *et al*, 1991). Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas

(TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. Atualmente, no Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (Ministério da Saúde, 2006).

### 1.1.2 Manifestação clínica e taxonomia do gênero *Leishmania*

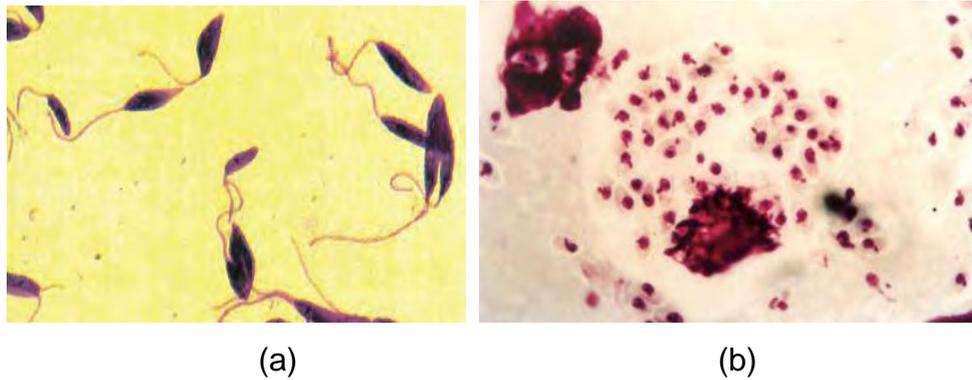
Segundo Mishra e colaboradores (2009), a leishmaniose no mundo pode ser agrupada em oito complexos para os seres humanos, sendo as principais espécies descritas na Figura 1. Os protozoários são pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae.



**Figura 1:** Taxonomia do gênero *Leishmania*.

Fonte: Mishra *et al.*, 2009

Enquanto a forma promastigota (Figura 2a) é flagelada e extracelular, a forma amastigota é intracelular e sem movimento (Figura 2b). A multiplicação dos amastigotas ocorre no interior de vacúolos parasitóforos em macrófago de diferentes tecidos, originando a doença na forma cutânea, mucocutânea e visceral.



**Figura 2:** Observação microscópica de protozoários do gênero *Leishmania*. (a) Forma promastigota; (b) Forma amastigota.

Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

A manifestação clínica pode ser classificada em dois tipos: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LT poder ser classificada em: leishmaniose cutânea – caracterizada por lesões ulcerosas ou não, porém limitadas (Figura 3a); leishmaniose cutânea-mucosa – caracterizada por lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe (Figura 3b); leishmaniose cutânea-difusa – caracterizada por lesões do tipo nodulares distribuídas pelo corpo do paciente (Figura 3d). A forma mais grave da doença e acompanhada de alta mortalidade é a LV, em que os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides (Figura 3c) (Rey, 2001; Santos *et al.*,2008).



(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 3:** Aspecto clínico das leishmanioses. (a) Leishmaniose cutânea - lesão ulcerada única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; (b) Leishmaniose cutânea-mucosa indeterminada - lesões ulceradas em palato mole e lábio superior com áreas de infiltração local (hiperemia nas bordas); (c) Leishmaniose visceral - período final; (d) Leishmaniose cutânea-difusa - polimorfismo lesional (lesões em placa infiltrada, tubérculos em face, orelha e membro superior).

Fonte: Ministério da Saúde, 2003; 2006.

### 1.1.3 Vetor e reservatório

Os vetores da leishmaniose são dípteros da família Psychodida, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. O gênero *Lutzomyia* (Figura 4) é conhecido popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Sucen, 2001).



**Figura 4:** Fêmea de Flebotomíneo adulto.

Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

Somente as fêmeas são hematófagas. Eles necessitam de proteínas presentes no sangue para o desenvolvimento dos ovos. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, buracos de pau, ocos de bambu. Em tais ambientes as larvas encontram matéria orgânica, calor e umidade necessários para seu desenvolvimento (Sucen, 2001).

Os flebotomíneos infectam-se ao picar o animal portador da doença, aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou tecidos e podem assim, transmitir a doença ao homem. A partir de estudos patofisiológicos foi verificado que a *Leishmania* se desenvolve no tubo intestinal do hospedeiro invertebrado, na forma promastigota, e essa, uma vez introduzida nos mamíferos através da picada, transforma-se na forma amastigota. Durante um período de 4 a 25 dias, o parasita continua seu desenvolvimento dentro do vetor onde se submete a uma transformação principal. Quando a fêmea contaminada se alimenta novamente, na picada ela

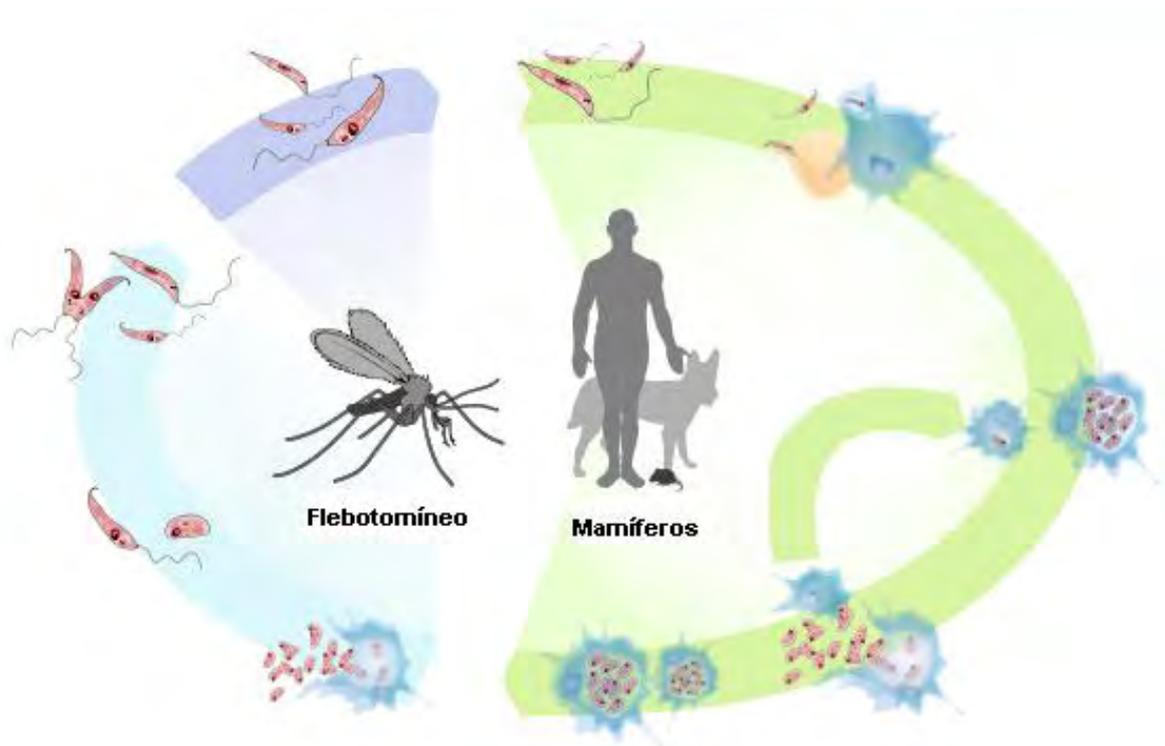
inocula a vítima com o parasita, e o ciclo da transmissão é terminado (Sucen, 2001).

Os mamíferos portadores da leishmaniose são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas e outros; os reservatórios domésticos, como o cão, são considerados hospedeiros acidentais da leishmaniose. Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção da LV. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem (Sucen, 2001).

#### **1.1.4 Ciclo de vida**

O ciclo de vida do parasita tem dois momentos: um no hospedeiro invertebrado e outro no vertebrado. O flebotomíneo, durante a alimentação, regurgita parte do conteúdo do seu tubo digestivo e assim transmite os promastigotas infectantes ao hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células de defesa, especialmente macrófagos, e dentro de um vacúolo (fagossomo) se transformam em amastigotas. O vetor, durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingere uma pequena quantidade de sangue com macrófagos contendo as formas amastigotas. No tubo digestivo do vetor, os amastigotas se transformam em promastigotas, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas juntamente com a saliva (Sacks e Kamhawi, 2001; Roberts *et al*, 2000) (Figura 5).

No homem, a LT possui um período de incubação em média de 2 meses, podendo apresentar períodos mais curtos (2 semanas) e mais longos (2 anos). Já na LV, o período de incubação é bastante variável tanto para o homem, como para o cão. No homem, é de 10 dias a 24 meses com média entre 2 a 6 meses, e no cão, varia de 3 meses a vários anos, com média de 3 a 7 meses (OMS, 2006).

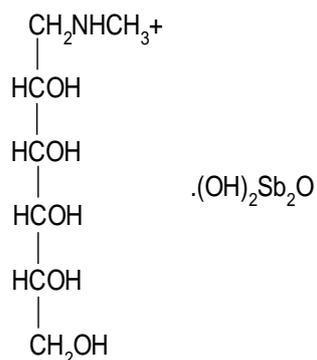


**Figura 5:** Ciclo de transmissão da leishmaniose.

Fonte:wikimedia, 2010 (modificado).

### 1.1.5 Formas de tratamento

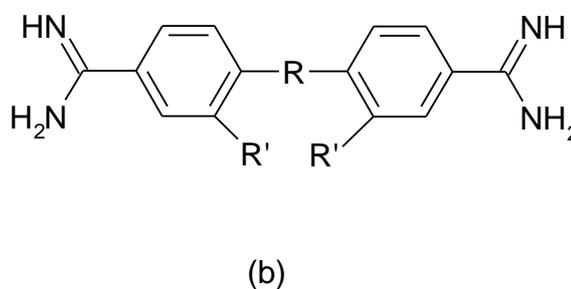
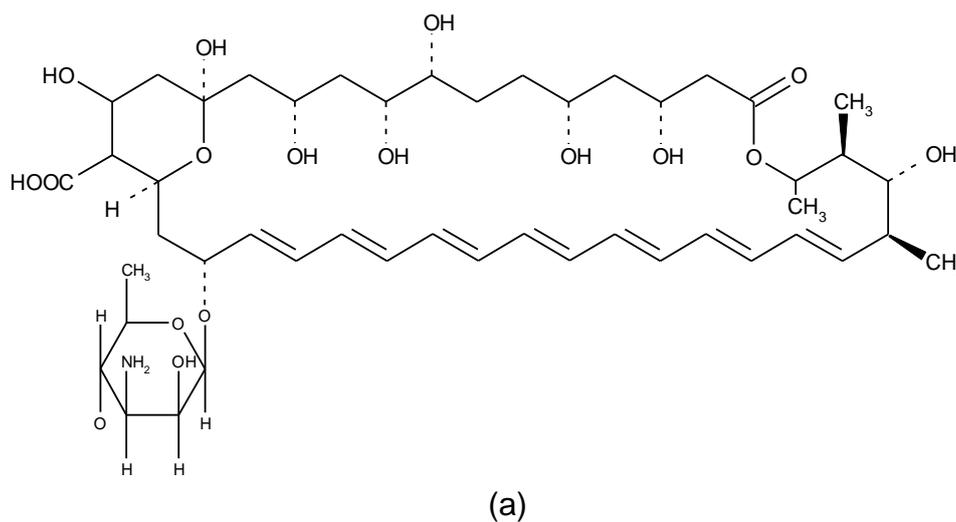
O fármaco de primeira escolha é o antimônio pentavalente. No Brasil desde os anos 50, adotou-se o antimônio de N-metil glucamina (Figura 6), Glucantime®, (Rhodia-Brasil), com 425 mg do antimônio ou 1,5 g de  $Sb^{5+}$  à 8,5% (85 mg/mL). Outro composto antimônio é o estibogluconato de sódio, Pentostam® (Glaxo-Wellcome-UK) que contém 10%  $Sb^{5+}$  (100 mg/ml), não comercializado no Brasil. O antimônio é indicado como primeira escolha para o tratamento de todas as formas de LT, com exceção dos pacientes co-infectados com HIV e gestantes. Destaca-se, ainda, que as formas mucosas exigem maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas (Pessoa, 1963; Genaro, 2003; WHO, 2010).



