

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARIANNA COLARES ALBUQUERQUE

ATIVIDADE *IN VITRO* DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Peschiera affinis*, *Pithecellobium dulce* E *Pilocarpus microphyllus* SOBRE *Leishmania chagasi*

FORTALEZA-CE
2010

MARIANNA COLARES ALBUQUERQUE

ATIVIDADE *IN VITRO* DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Peschiera affinis*, *Pithecellobium dulce* E *Pilocarpus microphyllus* SOBRE *Leishmania chagasi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra.: Claudia Maria Leal Bevilaqua

FORTALEZA-CE
2010

MARIANNA COLARES ALBUQUERQUE

ATIVIDADE *IN VITRO* DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Peschiera affinis*, *Pithecellobium dulce* E *Pilocarpus microphyllus* SOBRE *Leishmania chagasi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Claudia Maria Leal Bevilaqua
Orientadora – UECE

Selene Maia de Moraes
Co- Orientadora – UECE

Lúcia de Fátima Lopes dos Santos
Examinadora-UECE

AGRADECIMENTOS

- A Deus por ter atribuído a mim força, alegria e determinação em cada etapa da minha vida.
- A professora orientadora Claudia Maria Leal Bevilaqua pela atenção, confiança, paciência, apoio indispensável para a realização do mestrado e contribuição para o meu crescimento profissional.
- A Dra. Selene Maia de Moraes pela co-orientação, compreensão e por me amparar no desenvolvimento dos procedimentos químicos.
- Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. por me receber com muita hospitalidade no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e ter transmitido conhecimento fundamental para a finalização deste projeto, e a toda sua equipe, principalmente a Roselaine Pereira Alvim Cardoso por toda dedicação e carinho por mim.
- A toda equipe do Laboratório de Produtos Naturais (UECE), principalmente a Lyeghyna Andrade Machado pela grandiosa paciência e ajuda essencial neste longo trajeto de aventura no mundo da química.
- A toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias (LABODOPAR/UECE), principalmente a Fernanda Cristina Macedo Rondon pela amizade, ensinamentos e auxílio indescritível durante todo o andamento deste trabalho e a Diana Romão Bezerra, amiga que esteve sempre do meu lado na faculdade, na clínica, no laboratório, não importa o lugar.
- A minha família e meus amigos por existirem, pelo amor, incentivo e por valorizarem os meus potenciais.
- Ao meu amor, Jorge Luiz Silva Peixoto, por me amar, me completar e me fazer feliz e sua família por ter me acolhido.
- A todos que acreditaram em mim e de uma forma ou de outra me ajudaram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

A leishmaníase visceral, potencial problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais, é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* nas Américas. Os métodos de controle adotados não têm sido efetivos na redução da incidência desta endemia e as drogas empregadas não têm demonstrado eficácia comprovada na terapêutica canina. O uso de plantas medicinais é uma nova vertente de pesquisas em busca de alternativas para o tratamento, devido às atividades promissoras dos seus metabólitos secundários contra *Leishmania* spp. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade de extratos e frações de *Peschiera affinis* e *Pithecellobium dulce*, e alcalóides de *Pilocarpus microphyllus*. A partir das folhas e caules foi obtido o extrato etanólico, que foi submetido a dois processos: fracionamento ácido-básico e cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol em misturas de polaridade crescente. Os extratos etanólicos, os produtos obtidos nos fracionamentos dos extratos e alcalóides isolados foram testados sobre formas promastigotas e amastigotas do parasita sendo avaliado o efeito leishmanicida e a citotoxicidade sobre células monocíticas de murinos RAW 264.7. Em relação a sobrevivência das promastigotas e amastigotas, os extratos etanólicos, as frações e os alcalóides revelaram eficácia estatisticamente semelhante aos controles pentamidina e anfotericina B ($p > 0.05$). O teste de citotoxicidade sobre as células RAW demonstrou que na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a fração Pd2 de *P. dulce* foi a menos tóxica obtendo 89,96% de células viáveis, porém não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) das demais frações, dos extratos etanólicos e do controle positivo anfotericina B (5 $\mu\text{g/ml}$) que obteve 100% de viabilidade. Conclui-se que os extratos etanólicos e as frações apresentaram sobre promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* eficácia semelhante às drogas de referência, além de apresentarem citotoxicidade reduzida.

Palavras Chave: leishmaníase, promastigota, amastigota, citotoxicidade, leishmanicida.