**Figura 6:** Estrutura química proposta do antimoniato de N-metilglucamina.

Fonte: Rath et al., 2003 (modificado).

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimônio pentavalente, os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B (Figura 7a) e o isotionato de pentamidina - Lomidine® (Figura 7b) (Pessoa, 1963; Genaro, 2003; WHO, 2010).



**Figura 7:** Estrutura química: (a) anfotericina; (b) pentamidina.

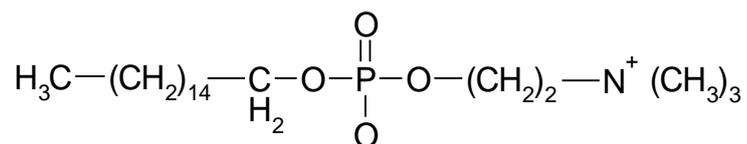
Fonte: Rath et al., 2003 (modificado).

O desoxicolato de anfotericina B é um antibiótico, sendo 400 vezes mais potente que o antimonial pentavalente. É considerada como fármaco de primeira escolha no tratamento de pacientes gestantes com LT e pacientes com co-infecção leishmania/HIV. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol, precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática de *Leishmania*. Os antimoniais pentavalentes são fármacos considerados leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que essa inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (Medeiros *et al.*, 2005).

Há restrições do uso dos antimoniais em pacientes co-infectados com HIV, com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas. Há diversos efeitos colaterais, sendo mais freqüentes: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Em seu limiar de toxicidade, pode levar a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais, obrigando nesse caso a suspensão do tratamento (Croft e Coombs, 2003; Medeiros *et al.*, 2005).

No caso em que todas as demais opções terapêuticas tenham sido utilizadas sem sucesso ou sejam contra-indicadas, há a indicação do uso da anfotericina B lipossomal. Disponíveis em três formas de apresentação: anfotericina B lipossomal (Ambisone®), anfotericina B de dispersão coloidal e anfotericina B de complexo lipídico (Amphocil®) (Ribeiro e Michalick, 2001; Sucen, 2001; Gontijo e Mello, 2004).

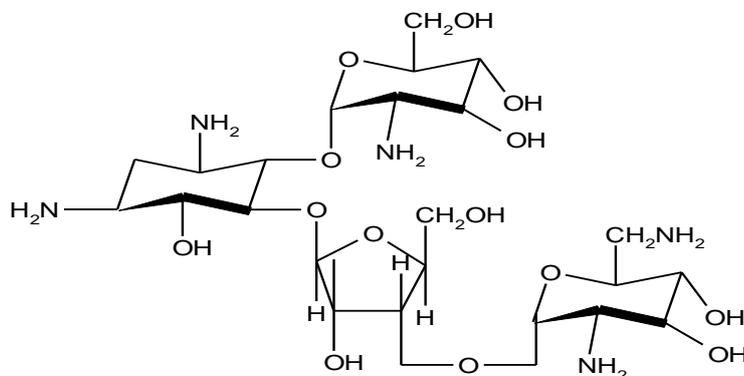
A miltefosina (Figura 8) é um medicamento indicado nos casos de LV de moderada intensidade. Durante os testes clínicos realizados na Índia, foi usado por via oral a 2,5 mg/kg/dia, por 28 dias e observou-se que 95% dos pacientes tratados foram curados (Medeiros *et al.*, 2005).



**Figura 8:** Estrutura química da miltefosina.

Fonte: Rath et al., 2003 (modificado).

A paromomicina (Figura 9) é um medicamento candidato também ao tratamento da LV. Os estudos clínicos estão na fase III no leste da África, com intenção de registrar o medicamento na Etiópia, Sudão e Quênia. O *Institute One World Health* conduziu os estudos da fase III com a paromomicina com fins de registro na Índia (Lotrowska e Zackiewscz, 2005).



**Figura 9:** Estrutura química da paromomicina

Fonte: Rath et al., 2003 (modificado).

A sitamaquina é um fármaco oral derivado da 8- aminoquinolina, atualmente em desenvolvimento (Yeates, 2002). Foram realizados estudos de fase II no Brasil, Quênia e Índia, com taxas de cura variando de 27 a 87%, com vários casos de efeitos renais sérios (Dietze *et al.*, 2001; Jha *et al.*, 2005; Wasunna, *et al.*, 2005)

Estes esforços em buscar novas alternativas para o tratamento é devido à resistência crescente ao antimônio em Bihar, Índia, onde estão aproximadamente 40% dos casos mundiais de resistência (Croft e Coombs, 2003; Murray, 2004). Em pleno século XXI ainda é utilizado como fármaco de primeira escolha, uma substância sintetizada em 1940. Pouco se avançou nessa área até o presente momento, isso porque a América Latina representa apenas cerca de 3,8% do mercado da indústria farmacêutica mundial enquanto que os países ricos representam 90%, de um mercado de 518 bilhões,

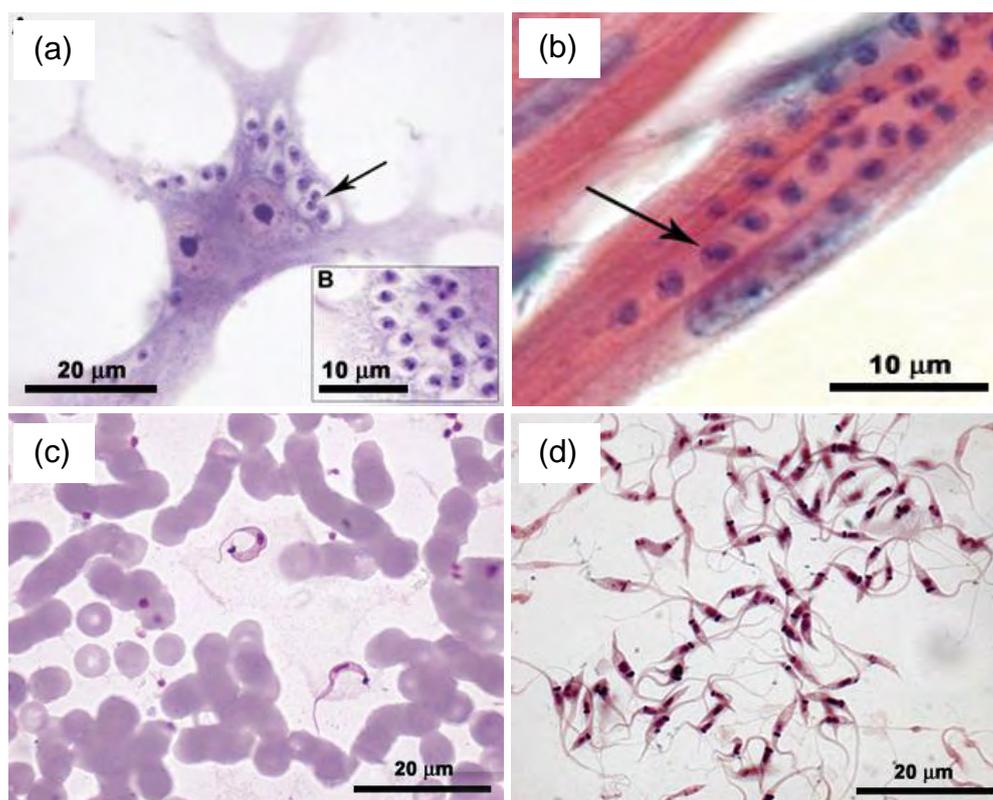
orientando as prioridades de pesquisa e desenvolvimento de fármacos no mundo (Lotrowska e Zackiewscz, 2005).

## 1.2. Doença de Chagas

### 1.2.1 Características gerais

A tripanossomíase americana, posteriormente denominada doença de Chagas em homenagem ao seu descobridor o pesquisador brasileiro Carlos Chagas, é uma importante doença parasitária resultante da infecção pelo protozoário parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, tendo insetos triatomíneos como vetores (Tempone *et al.*, 2007). As formas mais importantes de transmissão da doença de Chagas ainda são as vetoriais (seja via lesão resultante da picada, seja por mucosa ocular ou oral), contudo apresentam também importância epidemiológica a transmissão transfusional e congênita (Ministério da Saúde, 2009).

O parasito *T. cruzi*, pertence à classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Urbina, 2001). Durante seu ciclo de vida, apresenta-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota). No homem e nos demais vertebrados (tatus, macacos, gambás), o tripomastigota tem por habitat o meio circulante, e o amastigota, os tecidos. No triatomíneo, além das formas tripomastigotas, observa-se a forma de transição epimastigota (Veronesi, 1991) (Figura 10).



**Figura 10:** Observação microscópica de protozoários do gênero *Trypanosoma*. (a) formas amastigotas intracelulares; (b) músculo cardíaco de camundongo infectado. Formas amastigotas (seta); (c) formas tripomastigotas sanguíneas; (d) formas epimastigotas.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>.

A distribuição espacial da doença é limitada primariamente ao continente americano em virtude da distribuição do vetor estar restrito a esse continente, daí ser também denominada de tripanossomíase americana. Entretanto, são registrados casos em países não endêmicos, por outros mecanismos de transmissão (OMS, 2007).

A área endêmica ou, mais precisamente, com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas no país, conhecida no final dos anos 70, incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios, e, desses, 711 municípios com a presença do *T. infestans*. Até então, a região Amazônica estava excluída dessa área de risco, em virtude da ausência de vetores domiciliados. Ações sistematizadas de controle químico focalizadas nas populações de *T. infestans*, principal vetor e estritamente domiciliar, no Brasil, foram instituídas a partir de

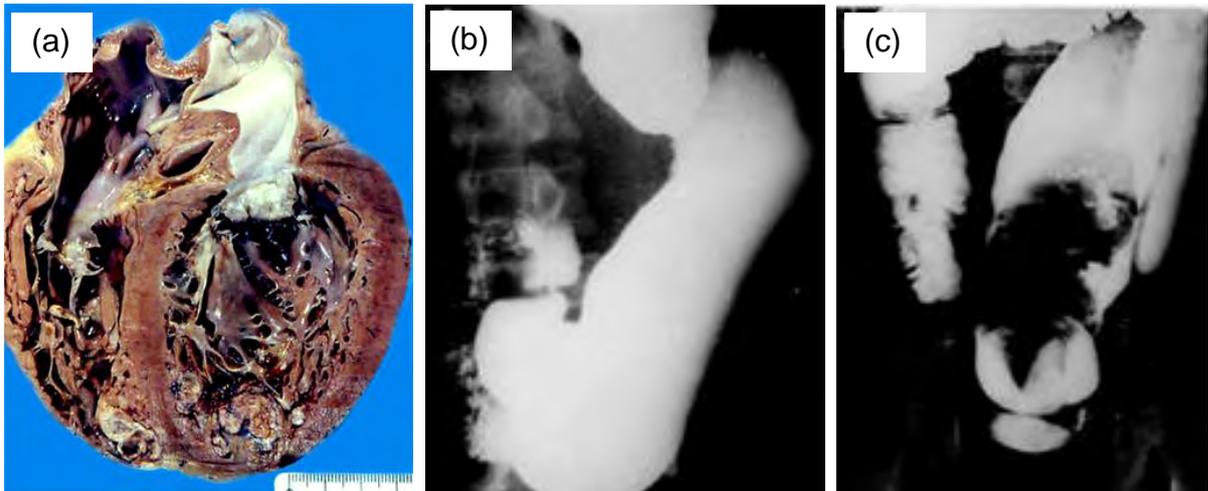
1975, e mantidas em caráter regular desde então. Elas levaram a uma expressiva redução da presença de *T. infestans* intradomiciliar e, simultaneamente, da transmissão do *T. cruzi* ao homem. Associado a essas ações, mudanças ambientais, maior concentração da população em áreas urbanas e a melhor compreensão da dinâmica de transmissão contribuíram para o controle e a reorientação das estratégias no Brasil (Ministério da Saúde, 2009).

### 1.2.2 Aspectos clínicos

Após a entrada do parasito no organismo, basicamente ocorrem duas etapas fundamentais na infecção humana pelo *T. cruzi* (Ministério da Saúde, 2009):

- Fase aguda (inicial) – predomina o parasito circulante na corrente sanguínea, em quantidades expressivas. As manifestações de doença febril podem persistir por até 12 semanas. Nesta fase, os sinais e sintomas podem desaparecer espontaneamente evoluindo para a fase crônica ou progredir para formas agudas graves que podem levar ao óbito.
- Fase crônica – existem raros parasitas circulantes na corrente sanguínea. Inicialmente, esta fase é assintomática e sem sinais de comprometimento cardíaco e/ou digestivo. Pode apresentar-se como uma das seguintes formas:
  - Forma indeterminada – paciente assintomático e sem sinais de comprometimento do aparelho circulatório (clínica, eletrocardiograma e radiografia de tórax normais) e do aparelho digestivo (avaliação clínica e radiológica normais de esôfago e cólon). Esse quadro poderá perdurar por toda a vida da pessoa infectada ou pode evoluir tardiamente para a forma cardíaca, digestiva ou associada (cardiodigestiva).
  - Forma cardíaca – evidências de acometimento cardíaco que, frequentemente, evolui para quadros de miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Essa forma ocorre em cerca de 30% dos casos crônicos e é a maior responsável pela mortalidade na doença de Chagas crônica (Figura 11a).

- Forma digestiva – evidências de acometimento do aparelho digestivo que, frequentemente, evolui para megacólon ou megaesôfago. Ocorre em cerca de 10% dos casos (Figura 11b,c).
- Forma associada (cardiodigestiva) – ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíacas e digestivas.



**Figura 11:** Apresentações clínicas da forma crônica da doença de Chagas. (a) coração de paciente chagásico que faleceu com insuficiência cardíaca, mostrando dilatação das cavidades ventriculares e afilamento da ponta dos ventrículos esquerdo e direito; (b) megaesôfago e megaestômago; (d) megacólon.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>.

A infecção humana é caracterizada por um período agudo com uma parasitemia relativamente elevada e que pode durar algumas semanas, seguida de uma fase crônica da doença, onde frequentemente verifica-se sorologia significativamente positiva, apesar de baixas concentrações de parasitas encontrados (Andrade, 1999). Muitos anos após a infecção, cerca de 20-30% dos indivíduos podem desenvolver uma cardiomiopatia crônica, e outros 10% ou menos, megassíndromes gastrointestinais, além do comprometimento de nervos periféricos em uma baixa porcentagem dos pacientes (Coura e Castro, 2002). Na América Latina, estima-se cerca de 16-18 milhões de pessoas soropositivas, com mais de 100 milhões diretamente

expostas ao risco de contaminação (OMS, 1997). No Brasil, a doença parece reemergir, uma vez que um aumento de mais de 400% nos últimos oito anos foi verificado, quando comparado ao período compreendido entre 1969-1992 (Coura *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Vetor e reservatório

A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem suscetível com as excretas contaminadas dos triatomíneos, sendo a principal espécie o *Triatoma infestans* também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões” (Figura 12). Esses, ao picarem os vertebrados, em geral defecam após o repasto, eliminando formas infectantes tripomastigotas que penetram pelo orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar. Das 140 espécies de triatomíneos conhecidas atualmente, 69 foram identificadas no Brasil e são encontradas em vários estratos florestais, de todos os biomas. Com a diminuição da transmissão vetorial por *Triatoma infestans* no país, quatro outras espécies de triatomíneos têm especial importância na transmissão da doença ao homem: *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (Ministério da Saúde, 2009).



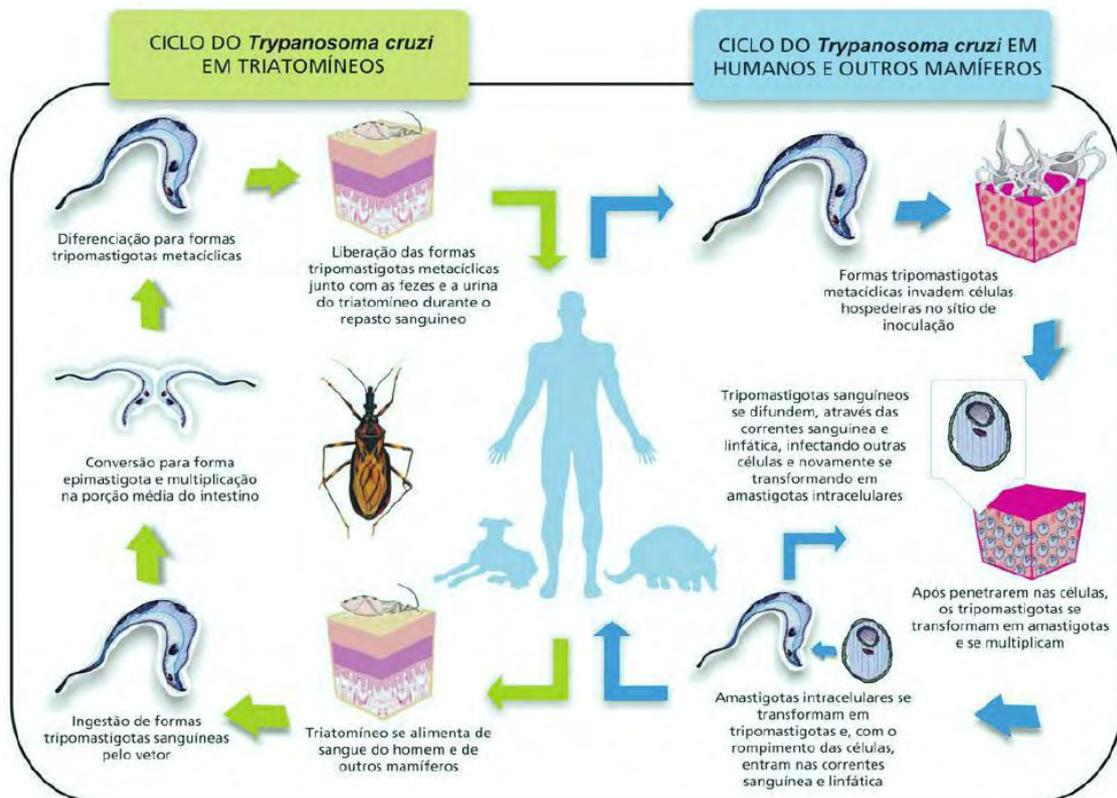
**Figura 12:** Morfologia externa do Triatomíneo.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=4>.

### 1.2.4 Ciclo de transmissão

As formas habituais de transmissão da doença de Chagas para o homem são: a vetorial, a transfusional, a transplacentária (congênita) e, mais recentemente, a transmissão pela via oral, pela ingestão de alimentos

contaminados pelo *T. cruzi*. Mecanismos de transmissão menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos sólidos e leite materno (Ministério da Saúde, 2009). O ciclo de transmissão do *T. cruzi* é mostrado na figura 13.



**Figura 13:** Ciclo de transmissão do *T. cruzi*.

Fonte: wikimedia, 2010 (modificado).

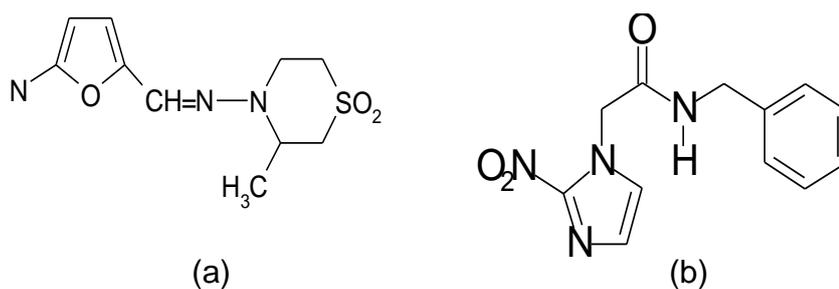
### 1.2.4 Formas de tratamento

O benznidazol é a droga de escolha disponível para o tratamento específico da doença de Chagas. O nifurtimox pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ao benznidazol, embora seja um medicamento de difícil obtenção (Ministério da Saúde, 2009).

Nifurtimox e benznidazol foram introduzidos na clínica nas décadas de 60-70. Nenhum destes compostos é ideal por que: (i) não são ativos durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais, (ii) requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica, (iii) há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas

drogas, (iv) populações de parasitos resistentes a ambos compostos têm sido relatadas, e (v) não há formulações pediátricas, apesar do fato de que crianças até 12 anos possuem maiores chances de se beneficiarem com o tratamento por não apresentarem ainda a sintomatologia crônica da doença. Ambos compostos têm sido principalmente utilizados no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, nos quais se observam resultados positivos, principalmente em crianças ( $\leq 15$  anos), calculando-se um percentual médio de cura em torno de 80%, no tratamento de infecções congênitas, transplantes de órgãos de doadores infectados, quadros de re-agudização de paciente imunossuprimidos.