ABSTRACT

The visceral leishmaniasis, a potential public health problem in tropical and subtropical regions, is a parasitic disease caused by *Leishmania chagasi* in the Americas. Control methods adopted have been effective in reducing the incidence of endemic disease and the drugs used have not demonstrated efficacy in therapy on dogs. The use of medicinal plants is a new strand of research in search of alternatives for treatment, due to the promising activities of secondary metabolites against *Leishmania* spp. This study aimed to evaluate the activity of extracts and fractions of *Peschiera affinis* and *Pithecellobium dulce* and alkaloids of *Pilocarpus microphyllus*. From the leaves and stems was obtained from the ethanol extract, which was subjected to two processes: acid-base fractionation and column chromatography on silica gel, using the solvent hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol mixtures of increasing polarity. The ethanol extracts, the products obtained in fractionations of extracts and alkaloids were tested against promastigotes and amastigotes of the parasite and cytotoxicity test on murine monocytic cells RAW 264.7. Regarding the survival of promastigotes and amastigotes, the ethanolic extract, alkaloid and fractions showed statistically similar efficacy to control pentamidine and amphotericin B ($p>0.05$). Cytotoxicity test on RAW cells showed that the concentration of 100 mg/mL, the fraction Pd2 of *P. dulce* was the least toxic obtaining 89,96% of viable cells, but not statistically different ($p>0.05$) from other fractions, of ethanol extracts, of the positive control and amphotericin B (5 μ g/ml) that had 100% viability. We conclude that the ethanol extracts and fractions showed on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi* similar efficacy to the reference drug, besides having reduced cytotoxicity.

Keywords: Leishmaniasis, promastigote, amastigote, cytotoxicity, leishmanicidal.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Formas promastigotas do gênero <i>Leishmania</i> spp em meio de cultura..	13
Figura 2. Formas amastigotas do gênero <i>Leishmania</i> spp fagocitadas por macrófagos.....	13
Figura 3. Formas amastigota e promastigota de <i>Leishmania</i> spp.....	14
Figura 4. Vetores do gênero <i>Lutzomyia</i> spp. a-fêmea, b-macho.....	14
Figura 5. Ciclo clássico de transmissão de <i>Leishmania</i> spp.....	15
Figura 6. Número de casos e incidência da LV no Ceará entre 1986 a 2006.....	17
Figura 7. Casos de LV nas regiões brasileiras entre os anos de 1984 a 2002.....	18
Figura 8. Fórmula estrutural proposta do antimoniato de N-metil glucamina.....	21
Figura 9. Fórmula estrutural da Anfotericina B.....	21
Figura 10. Fórmula estrutural do Isotionato de pentamidina.....	22
Figura 11. Fórmula estrutural Miltefosina.....	23
Figura 12. Fórmula estrutural proposta do Estibogluconato de sódio.....	23
Figura 13. Exemplar de <i>Pithecellobium dulce</i>	25
Figura 14. Exemplar de <i>Peschiera affinis</i>	26
Figura 15. Exsicata de <i>Pilocarpus microphyllus</i>	27

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Relação da atividade leishmanicida de alcalóides.....	28
CAPÍTULO II	
Table 1. Spectral data of the fractions and ethanol extract of <i>P. dulce</i> and <i>P. affinis</i>	46
Table 2. Infrared absorption frequencies.....	47
Table 3. Concentration of extracts and fractions of <i>P. dulce</i> and <i>P. affinis</i> , and alkaloids of <i>P. microphyllus</i> able to inhibit 50% of promastigotes and amastigotes and percent of viability on RAW 264.7.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
LV	Leishmaníase Visceral
UFC	Universidade Federal do Ceará
UECE	Universidade Estadual do Ceará
CCD	Cromatografia em camada delgada
PH	Potencial Hidrogênio Iônico
MTT	Brometo 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-defeniltetrazolium
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
ELISA	<i>Ensaio</i> imunoenzimático indireto
CE₅₀	Concentração Efetiva
µl	Microlitros
ml	Mililitros
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
g	Grama
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

	Pág
1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	12
2.1 Leishmaníase	12
2.1.1 Classificação Taxonômica.....	12
2.1.2 Ciclo de Transmissão.....	14
2.1.3 Epidemiologia.....	16
2.1.4 Diagnóstico.....	18
2.1.5. Controle.....	19
2.2 Tratamento.....	19
2.2.1 Antimoniato de Meglumina.....	20
2.2.2 Estibogluconato de sódio	21
2.2.3 Anfotericina B	21
2.2.4 Pentamidina	22
2.2.5 Aminosidina	23
2.2.6 Miltefosina	23
2.2.7 Alopurinol	23
2.3 Plantas com ação leishmanicida.....	24
2.3.1 <i>Pithecellobium dulce</i>	25
2.3.2 <i>Peschiera affinis</i>	26
2.3.3 <i>Pilocarpus microphyllus</i>	27
2.4 Metabólitos Secundários de Plantas.....	28
2.4.1 Alcalóides.....	28
2.4.2 Flavonóides.....	29
3. Justificativa.....	30
4. Hipótese Científica.....	31
5. Objetivos.....	32
5.1 Gerais.....	32
5.2 Específicos.....	32
Capítulo I.....	33
Capítulo II.....	40
Conclusão.....	53
Perspectiva.....	54
Referências Bibliográficas.....	55
Anexos.....	71

1. INTRODUÇÃO

A leishmaníase é considerada uma das seis doenças tropicais de maior relevância no mundo, principalmente, devido ao seu caráter zoonótico e sua ampla distribuição geográfica. Inicialmente caracterizada como doença de caráter silvestre estendendo-se ao ambiente rural, apresentando crescente expansão para áreas urbanas tornando-se um grave problema de saúde pública.