O nifurtimox (Figura 14) é um composto nitrofurano que apresenta atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas do parasita, sendo administrado por longos períodos (30-120 dias). Severos efeitos adversos vêm sendo relatados, como anorexia, alterações psíquicas e gastrointestinais, assim como diarreia e vômitos. O benznidazol é um derivado nitroimidazólico, que se apresenta mais efetivo que o nifurtimox contra formas tripomastigotas do parasita. A administração do fármaco se dá por períodos inferiores em relação ao nifurtimox (60-90 dias), apesar de apresentar efeitos adversos mais severos, como a agranulocitose, septicemia, trombocitopenia e hemorragias (Coura e Castro, 2002).



**Figura 14:** Estrutura química do nifurtimox (a) e benznidazol (b).

Teixeira e colaboradores (1990) demonstraram que ambos os fármacos induziram o aparecimento de linfomas em coelhos e camundongos, além de apresentarem atividades mutagênicas e carcinogênicas (Teixeira *et al.*, 1994).

Terapias alternativas vêm sendo estudadas para o tratamento da doença de Chagas, e dentre estas, o fármaco posaconazol, que segundo Lescure *et al.*

(2010) tem apresentado significativa atividade em modelo animal quando comparado com ao fármaco padrão, o benznidazol. Outros derivados do triazol (inibidores da biossíntese do ergosterol), como ravuconazol, também estão em pesquisa. A combinação de fármacos tem se apresentado como uma atividade promissora tratamento da doença de Chagas juntamente com a terapia imunomoduladora com interferon (Lescure *et al.* 2010).

A despeito da extensa lista de diferentes classes de compostos que apresentam atividade *in vitro* sobre *T. cruzi*, somente alopurinol, itraconazol, fluconazol e posoconazol foram submetidos a ensaios clínicos desde à introdução do nifurtimox e do benznidazol. Este fato se deve em muitos casos a inexistência de indicação do efeito curativo, ao efeito potencial tóxico e/ou teratogênico (em geral somente analisado em modelos *in vitro*), enfatizando a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais mais adequados bem como a padronização de protocolos de ensaio *in vitro* (Tempone, *et al.*, 2007).

Drogas para o tratamento da doença de Chagas não são do interesse de indústrias farmacêuticas, estando na raiz do problema o alto custo dos investimentos e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento.

## **1.3 Metabólitos secundários de vegetais**

### **1.3.1 Plantas medicinais**

Os homens primitivos utilizavam a natureza como forma de tratamento e cura para doenças. Eles se alimentavam de determinadas plantas e utilizavam substâncias extraídas de animais pelo instinto de sobrevivência, e com isso, observavam os seus efeitos benéficos ou danosos para a sua sobrevivência e dessa forma acumulavam conhecimento, transmitindo de pai para filho no decorrer da existência. Foi dessa forma que o uso de recursos naturais ultrapassou gerações, sendo hoje amplamente utilizadas por grande parte da população mundial como forma alternativa de medicamento (Verpoorte, 2001).

No Brasil, segundo Amorozo (2002) e Amorozo e Gély (1988), as sociedades rurais, os povos indígenas e as comunidades com poucos recursos, muitas vezes possuem somente fontes naturais como forma de tratamento, ou acabam utilizando essas, combinados com fármacos obtidos em farmácias, pois mesmo que haja um grande número de hospitais e centros médicos, o emprego de plantas medicinais é essencial no cotidiano de grande parte da população brasileira. A automedicação, com plantas medicinais, chega muitas vezes a substituir terapias consagradas em doenças graves; isso se tornou prática comum nos países em desenvolvimento. Nas camadas privilegiadas, que gozam de facilidades sanitárias e pronto atendimento médico, a utilização de plantas com atividades medicinais também é explorada como modo naturalista (Lapa *et al.*, 2004). A Organização Mundial da Saúde (2009) estima que 80% das pessoas dependem da medicina tradicional, principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil, segundo Di Stasi (1996a), 20% da população consome 63% dos medicamentos disponíveis no mercado, enquanto que grande parte da população encontra na natureza a única forma de recurso terapêutico. Só no ano de 2007, o Brasil arrecadou 160 milhões de dólares na venda de produtos naturais (OMS, 2009).

Segundo Newman e Cragg (2007), o estudo de produtos do metabolismo secundário da flora e fauna é uma importante ferramenta utilizada para a descoberta de novos fármacos. Cerca de 33% das prescrições realizadas nos Estados Unidos durante os últimos anos 25 estavam

relacionadas a medicamentos que continham princípios ativos de origem natural ou semi-sintética, sendo 2,7% de origem animal, 13% microbiana e o restante de plantas superiores e dentre o total de 1.031 fármacos liberados comercialmente entre 1981 e 2002, 55% tinham relação com fontes naturais.

Dentro de medicamentos antiparasitários, das 14 prescrições médicas, duas são de origem natural e cinco são semi-sintéticas (Newman e Cragg, 2007). O estudo de produtos naturais tem como objetivo o isolamento, a elucidação estrutural e a compreensão da função dos metabólitos secundários presentes nos seres vivos (Maciel *et al.*; 2002).

O Brasil se torna um país promissor nesse ramo de pesquisa, devido à grandeza do território, sendo o maior detentor da floresta equatorial e tropical úmida do planeta. Estima-se que 20% do patrimônio genético mundial esteja concentrado no território nacional. São mais de 55 mil espécies vegetais (22% do total registrado no planeta) (Lopes *et al.*, 2005), sendo que apenas 8% da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos. No entanto, até o ano de 2015 podem desaparecer entre 4 a 8% de todas as espécies vivas presentes nas florestas tropicais (Guerra e Nodari, 2004).

### **1.3.2 Conhecimento etnobotânico de plantas medicinais**

Muitas sociedades possuem e preservam um vasto conhecimento sobre o uso de espécies vegetais com ação medicinal, acumulada ao longo de gerações, proveniente dos recursos vegetais encontrados no ambiente natural ocupado pela população. A etnobotânica é a ciência que estuda a relação entre cada grupo social e a natureza, ou seja, como cada sociedade interage com o ambiente e com os fenômenos biológicos, usufruindo e alterando-os (Albuquerque, 1999; Amorozo, 2002; Elisabetsky e Souza; 2004; Maciel *et al.*, 2002).

A natureza é uma fonte de recursos medicinais inestimáveis, que com o passar do tempo, vem sendo destruída e desprezada. As plantas são essenciais tanto para o homem quanto para os animais, uma vez que atuam como abrigo e alimento, além de serem utilizadas como medicamentos (Amorozo, 1996).

Hoje, esse conhecimento empírico tem sido pesquisado e testado em laboratórios, comprovando em muitos casos a eficácia destes produtos e possibilitando a descoberta de novos medicamentos ou mesmo de substâncias tóxicas, demonstrando que o uso de determinadas espécies vegetais pode ocasionar sérios danos à saúde (Maciel *et al.*, 2007). O estudo etnobotânico nos permite conhecer não só a forma de relação entre a sociedade e a flora nativa como também o modo de utilização desta. No Brasil o comércio de medicamentos atende apenas a faixa de população economicamente ativa (cerca de 30%), o restante da população utiliza formas de terapias alternativas com o que a natureza pode oferecer, atribuindo às plantas medicinais, nesse contexto social, uma importância fundamental como agentes terapêuticos. Porém o uso abusivo ou sem critério científico de plantas medicinais pode muitas vezes levar até a óbito; um exemplo desse uso é o caso do ácido aristolóquico encontrado em espécies de *Aristolochia* (cipó de mil homens), usada em sintomas de gotas, artrite, reumatismos e doenças inflamatórias crônicas de pele. Estudos clínicos em pacientes com deficiências renais mostraram sérios danos, podendo levar a óbito quando exposto a esse ácido (Lapa *et al.*, 2004).

Há vários exemplos que comprovam a importância do conhecimento empírico da população, como por exemplo, a descoberta das propriedades contraceptivas do inhame do México (Hostettmann *et al.*, 2003) e trabalhos que demonstram a riqueza das informações medicinais existentes em tribos indígenas (Pivetta, 2001). Em dois anos de trabalho, foram mapeadas 164 espécies vegetais nativas da flora brasileira usadas para fins medicinais. Outros trabalhos corroboram essa afirmação (Almeida *et al.* 2002; Amoroza 2002; Amoroza e Gély, 1988; Neto, 2000).

A modernização tem ocasionado a destruição das florestas e, conseqüentemente, uma grande perda da biodiversidade. Várias espécies vegetais estão sendo extintas, sem ter sido explorado seu potencial medicinal (Begossi, 1988 e Neto *et al.*, 2001). Além disso, diversos fatores contribuem para a desvalorização dessa cultura tradicional, através de uma ampla valorização da tecnologia, podendo ocasionar o desaparecimento desse conhecimento pela própria comunidade, que hoje tem dificuldades em

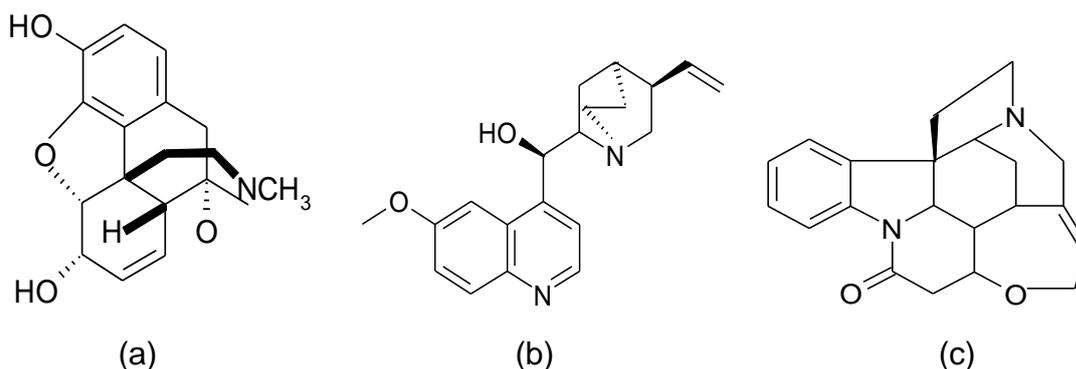
transmitir esse conhecimento empírico para as futuras gerações (Amorozo e Gély, 1988).