Esta enfermidade apresenta como agente etiológico, um protozoário heteroxeno, pertencente ao gênero *Leishmania*, que é transmitido através da picada de fêmeas de flebotomíneos da família Psychodidae. No ciclo urbano, o cão atua como principal reservatório, tendo o homem como hospedeiro acidental.

No Brasil é preconizado o tratamento em humanos principalmente com antimoniato pentavalente, contudo, estas drogas apresentam várias limitações como toxicidade elevada, resistência do parasita aos medicamentos, além de inúmeros efeitos colaterais, como dor no local da aplicação, insuficiência renal, hepática, problemas gastrointestinais, entre outros. Segundo a portaria interministerial nº 1426, de 11 de julho de 2008, o tratamento da leishmaníase visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é proibido. Relata-se que o tratamento não diminui a importância deste animal como reservatório do parasita, e mesmo em casos de tentativa é evidenciada a baixa eficácia em termos de cura parasitológica, sendo recomendada a eutanásia dos cães positivos, porém esta medida de controle tem ocasionado um grande impacto social, considerando que o sacrifício destes animais é sempre traumático para os proprietários e de difícil execução pelas autoridades sanitárias. A maior gravidade neste processo é a possibilidade de cães infectados, ainda assintomáticos, atuarem como reservatórios da infecção, arriscando a saúde de outros animais e de pessoas co-habitantes das regiões afetadas. O uso de plantas medicinais, devido à presença de diversos metabólitos secundários com atividades farmacológicas, sendo muitos já utilizados no desenvolvimento de medicamentos para outras doenças, representa uma nova vertente de pesquisas em busca de alternativas para o desenvolvimento de uma terapêutica eficaz contra a leishmaníase visceral canina que ofereça melhor qualidade de vida ao animal e evite que este permaneça portador da doença. E através do aprofundamento de estudos fitoquímicos e farmacológicos, há a possibilidade de se verificar nas plantas, fontes de bioativos capazes de eliminar o parasita no hospedeiro vertebrado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaníase

A leishmaníase, doença de origem parasitária, ocasionada por um protozoário do gênero *Leishmania* spp, representa uma protozoonose de grande importância mundial com alta morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais. As espécies do gênero *Leishmania* têm uma ampla distribuição entre países tropicais e subtropicais, incluindo vários países da América Latina, África, Índia, parte da Ásia ocidental e central e alguns países europeus próximos ao Mediterrâneo (LAINSON; SHAW, 1987).

A manifestação clínica das leishmaníases pode ocorrer de várias formas dependendo de fatores como a espécie do parasita envolvida, a resposta imune do hospedeiro e o flebotômíneo vetor, cuja saliva contém componentes como o maxadilán, que promovem vasodilatação local, evitando a coagulação do sangue, e induzindo um perfil de resposta imune celular no local da lesão, contribuindo assim com a evolução da infecção (SACKS; KAMHAWI, 2001; RODRÍGUEZ et al., 2008).

As espécies causadoras da Leishmaníase Tegumentar com resolução espontânea são consideradas menos virulentas que aquelas causadoras de Leishmaníase Visceral (LV) potencialmente fatais (CHANG; McGWIRE, 2002). No Brasil, existem sete espécies distintas do parasita sendo que, destas, seis (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lansoni*, *L. shawii*, *L. naiffi*) são responsáveis pela Leishmaníase Tegumentar Americana e uma espécie (*L. chagasi*) responsável pela Leishmaníase visceral (GENARO; MICHALICK, 2005; GENARO; REIS, 2005).

A leishmaníase visceral é caracterizada por apresentar evolução crônica com envolvimento sistêmico através de sinais como hepatoesplenomegalia e caquexia podendo levar a morte. Porém, dependendo da fase da doença e da imunidade do animal, este pode apresentar-se assintomático (SIMÕES-MATTOS et al., 2002; MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

2.1.1 Classificação Taxonômica

O agente etiológico da forma visceral da doença é um protozoário pertencente ao reino Protista, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e complexo *Leishmania donovani*, representado pelas espécies *L. donovani*, *L. archibaldi*,

L. infantum, que ocorrem no Velho Mundo e *L. chagasi*, que ocorre no Novo Mundo (MAURICIO et al., 2001; BARBOSA et al., 2008). Alguns autores acreditam que a *L. chagasi* é sinônimo de *L. infantum*, que foi importada da Europa, durante a colonização espanhola (KILLICK-KENDRICK, 1985; RIOUX et al., 1990). Outros, no entanto, acreditam que a *L. chagasi* teria estado presente nas Américas antes da colonização européia (LAINSON; RANGEL 2005). As leishmânias apresentam duas formas evolutivas: a amastigota, que é obrigatoriamente parasita intracelular de vertebrados, não apresenta movimento, contendo um flagelo interno, enquanto que a forma promastigota se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados, possui um flagelo alongado, sendo encontrada no meio extracelular. A multiplicação das amastigotas ocorre no interior de vacúolos parasitóforos em macrófagos de diferentes tecidos, originando a doença tegumentar ou visceral (RATH et al., 2003; MICHALICK, 2005).

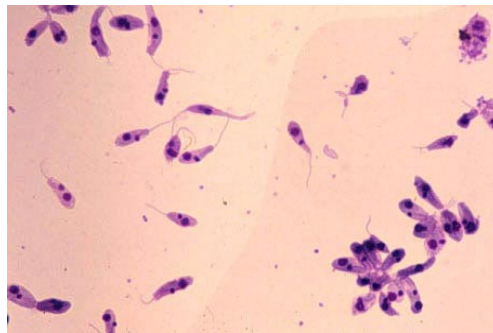


Figura 1. Formas promastigotas do gênero *Leishmania* spp em meio de cultura.

Fonte: <http://www.pasteur.ac.ir/researchDepartment/parasitology/Farsi/index.htm>

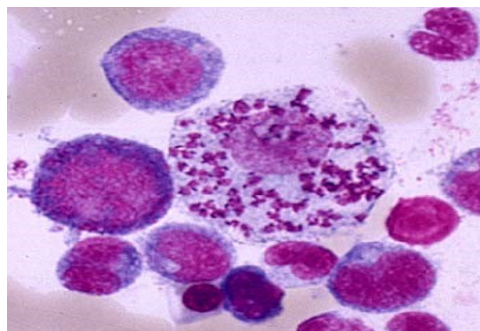


Figura 2. Formas amastigotas do gênero *Leishmania* spp fagocitadas por macrófagos.

Fonte: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/joiner/index.php>

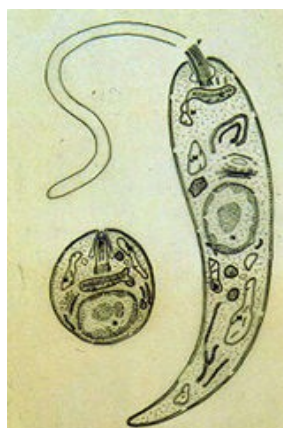


Figura 3. Formas amastigota e promastigota de *Leishmania* spp.

Fonte: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>

2.1.2 Ciclo de Transmissão

A transmissão do parasita ocorre através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. Pertencem aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados, apresentando atividade crepuscular e pós-crepuscular e abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos (RATH et al., 2003). No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* está relacionada com a transmissão de *L. chagasi* (ALVAR et al., 2004). Em 1998, *Lutzomyia cruzi* foi identificado como o vetor em Corumbá, Mato Grosso do Sul, e evidências de transmissão da Leishmaníase visceral por esta espécie foi descrita recentemente no município de Jaciara, Mato Grosso (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

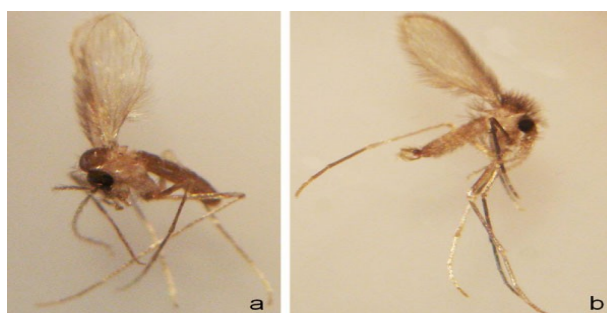


Figura 4. Vetores do gênero *Lutzomyia* spp. a-fêmea, b-macho.

Fonte: <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S1/figure/F3>

Estes insetos ao se alimentarem do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou tecidos, têm seu trato digestivo colonizado por formas promastigotas do parasita, podendo ser eliminadas durante o repasto sanguíneo ao se alimentar de outro vertebrado. Uma vez em seu novo hospedeiro, essas formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos no interior dos quais se diferenciam em amastigotas, e se multiplicam reiniciando o ciclo (RATH et al., 2003; GONTIJO; MELO, 2004).

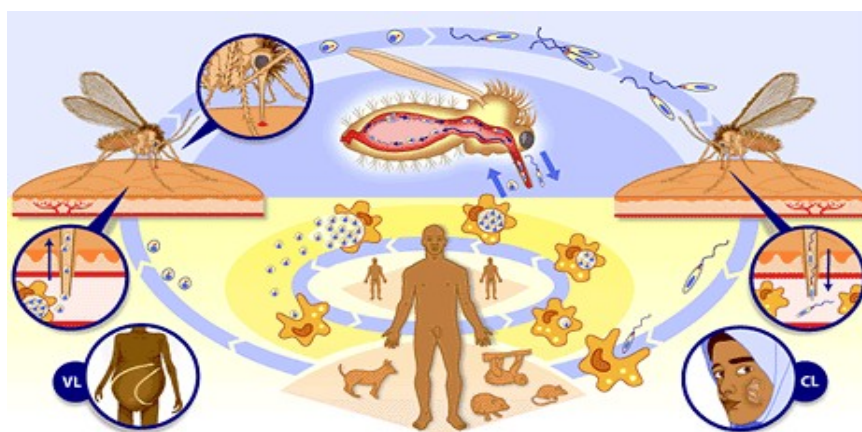


Figura 5. Ciclo clássico de transmissão de *Leishmania* spp.