A falta de conhecimento quanto aos recursos vegetais está intimamente relacionado com o extrativismo, pois quando a biodiversidade não é conhecida, ela não pode ser valorizada. O desconhecimento desse potencial é uma das principais causas da utilização irracional dos recursos florestais. Conhecer esse potencial e compreender a interação etnobotânica, ou seja, a relação homem/planta e desta forma, avaliar o grau de interferência humana no local, é uma forma de possibilitar a participação da população, para que ela possa conhecer as riquezas disponíveis em sua região e aprender a utilizar racionalmente as espécies medicinais (Begossi, 1988; Albuquerque, 1999; Albuquerque e Andrade 2002;).

Guerra e Nodari (2004) propuseram a conservação etnobotânica como forma de proteger o conhecimento dessas comunidades sobre o uso de plantas medicinais e a obtenção de fitofármacos. No Brasil estima-se que quase 25% dos 8 bilhões de dólares de faturamento da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas (Di Stasi, 1996a).

### **1.3.3 Metabólitos secundários de plantas**

O estudo da composição química das espécies vegetais, empiricamente denominadas de plantas medicinais, é realizado pela química dos produtos naturais, que tem como foco o estudo dos produtos do metabolismo secundário, isolando os seus componentes e elucidando as suas estruturas tais como terpenóides, alcalóides e flavonóides. As primeiras substâncias isoladas do reino vegetal foram a morfina, isolada da *Papaver somniferum*, utilizada principalmente como analgésico; a quinina, isolada da casca do caule da espécie *Cinchona* spp., sendo utilizada como fármaco antimalárico e a estricnina, extraída da semente de *Strychnos nux vomica*, porém uma substância extremamente tóxica (Pinto *et al.*, 2002; Hostettmann *et al.*, 2003) (Figura 15). Essas substâncias foram modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos, tais como a procaína, cloroquina, tropicamida, vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), podofilotoxina e os análogos estoposídeo (VP-16-213; Vepeside®) e teniposídeo (VM-26; Vumon®) taxol (Paclitaxel; Taxol®) e mais recentemente camptotecina (Pinto *et al.*, 2002).



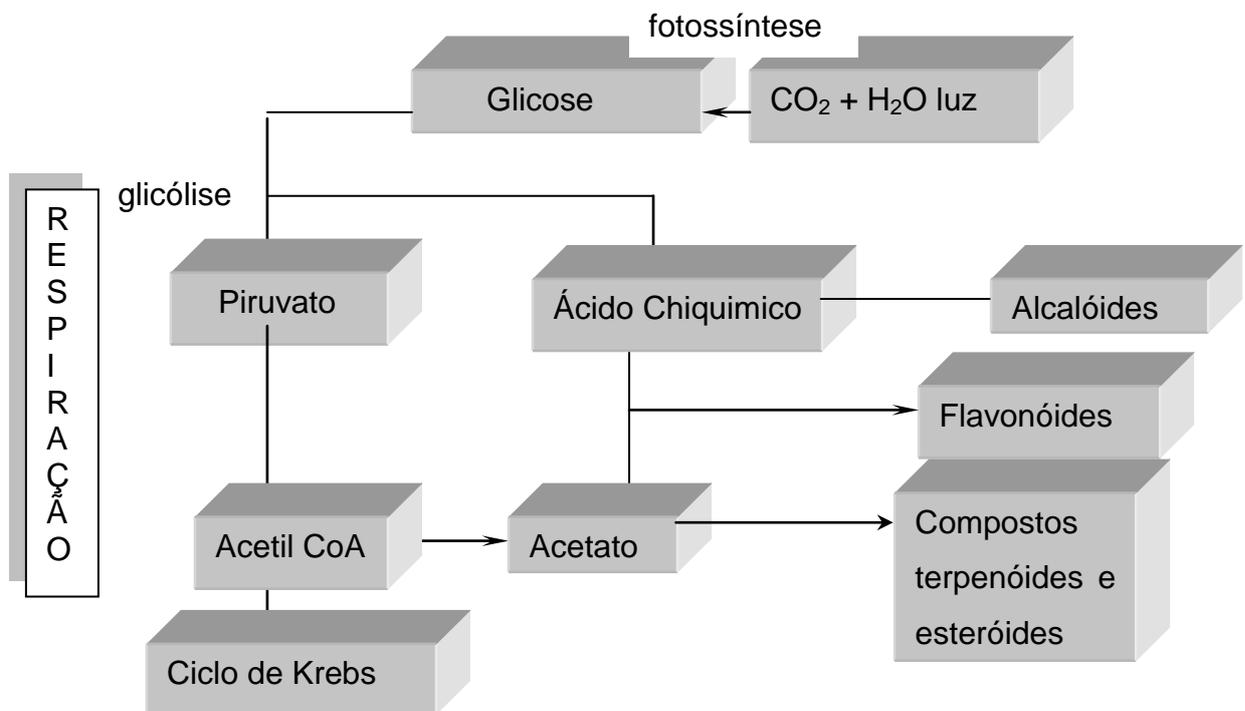
**Figura 15:** Estruturas químicas de compostos de origem vegetal. Morfina (a), quinina (b); e estricnina (c)

Os constituintes químicos encontrados nos vegetais são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem o metabolismo das plantas. Esse metabolismo é dividido em dois grandes grupos, o metabolismo primário e metabolismo secundário. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência do vegetal, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos faz parte do metabolismo primário, enquanto os demais compostos sintetizados pelo vegetal a partir do metabolismo primário, por rotas diversas ou muitas vezes desconhecidas, são denominados como metabólitos secundários (ou produtos naturais). São substâncias com baixo peso molecular, geralmente com estrutura complexa, não necessariamente essenciais para o organismo produtor, mas que garantem vantagens adaptativas para o indivíduo. Por ser um fator de interação entre organismos, frequentemente apresentam atividade biológica (Poser e Mentez, 2004; Santos, R., 2004). Estes compostos atuam na defesa contra microrganismos, resistência ao estresse ou como polinizadores (Poser e Mentez, 2004). Devido à atividade biológica, esses metabólitos secundários têm aplicação na medicina, na perfumaria e/ou na indústria alimentícia, sendo que uma das principais aplicações está na indústria farmacêutica, como fonte de novos fármacos (Poser e Mentez, 2004; Newman e Cragg, 2007).

Os produtos naturais têm distribuição restrita a certos grupos taxonômicos e às vezes são característicos de um determinado gênero ou espécie. Isso indica que as espécies possuem rotas biossintéticas e genes específicos controlando essa rota. Por essa razão, há uma ocorrência restrita

de determinadas substâncias em uma espécie ou gênero (Poser e Mentez, 2004; Torssell, 1997).

Dentre as principais classes de metabólitos secundários estão os terpenóides, alcalóides e flavonóides. As principais vias de origem dos metabólitos secundários podem ser resumidas a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina, por exemplo, os alcalóides, taninos e lignanas, enquanto a via do acetato origina os terpenóides e também os alcalóides, enquanto que os flavonóides são originados a partir das duas vias (Figura 16).



**Figura 16:** Rota biossintética de produção dos metabólitos secundários.

Fonte: Torssell, 1997.

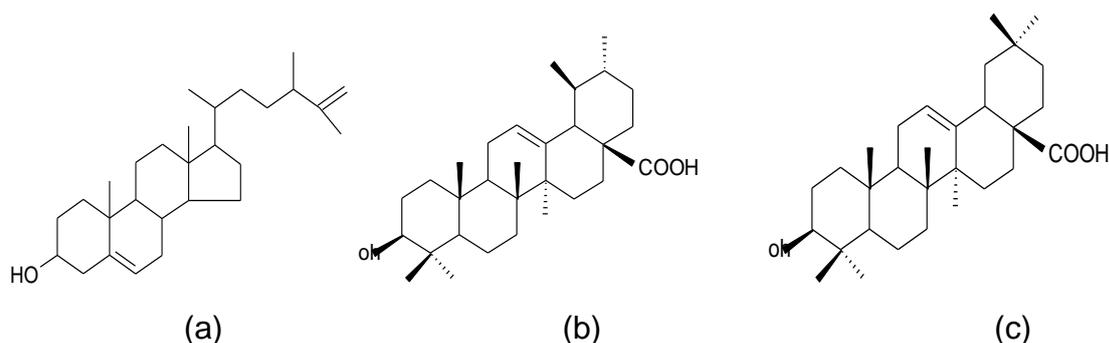
#### 1.3.4 Metabólitos secundários isolados com atividade anti-*Leishmania*

Uma avaliação científica das plantas medicinais utilizadas tradicionalmente forneceu para a medicina moderna medicamentos efetivos para o tratamento de doenças parasitárias. Três das maiores classes de fármacos antiparasitários possuem origem nas plantas. Dentre elas estão a quinina, isolada de *Chinchona succirubra*, que foi o primeiro composto antimalárico descoberto; a emetina, um composto amebicida obtido de *Cephaelis ipecacuanha* e o endoperóxido sesquiterpeno artemisinina, isolado de *Artemisia annua*, com atividade antimalárica (Iwu *et al.*, 1994). Portanto, a química dos produtos naturais pode ser uma ferramenta para a identificação de novos protótipos de fármacos e para modificações semi-sintéticas, visando melhorar a atividade terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos do composto (Wright e Phillipson, 1990).

Segundo a revisão bibliográfica de plantas com atividade anti-*Leishmania* realizada por Rocha *et al.* (2005), foram descritas 101 espécies vegetais com atividade, pertencentes a 39 famílias diversas, sendo as famílias Asteraceae (21 espécies), Annonaceae (10 espécies) e Apocynaceae (7 espécies) as famílias com maior número de espécies vegetais ativas. A maioria das espécies vegetais apresentaram atividade contra *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, e apenas 4 espécies apresentaram atividade contra *L. (L.) infantum*.

As classes químicas com maior atividade anti-*Leishmania*, segundo Rocha e colaboradores (2005) e Mishra e colaboradores (2009) são os alcalóides e os terpenos. Tempone e colaboradores (2007) relataram a atividade anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi* de terpenos de origem vegetal.

Dos frutos da planta *Cassia fistula*, isolou-se um esteróide (Figura 17a) com atividade contra promastigotas ( $CE_{50} = 10,03 \mu\text{g/mL}$ ) e amastigotas ( $CE_{50}$  de  $18,10 \mu\text{g/mL}$ ) de *L. (L.) chagasi* e com baixa citotoxicidade comparada com os fármacos padrões pentamidina e glucantime (Sartorelli *et al.*, 2007). Das espécies do gênero *Miconia* foram isolados o ácido ursólico (Figura 14b) e ácido linóico (Figura 14c), com atividade anti-*Leishmania* (Sartorelli *et al.*, 2007).



**Figura 17:** Compostos de origem vegetal com atividade anti-*Leishmania* colesterol isolado de *Cassia fistula* (a); ácido ursólico (b) e ácido linóico, isolado de *Miconia sp* (c).

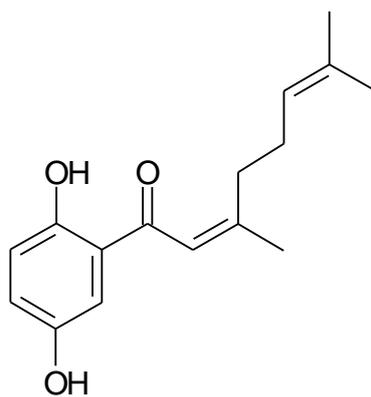
Fonte: Sartorelli *et al.*, 2007.

### 1.3.5 Metabólitos secundários isolados com atividade anti-*Trypanosoma*

Calderón e colaboradores (2010) verificaram atividade antiparasitária de 311 espécies vegetais da América central e do sul. Destas, 17 plantas (5,4%) mostraram atividade anti-*T. cruzi* com valores de  $CE_{50}$  menores que 10  $\mu\text{g/mL}$ . Sendo que as espécies mais ativas foram *Acnistus arborescens* (L.) Schlttdl. (Solanaceae) -  $CE_{50} = 4 \mu\text{g/mL}$ ) e *Monochaetum myrtoideum* Naudin (Melastomataceae) -  $CE_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ ) e *Bourreria huanita* (Lex.) Hemsl. (Boraginaceae) -  $CE_{50} = 6 \mu\text{g/mL}$ ). Leite e colaboradores (2008) estudaram a espécie *Cedrela fissilis* e verificaram atividade anti-*T. cruzi* em 19 compostos, sendo 12 terpenos, 1 sesquiterpeno, 5 esteróide e 1 flavonóide.

Lopes e colaboradores (2008) isolaram o composto 1,4-diidroxil-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-Z,6'-octadienil)-benzeno] a partir da espécie *Piper crassinervium* (Piperaceae) que apresentou valor de  $CE_{50}$  de 6,1  $\mu\text{g/mL}$  contra a forma epimastigota (Figura 18).

Esses trabalhos demonstram que a área de pesquisa de produtos naturais é uma rica fonte para a obtenção de novos compostos com atividade anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi*.



**Figura 18:** Composto 1,4-diidroxi-2-(3',7'-dimetil-1'-oxo-2'-Z,6'-octadienil)-benzeno) isolado da espécie *Piper crassinervium* (Piperaceae).

Fonte: Lopes et al., 2008.

## **1.4 Espécies vegetais estudadas: aspecto botânico, atividade biológica, uso e constituintes químicos**

### **1.4.1 *Bidens pilosa* L. (Família Asteraceae /Compositae)**

#### **1.4.1.1 Aspectos Botânicos e características gerais**

As espécies pertencentes ao gênero *Bidens* são conhecidas na região da Amazônia e na Mata Atlântica como “picão”, “carrapicho-de-duas pontas”, “erva picão”, “carrapicho”, “espinho de agulha” e entre outros (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002; Lorenzi e Matos, 2008).

O gênero descrito por Carl Linnaeus inclui aproximadamente 240 espécies. O nome *Bidens* significa “dois dentes”, se referindo aos tufo de pêlos ou cerdas, que são conhecidos popularmente por aderirem às roupas de visitantes que se aventuram pelo habitat dessas espécies (Di Stasi E Hiruma-Lima, 2002).

Esse gênero pertence à família Asteraceae (Compositae), uma das famílias mais relatadas em levantamentos entobotânicos, por possuírem atividades medicinais (Di Stasi, Hiruma-Lima, 2002).

O gênero *Bidens* é nativo de toda a América tropical, nas regiões tropicais e subtropicais. É uma espécie que cresce espontaneamente em lavouras agrícolas de todo o Brasil, onde é considerada uma erva daninha (Lorenzi e Matos, 2008).

A espécie mais importante é a *Bidens pilosa* L. (Figura 19). Geralmente são plantas de pequeno porte, com odor característico, até um metro de altura, ereta, folhas opostas, simples, pecioladas e fendidas; flores amarelas reunidas em inflorescências do tipo capítulos pleiomorfos, com flores radiais, pentâmeras com cálice modificado (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002).



**Figura 19:** Espécime de *Bidens pilosa*. Parte aérea da planta (a); detalhe da inflorescência (b) e (c).

Fonte: <http://www.ethnopharmacologia.org>

#### 1.4.1.2 Usos na medicina tradicional

O uso dessa espécie é disseminado por toda a Amazônia e por todos os estados brasileiros. Na região amazônica, os grupos indígenas possuem uma longa história de usos na medicina caseira, utilizando-a no tratamento de hepatite, diabetes, disenteria, edema, laringite, icterícia, infecções urinárias vaginais e contra vermes. Na medicina tradicional peruana, a espécie é usada como antiinflamatório, diurético e contra hepatite, conjuntivite, micoses e infecções urinárias. No leste da África, o suco da folha da planta é usado contra dores de ouvido e conjuntivite, bem como dores em geral (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002; Lorenzi e Matos, 2008).

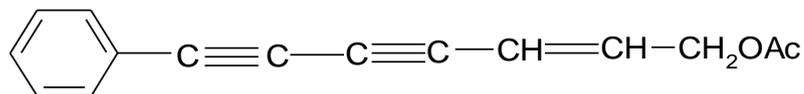
### 1.4.1.3 Constituintes químicos e atividades biológicas

A partir da espécie *B. pilosa* foram isolados alfa-pineno, limoneno, alfa-felandreno, timol, alfa-copaeno, beta-guaieno, beta-cariofileno, alfa-humuleno, cadineno, alfa-farnesol, beta-bisaboleno, auronas, glicosídeos fenilpropanóides, ácido linoléico e linolênico, os triterpenos friedelina e friedelan-3- $\beta$ -ol e vários flavonóides (Wang, 1997). Das espécies *B. bipinnatus*, *B. triparticus*, *B. laevis*, *B. leucantha* foram isolados poliacetilenos, carotenóides e glicosídeos (Hoffman e Hoelzl, 1988).

Os estudos de atividade biológica relatadas incluem inúmeras atividades como anti-hiperglicêmica (Ubillas, 2000), anti-hipertensiva (Dimo *et al.*, 2001), anti-úlceras (Tan *et al.*, 2000), hepatoprotetora (Chin *et al.*, 1996), imunomodulatória e anti-inflamatória (Jaguer *et al.*, 1996), anti-leucêmica (Chang *et al.*, 2001), antibacteriana (Rabe e Van Staden, 1997), antimicrobiana (Khan *et al.*, 2001), antitumoral (Sundararejan *et al.*, 2006) e antioxidante (Chiang *et al.*, 2004)

A partir do gênero *Bidens*, Brandão e colaboradores (1997) isolaram o composto 1-fenol-1,3-diino-5-eno-7-ol-acetato (Figura 20), substância majoritária da fração em butanol da raiz. Esta fração apresentou 86% de inibição do parasita *Plasmodium falciparum* em testes *in vitro*. Estudos posteriores *in vivo* de Oliveira e colaboradores (2004) demonstraram que a atividade parasitária está relacionada com a presença de poliacetilenos e flavonóides.

García e colaboradores (2010) relataram atividade anti-*Leishmania*, na forma amastigota com CE<sub>50</sub> de 42,6 e 69,6  $\mu\text{g/mL}$  de extratos brutos da folha da espécie *Bidens pilosa*, segundo os pesquisadores essa atividade é responsável pela presença de flavonóides, nesses extratos.



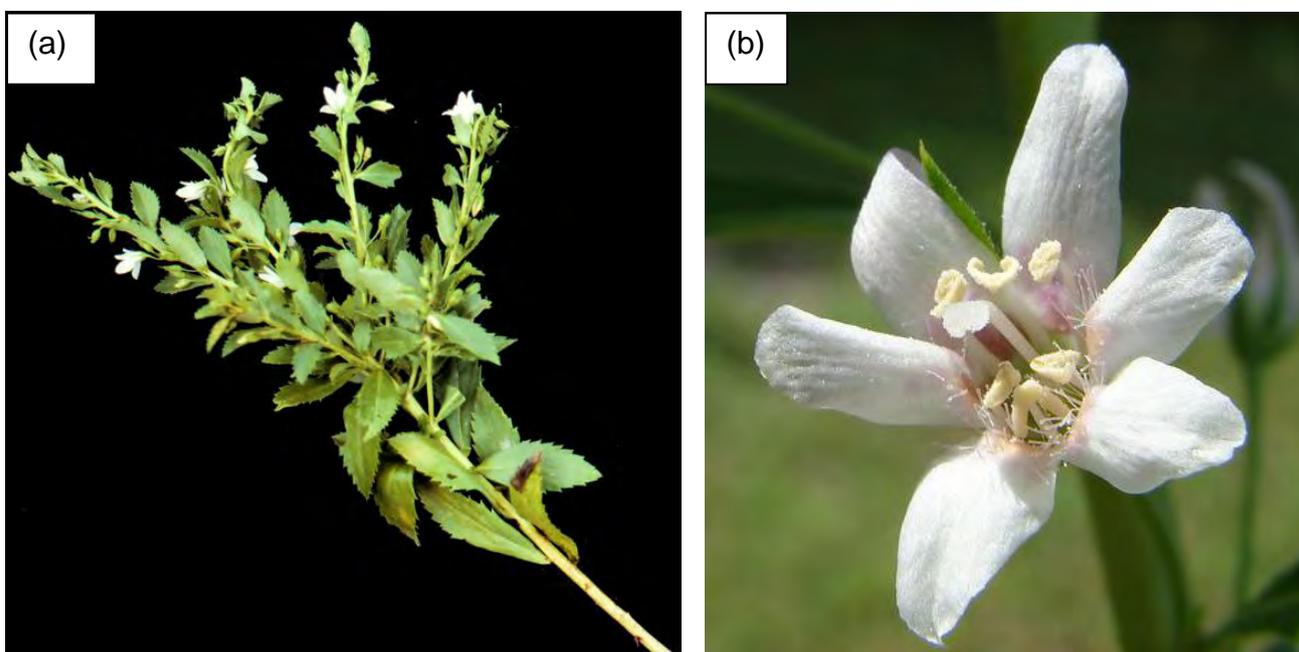
**Figura 20:** Estrutura do composto 1-fenol-1,3-diino-5-eno-7-ol-acetato isolado da espécie *B. pilosa*.

Fonte: Brandão *et al.*, 1997.

## 1.4.2 *Capraria biflora* L. (Família Scrophulariaceae)

### 1.4.2.1 Aspectos botânicos e características gerais

A espécie *Capraria biflora* L. (Figura 21) é conhecida popularmente como “chá-da-terra”, “chá-de-calçada”, “chá-de-boi”, “chá-do-rio” e “chá-preto”. É um pequeno arbusto com 30-70 cm de altura, folhas alternas, flores axilares, aos pares, de cor branca. Fruto do tipo cápsula, com numerosas sementes pretas muito pequenas. É encontrada na América Tropical, sendo no Brasil encontrada desde o Piauí até o Espírito Santo, Minas Gerais e Goiás (Lorenzi e Matos, 2008).