Fonte: <http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/LifeCicle.html>

O cão é identificado como reservatório doméstico e fonte principal de infecção do vetor no ciclo urbano. Os hospedeiros silvestres de *L. chagasi* conhecidos são as raposas e os marsupiais. Duas espécies de raposas foram encontradas naturalmente infectadas: *Lycalopex vetulus* no Ceará (DEANE, 1956); e *Cerdocyun thous* no Pará (LAINSON et al., 1990) e em Minas Gerais (SILVA et al., 2000). *L. chagasi* foi isolada em marsupiais do gênero *Didelphis* na Bahia (SHERLOCK, 1984) e no Rio de Janeiro (CABRERA et al., 2003). O fato destes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico, representando uma fonte de infecção para os vetores, sendo um dos alvos nas estratégias de controle (GONTIJO; MELO, 2004).

Entre um mês e sete anos, período equivalente ao período de incubação, desenvolvem-se lesões leishmaniosas na pele e em órgãos viscerais (ETTINGER, 1997; NELSON; COUTO, 2001). Os cães geralmente com leishmaníase visceral apresentam frequentemente perda de peso, embora com apetite normal, poliúria, polidipsia,

debilidade muscular, depressão, vômito, diarreia, onicogrifose, conjuntivite, ceratite, tosse, epistaxe, espirro e melena, além de hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, proteinúria, atividades aumentadas das enzimas hepáticas, trombocitopenia, azotemia, linfopenia e leucocitose com desvio a esquerda (NELSON; COUTO, 2001). A hiperqueratose é evidenciada, além da despigmentação e ressecamento dos focinhos e coxins (TILLEY; SMITH JUNIOR, 2003). Geralmente, a perda de peso mais profundo ocorre secundariamente à insuficiência renal induzida por complexo imune, sendo a principal causa de óbito. A esplenomegalia é nítida em muitos casos (ETTINGER, 1997).

2.1.3 Epidemiologia

A leishmaníase predomina em quase todos os continentes, com exceção da Antártida, sendo considerada endêmica em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde 90% dos casos de Leishmaníase visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão (RATH et al., 2003, MISHRA et al., 2009).

No Brasil, a LV, apresenta um perfil epidemiológico variado devido às alterações climáticas, fisiográficas, biológicas, sociais que variam de acordo com a região e que interagem para produzir a doença. Acredita-se que a distribuição da doença ocorre de forma cíclica, isto é, com um aumento dos casos em intervalos médios de cerca de cinco anos, entretanto esta tendência varia entre os diferentes municípios e Estados (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Em 1913 foi registrado pela primeira vez um caso de Leishmaníase visceral no Brasil no estado de Mato Grosso. Em 1934, novos casos foram relatados em 41 pacientes suspeitos de febre amarela na região Nordeste, sendo confirmado após viscerotomia *post-mortem*. Acreditava-se que a transmissão era exclusivamente rural ou silvestre. Em 1934, a LV teve seus primeiros casos registrados no Estado do Ceará na cidade de Sobral (BRAVO, 2007). Na década de 1950, um estudo em Sobral, mostrou que dos 177 pacientes examinados, 96% foram infectados em zonas rurais, como encostas, cavidades e grutas. Entretanto, 4% (7) dos pacientes haviam sido infectados na área urbana de Sobral, após confirmação de casos de infecção canina (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). A figura 6 estabelece a ligação entre o número de casos no Ceará e a respectiva incidência.

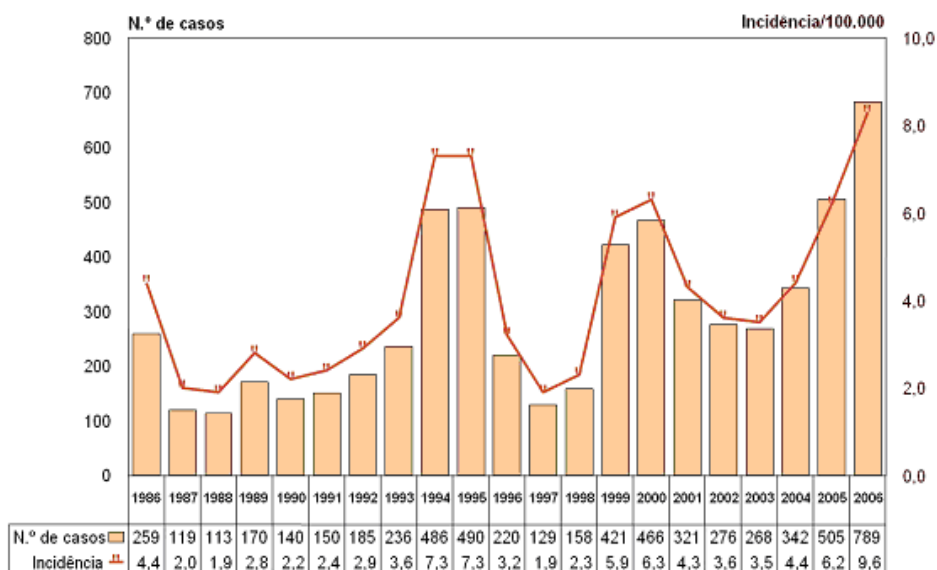


Figura 6. Número de casos e incidência da LV no Ceará entre 1986 a 2006.