**Figura 21:** Espécime de *Capraria biflora*. Ramo aéreo (a); detalhe da flor (b).

Fonte: <http://www.ethnopharmacologia.org>

### 1.4.2.2 Uso na medicina tradicional

As folhas e as extremidades floridas são usadas como febrífugo, para problemas estomacais e afecções do aparelho urinário (Lorenzi e Matos, 2008).

### 1.4.2.3 Constituintes químicos e atividades biológicas

O estudo fitoquímico registra a presença da biflorida, um diterpenóide naftoquinônico, em toda a planta, mas principalmente na casca das raízes,

além dos iridóides glicosídicos harpagida e 8-o-benzoilarpagida. Nos ensaios farmacológicos *in vivo*, o extrato aquoso das folhas foi capaz de baixar a glicemina; os extratos etanólicos e acetônicos das raízes exibiram forte ação bactericida e bacteriostática. O decocto das folhas, administrado em altas doses, mostrou-se tóxico para o sistema nervoso central, produzindo depressão e feito estupefaciente (Lorenzi e Matos, 2008).

### **1.4.3 *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. (Família Rubiaceae)**

#### **1.4.3.1 Aspectos botânicos e características gerais**

A espécie *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel (Figura 22), conhecida popularmente como “unha-de-gato”, “unha-de-cigana”, “carrapato-amarelo”, “garra-de-gavião”, é um arbusto pouco ramificado, com espinhos em forma de gancho em cada axila foliar. As folhas são simples, opostas, pecioladas, membranáceas. Apresenta inflorescências em glomérulos auxiliares, com flores branco-amarelas (Lorenzi e Matos, 2008).

#### **1.4.3.2 Uso na medicina tradicional**

Indígenas da Amazônia empregam esta espécie no tratamento de uma ampla gama de moléstias, como asma, artrite, reumatismo, contra inflamações, para o controle da inflamação de úlceras gástricas e dores nos ossos. O chá dos ramos é usado para o tratamento de disenteria e há relatos do uso no tratamento de câncer (Heitzman *et al*, 2005; Lorenzi e Matos, 2008)



**Figura 22:** Espécime de *Uncaria guianensis*. Detalhe do acúleo em forma de gancho (a); detalhe da flor (b).

Fonte: <http://www.ethnopharmacologia.org>

#### **1.4.3.3 Constituintes químicos e atividades biológicas**

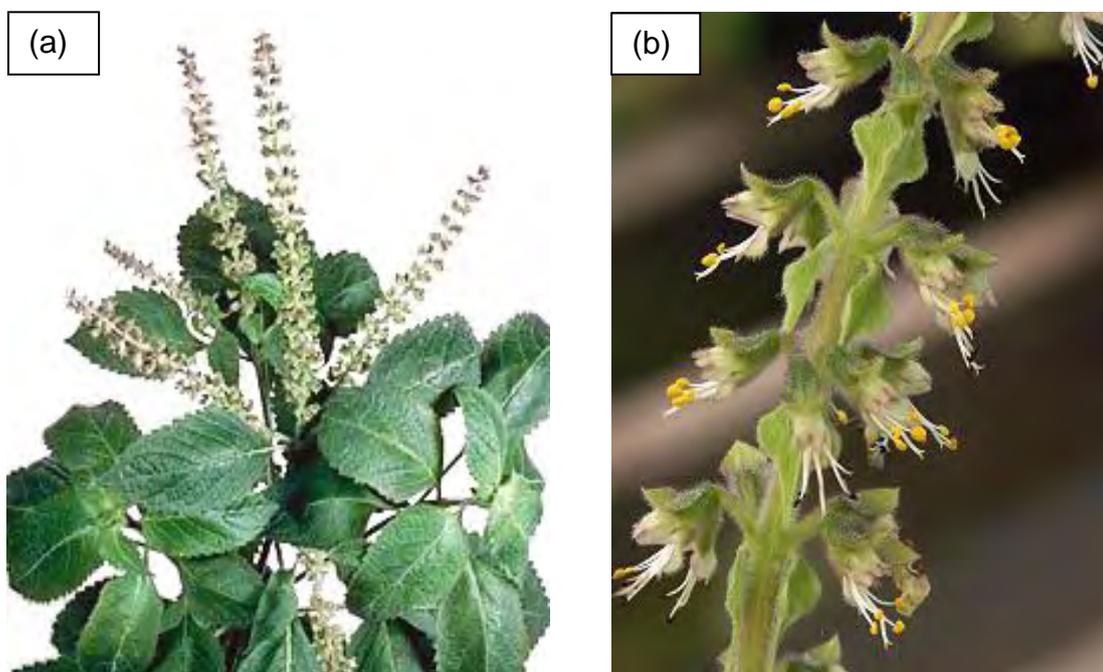
Foi descoberta a presença de alcalóides oxindólicos, nas raízes e cascas, que agem estimulando o sistema imunológico em até 50%. Isto induziu o uso dessa espécie como adjuvante no tratamento da AIDS, do câncer e de outras doenças que afetam o sistema imunológico (Lorenzi e Matos, 2008). Os alcalóides, segundo Heitzman e colaboradores (2005), são a classe majoritária desse gênero. Foram isolados também glicosídeos do ácido quinóico, considerados os mais potentes antiinflamatórios encontrados em plantas, capazes de inibir a o processo inflamatório (Gattuso *et al.*, 2006). Esta espécie contém ainda outros alcalóides em que estudos farmacológicos demonstraram atividade vasodilatadora e hipotensora (Lorenzi e Matos, 2008). Heitzman e colaboradores (2005) relataram atividade anti-inflamatória, antiviral e antibactericida.

Gattuso e colaboradores (2010) isolaram alcalóides e glicosídeos com atividade antiviral e triterpenos com atividade antitumoral.

#### 1.4.4 *Ocimum gratissimum* L. (Família Lamiaceae /Labiatae)

##### 1.4.4.1 Aspectos botânicos e características gerais

*Ocimum gratissimum* L., conhecida popularmente como “alfavacão”, “alfavaca” e “alfavaca-cravo”, é um subarbusto com até um metro de altura, originário do oriente e subespontâneo em todo o Brasil. As folhas são ovalado-lanceoladas, de bordos duplamente dentados e membranáceos. Apresenta flores pequenas, roxo-pálidas, dispostas em racemos paniculados eretos e geralmente em grupos de três. O fruto é do tipo cápsula, pequeno, possuindo 4 sementes esféricas. Tem aroma forte e agradável que lembra o cravo-da-Índia (Figura 23) (Lorenzi e Matos, 2008).



**Figura 23:** Espécime de *Ocimum gratissimum*. Ramo aéreo com inflorescências (a); detalhe das floretas da inflorescência (b).

Fonte: <http://www.ethnopharmacologia.org>

#### **1.4.4.2 Uso na medicina tradicional**

Na medicina caseira do Brasil as folhas são usadas na preparação de banhos antigripais, para casos de nervosismo e paralisia, como diurético e devido ao seu sabor e odor são usadas como condimentos na culinária (Lorenzi e Matos, 2008). Ueda-Nakamura e colaboradores (2006) relatam também o uso no tratamento de doenças de pele e problemas respiratórios.

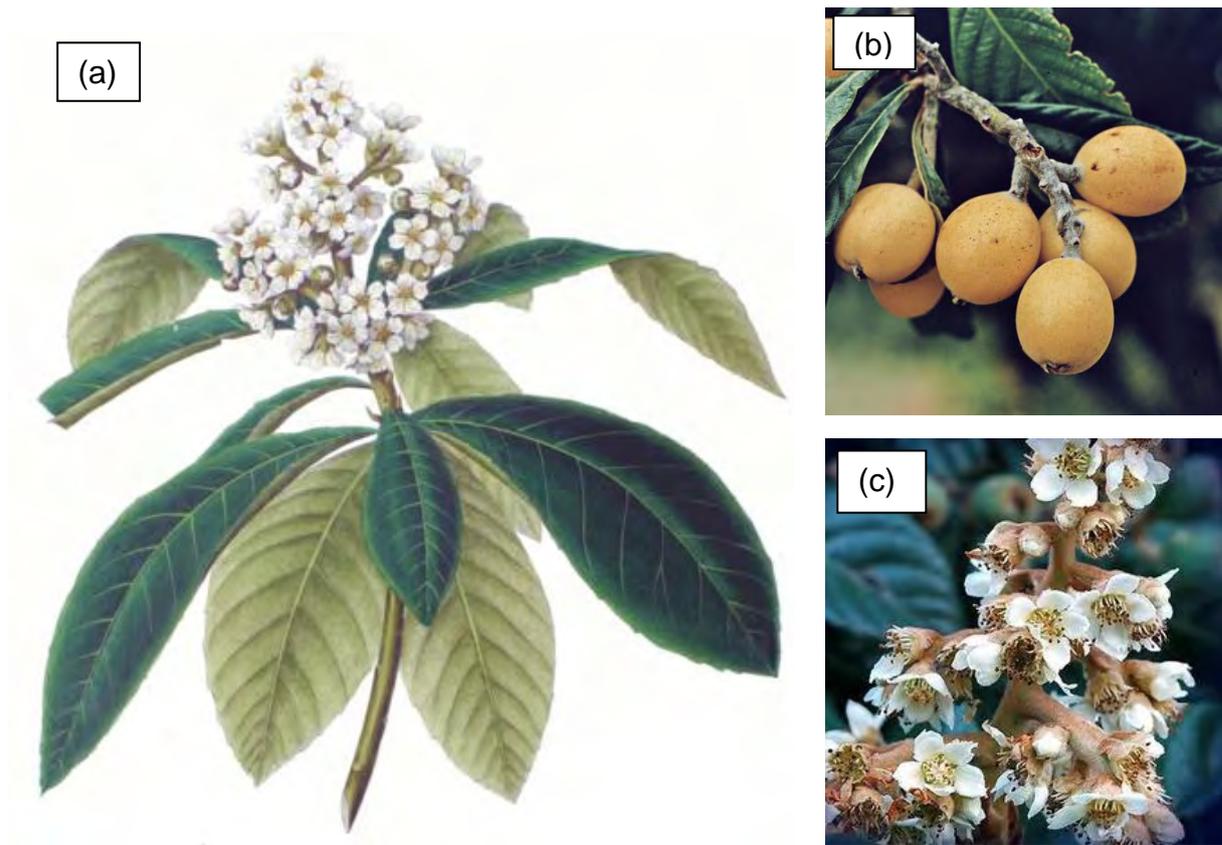
#### **1.4.4.3 Constituintes e atividades biológicas**

De acordo com estudos da composição química desta espécie, o óleo essencial das folhas (3,6%) contém eugenol (77,3%), 1,8-cineol (12,1%),  $\beta$ -cariofileno (2,3%) e (Z)-ocimeno (2,1%), o que justifica seu uso na confecção de licores e como óleo de cravo-da-Índia. O 1,8-cineol é um princípio balsâmico de ação anti-séptica pulmonar e expectorante. Dentre as ações biológicas, esta espécie age como larvicida e repelente de insetos; o óleo essencial tem ação bactericida e analgésica (Lorenzi e Matos, 2008). Além disso, apresenta atividade antimicrobiana e anti-*Leishmania* ( $CE_{50}$  = 100 a 150  $\mu$ g/mL) (Ueda-Nakamura, 2006).