Fonte: Secretaria da Saúde do Estado Do Ceará, 2007

A intensa urbanização favoreceu a expansão da doença, sendo caracterizada por alterações ambientais antrópicas e a migração rápida e marcante de populações rurais para as periferias urbanas em busca de habitação adequada e infra-estrutura de saneamento. Além disso, foi observado que a espécie *L. longipalpis* adaptou-se facilmente ao peridomicílio, facilitada pelas condições favoráveis de reprodução do vetor neste ambiente (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Desde a década de 1980, os casos e surtos de LV foram notificados com transmissão autóctone dentro dos limites da cidade de São Luís (Maranhão), Teresina (Piauí), Natal (Rio Grande do Norte), Aracaju (Sergipe), Fortaleza (Ceará), Rio de Janeiro, Corumbá (Mato Grosso do Sul), Araçatuba (São Paulo) e Montes Claros e Sabará (Minas Gerais). Levantamentos de 1980 a 2005 demonstraram que o Brasil registrou 59.129 novos casos da doença, com uma média anual de 2.274 novos casos. Sendo 82,5% (48.783) ocorrentes na região Nordeste, demonstrado na figura 7. Atualmente, 20 (74%) dos Estados do Brasil possuem registros de casos autóctones (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

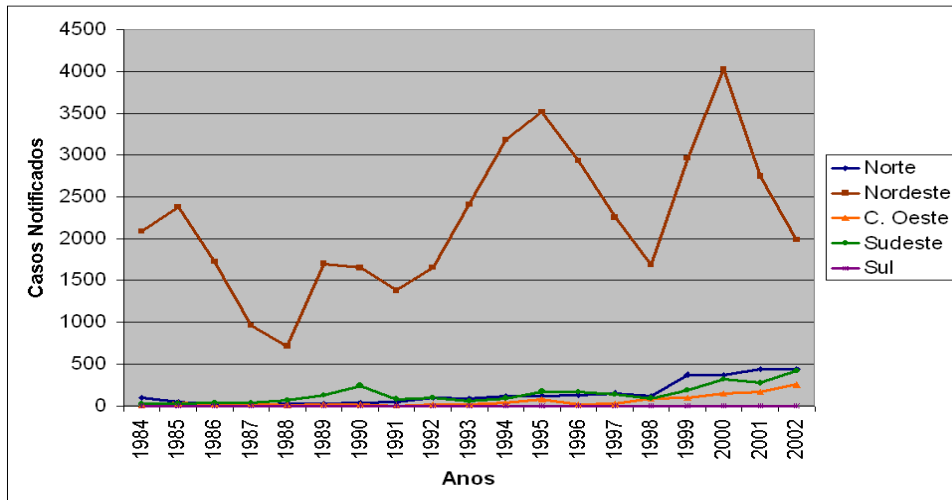


Figura 7. Casos de LV nas regiões brasileiras entre os anos de 1984 a 2002.

Fonte: Ministério da Saúde, 2003

Do ponto de vista epidemiológico, a doença canina é considerada mais importante que a doença humana, pois, além de apresentar alta prevalência da infecção, apresenta grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitas na derme, nos quais os cães doentes representam melhor fonte de infecção para o inseto vetor que o homem doente (DEANE, DEANE, 1955; MATTOS et al., 2004; LUVIZOTTO et al., 2005).

Em relação aos cães, não há relatos de predisposição quanto à raça, sexo e idade, no entanto, acredita-se que raças de pequeno porte sejam menos susceptíveis por habitarem, geralmente, dentro dos domicílios, limitando o acesso dos flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaníase baseia-se nos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Biópsia ou punção aspirativa de material de medula, baço, fígado e linfonodos permitem o diagnóstico parasitológico, através de visualização do parasita em esfregaço sobre lâminas, isolamento em meios de cultura e inoculação em animais de laboratório (MARZOCHI et al., 1993). Para o diagnóstico sorológico, no Brasil, são realizados com maior frequência o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Sendo o ELISA mais sensível e menos específico

que a RIFI (GONTIJO; MELO, 2004). E há ainda métodos moleculares como a reação de polimerase em cadeia (PCR), que apresenta alta sensibilidade, porém apresenta limitações para o uso em inquéritos epidemiológicos que se baseiam no custo, disponibilidade de reagentes e equipamentos (SILVA, 1997; MANNA et al., 2008).

Apesar da grande variedade de testes já desenvolvidos, o ELISA é o teste de eleição para ser utilizado em inquéritos epidemiológicos por reunir uma série de vantagens como: ser de fácil execução, rápido, barato, apresenta adequadas sensibilidade e especificidade quando comparado com outras técnicas, sendo o RIFI o teste confirmatório (ALVES; BEVILACQUA, 2004). ELISA é o teste diagnóstico recomendado pelo Ministério da Saúde nos inquéritos caninos. Apesar das reconhecidas vantagens apresentadas por esta técnica, alguns problemas existem com relação à sua precisão, expressos numa sensibilidade que varia de 90-100% e numa especificidade de 80% para amostras de soro (MOHAMMED et al., 1986; HARITH et al., 1987; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.1.5 Controle

A fim de reduzir a morbidade e a mortalidade da doença é recomendado o diagnóstico e o tratamento precoce dos casos humanos, além da gestão ambiental, o controle químico, com o uso de inseticidas, sobre as populações de vetores e o monitoramento e eutanásia de cães sororreativos, que embora seja ainda um método controverso, estudos indicam que a leishmaníase em cães precede o surgimento de casos humanos. Em cães são utilizadas como alternativas preventivas vacinas e coleiras impregnadas com piretróides, embora não seja demonstrado 100% de eficácia (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

2.2 Tratamento

No Brasil, o tratamento de leishmaníase visceral canina está proibido com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA (MAPA, 2008). Considera-se que não há, até o momento, nenhum fármaco que garanta a eficácia do tratamento canino, bem como a redução do risco de transmissão, e há existência do risco de cães em tratamento manterem-se como reservatórios, além da possibilidade de induzirem a

seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento em humanos.

A primeira tentativa de tratamento no homem ocorreu em 1912, quando Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético era eficaz na terapêutica da Leishmaníase tegumentar americana e após três anos, na Itália, também foi comprovado como eficaz no tratamento da Leishmaníase visceral. Devido à toxicidade elevada e aos graves efeitos colaterais indesejáveis, os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos (RATH et al., 2003).

O tratamento contra a LV tem sido feito com drogas como o antimoniato de meglumina, estibogluconato de sódio, anfotericina B, pentamidina, aminosidina, miltefosina e alopurinol (ALVAR et al., 2004; NIETO et al., 2005). Os antimoniais pentavalentes têm representado a base do tratamento da leishmaníase humana nas últimas décadas, com índices de cura obtidos que variam de 60 a 90%. No entanto, a necessidade de administração parenteral e a toxicidade da droga, principalmente para idosos, cardiopatas e nefropatas dificultam o seu emprego. Embora raros, existem relatos de morte súbita desencadeada pela cardiotoxicidade dos antimoniais (PAULA et al., 2003)

2.2.1 Antimoniato de Meglumina

O antimoniato de N-metil glucamina (figura 8), comercializado como Glucantime® ou antimoniato de meglumina, é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina. Este último por sua vez, é obtido a partir da aminaçãõ redutora da glicose em presença de metilamina. Este composto não apresenta sua fórmula estrutural definida, porém é sabido que é solúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos (RATH et al., 2003).

O seu mecanismo de ação também não está bem elucidado. Contudo, existem várias hipóteses que tentam explicar a ação deste fármaco, como a formação de complexos de carboidratos e antimônio, N-metil-D-glucamina e antimônio, os quais facilitariam a distribuição da droga nos macrófagos do hospedeiro. Sugere-se ainda que o antimoniato de meglumina seja uma pró-droga, convertida no interior do macrófago em antimonial trivalente (ROBERTS et al., 1995) que pode interferir no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e na glicólise do parasita levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

Fatores como baixas dosagens e tratamentos descontínuos, em humanos, levaram a ocorrência de falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasitas. Este medicamento apresenta elevada toxicidade e efeitos colaterais frequentes, como dor no local da aplicação entre outros (RATH et al., 2003).

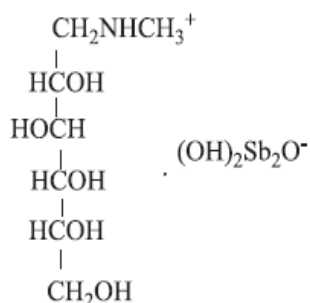


Figura 8 . Fórmula estrutural proposta do antimoniato de N-metil glucamina.

2.2.2 Estibogluconato de sódio

O Estibogluconato de sódio (figura 9) é um antimoniato pentavalente, comercial conhecido como Pentostan® e comercializado nos Estados Unidos, Europa, África e Índia. Apresenta eficácia equivalente ao antimoniato de meglumina, porém possui toxicidade pancreática e hepática mais elevada (SALDANHA, 1998).

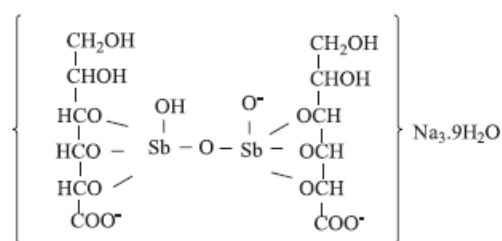


Figura 9 . Fórmula estrutural proposta do Estibogluconato de sódio.

2.2.3 Anfotericina B

A Anfotericina B (figura 10) é um antibiótico da classe dos polienos produzido a partir do *Streptomyces nodosus*. É primariamente uma droga fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp. É

considerado fármaco de segunda linha para o tratamento (LEMKE et al., 2005). Tem como mecanismo de ação a ligação da droga ao ergosterol da membrana celular da leishmânia, provocando uma desorganização estrutural na membrana, formando poros que alteram sua permeabilidade ao potássio intracelular, acarretando em morte do parasita por lise osmótica. Nos mamíferos, a Anfotericina B se liga ao colesterol da membrana celular, o que parece estar relacionado aos efeitos adversos deste fármaco, como tremores, febre, náuseas, vômitos, anorexia, mialgias, artralgias, e perda de peso, sendo a nefrotoxicidade a principal expressão tóxica. (NIETO et al., 2005). A forma lipossomal age especificamente sobre as células-alvo (macrófagos), sendo incorporada ao meio intracelular e, assim, reduzindo os efeitos colaterais com maior índice de eficácia terapêutica. Porém apresenta alto custo e a administração endovenosa limita o tratamento (PAULA et al., 2003).