#### **1.4.5 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. (Familia Rosaceae)**

##### **1.4.5.1 Aspectos botânicos e características gerais**

Conhecida popularmente como “nêspera”, “ameixeira amarela”, ou “ameixeira japonesa”, *Eriobotrya japonica* (Figura 24) é uma espécie de clima subtropical, originária da China e cultivada há muito tempo no Japão. Apresenta frutos com coloração amarela ou laranja, com sabor doce e agradável aroma. É uma árvore que atinge oito metros de altura, possui tronco avermelhado, folhas simples e alternas, flores branco-amareladas dispostas em inflorescência terminal (Zappi e Turner, 2001).



**Figura 24:** *Eriobotrya japonica*. Haste do vegetal (a), detalhe dos frutos (b) e detalhe da inflorescência (c).

Fonte: <http://www.ethnopharmacologia.org>

#### **1.4.5.2 Uso na medicina tradicional**

As folhas são empregadas na medicina tradicional como agente hipoglicemiante e no tratamento de doenças da pele, e como antidiarréico (Pio Corrêa 1984).

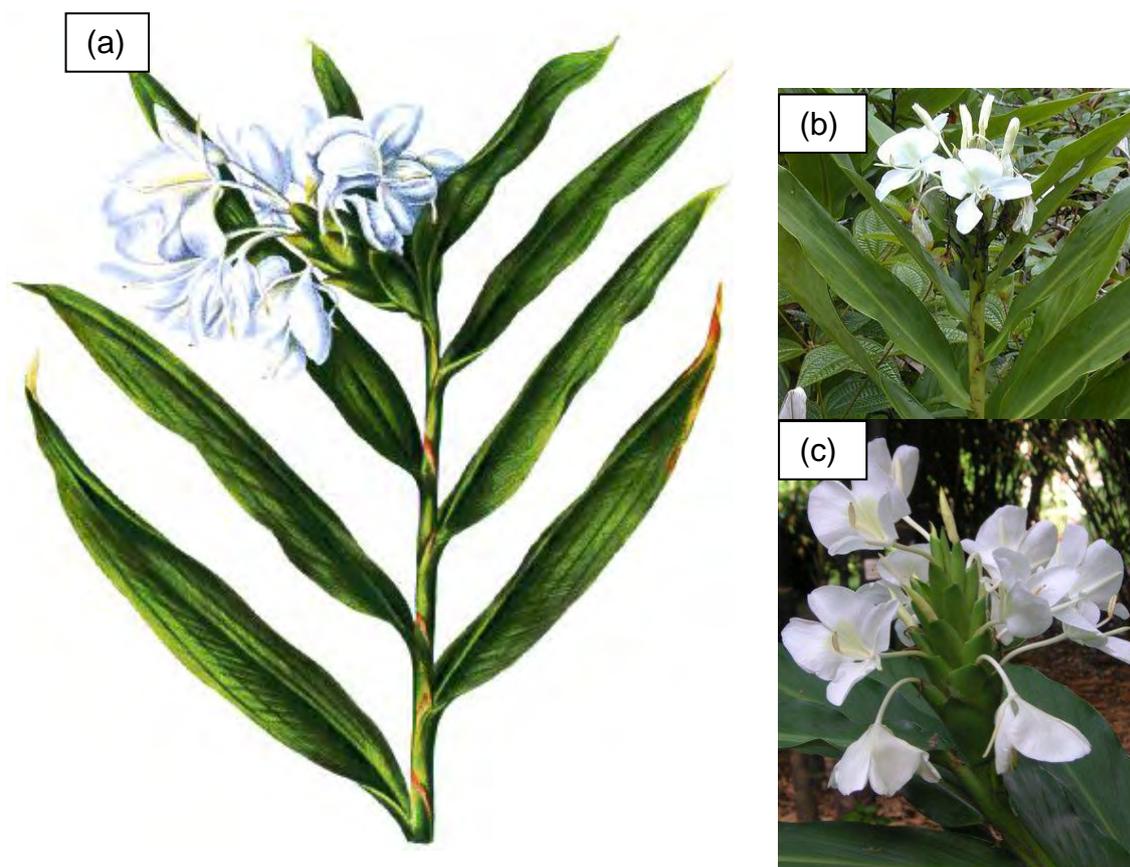
#### **1.4.5.3. Constituintes químicos e atividades biológicas**

Foram isolados carotenóides (Souza, 2003), glicosídeos sesquiterpenóides, triterpenóides (Tommasi *et al.*, 1992; Banno *et al.*, 2005) e flavonóides (Ito *et al.*, 2001). Foi verificado também atividade antiinflamatória e antitumoral de terpenóides isolados da espécie (Banno *et al.*, 2005). Chen e colaboradores (2008) isolaram sesquiterpenos glicosilados que apresentavam atividade hipoglicemante.

#### 1.4.6 *Hedychium coronarium* Koen (Família Zingiberaceae)

##### 1.4.6.1 Aspectos botânicos e características gerais

Conhecida popularmente como “lírio do brejo”, “lágrima de moça”, “lírio branco” e “gengibre branco”, *Hedychium coronarium* (Figura 25) é nativa da Mata Atlântica. É uma espécie herbácea, podendo atingir até 2 metros de altura, possui folhas sésseis, lanceoladas e coriáceas; as inflorescências são terminais com flores brancas e perfumadas. É encontrada em brejos e locais alagados.



**Figura 25:** Espécime de *Hedychium coronarium*. Ramo ereto (a) e (b); detalhe das flores (c).

Fonte: <http://www.ethnopharmacologia.org>

#### **1.4.6.2 Uso na medicina tradicional**

As folhas e flores dessa espécie são usadas na forma de chá, como diurético e para reduzir a pressão arterial (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002). É descrito também como excitante, tônico, antireumático e a flor é usada como cardiotônica, havendo também indicação para infecções bacterianas (Rodrigues, 2006).

#### **1.4.6.3 Constituintes químicos e atividades biológicas**

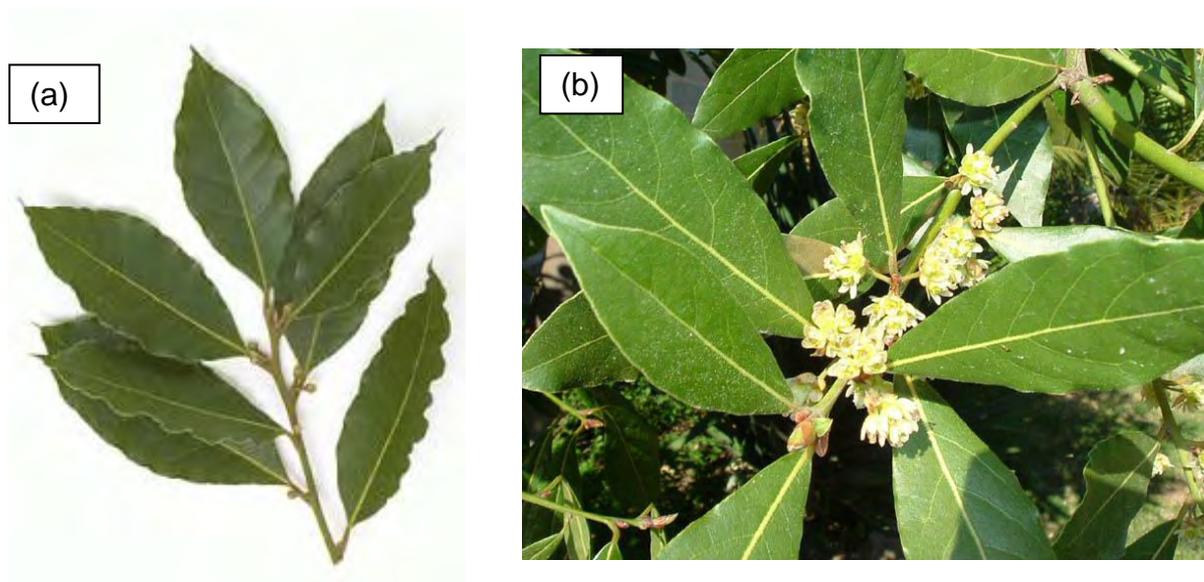
Morikawa *et al.* (2002) relataram o isolamento de dois sesquiterpenos : 8,9-diacetato de hedichiol A e hedichiol B a partir do extrato metanólico do rizoma desta espécie. Estes compostos apresentaram atividade antialérgica.

Valadeau e colaboradores (2009) relataram atividade anti-*L. amazonensis*.

#### **1.4.7 *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)**

##### **1.4.7.1 Aspectos botânicos e características gerais**

Conhecida popularmente como “craveiro”, “louro cravo”, “louro”, “craveiro-do-mato”, “chá-de-bugre” e “cravo”, *Pimenta pseudocaryophyllus* (Figura 26) é uma espécie aromática que atinge de 4 a 10 m de altura. É encontrada em algumas regiões como arbusto, onde seu caule é geralmente ereto, chegando às dimensões de 20 a 30 cm de altura. Possui folhas prateadas na face inferior, com comprimento de 5 a 10 cm e largura de 2 a 4 cm. Essa espécie arbórea produz flores brancas muito perfumadas e possui inflorescências. Segundo Lorenzi (2002), a espécie ocorre no Brasil nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás e até no Estado de Santa Catarina, nas regiões de altitude, tanto em florestas como em caatingas (Lorenzi, 2002).



**Figura 26:** Espécime de *Pimenta pseudocaryophyllus*.:Detalhe da folha (a); detalhe das flores (b).

Fonte: <http://www.ethnopharmacologia.org>

#### **1.4.7.2 Uso na medicina tradicional**

Segundo Paula e colaboradores (2008), não foram encontrados na literatura relatos de aplicação medicinal de *P. pseudocaryophyllus*, porém, popularmente, no município de São Gonçalo do Abaeté (MG) as folhas são utilizadas no preparo de chás para estados gripais, e, no município de Campos do Jordão (SP), as folhas são empregadas no preparo de chás calmantes, reguladores da digestão e da menstruação e há relatos do uso dessa espécie como germicida.

#### **1.4.7.3 Constituintes químicos e atividades biológicas**

Paula e colaboradores (2008) relataram a presença de compostos fenólicos, taninos e flavonóides. Segundo Di Stasi e Hiruma-Lima (2002) a família das Myrtaceae possui como componente majoritário, o eugenol, que é usado como flavorizante em produtos alimentícios, especialmente em carnes e salsichas, sendo também usado em condimentos. Nos produtos cosméticos é usado em perfumes e sabonetes também servindo de matéria-prima para a produção do isoeugenol para a fabricação da baunilha. O Brasil inclui-se entre os maiores exportadores de óleos essenciais de folhas de mirtáceas