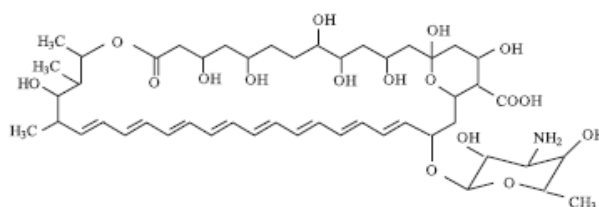


Figura 10 . Fórmula estrutural da Anfotericina B.

2.2.4 Pentamidina

A pentamidina (figura 11) é considerada como droga de segunda escolha, principalmente nos casos em que os pacientes não respondem aos antimoniais ou para pacientes hipersensíveis ao antimônio. Quanto ao seu mecanismo de ação, sabe-se que interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto. Têm sido implicados à pentamidina efeitos colaterais imediatos e tardios, além de apresentar toxicidade elevada, sendo descritos casos de morte repentina (RATH et al., 2003). Entre os efeitos imediatos incluem-se hipotensão, náuseas, vômitos e síncope. Atuam sistemicamente no metabolismo da glicose, gerando hipoglicemia em 8% dos casos e o efeito diabetogênico. Na fase mais tardia, atingem 5% dos casos, sendo a alteração mais frequente, a renal. Considerando-se exclusivamente o custo da droga, a pentamidina custa duas vezes mais do que o antimonial (PAULA et al., 2003).

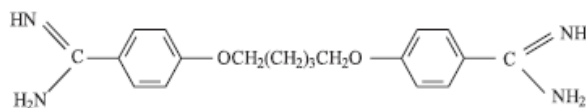


Figura 11 . Fórmula estrutural do isotionato de pentamidina.

2.2.5 Aminosidina

A Aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces rimosus*, que tem atividade leishmanicida testada em modelos experimentais animais e contra várias espécies de *Leishmania in vitro* (POLI et al., 1997). O seu mecanismo de ação é baseado no bloqueio da ligação do RNA a unidade 30S dos ribossomos, provocando alteração na síntese protéica do parasita (NOLI; AUXILIA, 2005). Embora a droga apresente eficácia para a melhora no quadro clínico, os animais tratados podem ainda funcionar como reservatório para a infecção humana. A ototoxicidade e a nefrotoxicidade são os principais efeitos colaterais relatados (VENEXAT et al., 1998).

2.2.6 Miltefosina

A miltefosina (figura 12), hexadecilfosfocolina, é uma droga alquilfosfocolina que foi eficaz na ativação de macrófagos de camundongos infectados por *Leishmania* spp. e na inibição da síntese de lipídeos destes protozoários (SINDERMANN et al., 2004). O mecanismo de ação ainda é controverso. O fármaco pode provocar vômitos e diarreia, elevar a uremia e os níveis sanguíneos de transaminases (FISHER et al., 2001).

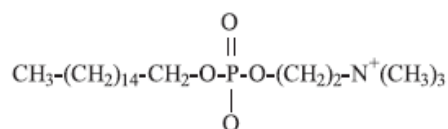


Figura 12 . Fórmula estrutural Miltefosina.

2.2.7 Alopurinol

O alopurinol é outro quimioterápico muito utilizado no protocolo terapêutico da LV, normalmente associado aos antimoniais, devido a sua atividade apenas inibitória do crescimento de *Leishmania* spp. Contudo, apresenta uma toxicidade reduzida quando

comparado aos antimônios, sendo também de fácil administração através da via oral. Porém, os resultados obtidos na terapia com o uso isolado do alopurinol não tem se mostrado eficaz na cura da Leishmaníase visceral canina (DENEROLLE; BOURDOISEAU, 1999).

Novos quimioterápicos anti-leishmaníases estão sendo testados a fim de inibir as principais vias metabólicas do parasita. Entre estes incluem: inibidores do metabolismo de folatos, da síntese de poliaminas, da síntese de tubulinas, da biossíntese de esteróides, de DNA topoisomerasas, de complexos organometálicos (BEZERRA et al., 2004).

2.3 Plantas com ação leishmanicida

Ao longo da história da civilização, as plantas são utilizadas não só como fonte de alimento, mais também como objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de princípios ativos para a obtenção de remédios, cosméticos, perfumes e venenos (AGRA et al., 1994). Nos últimos anos, as plantas tornaram-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, tendo como base a medicina popular (ROCHA; ROCHA, 2006). Aproximadamente 25% dos medicamentos do mercado farmacêutico possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de drogas semi-sintéticas (BERGMANN et al., 1997).

Várias pesquisas têm evidenciado como foco de estudo a atividade leishmanicida de compostos isolados nas espécies vegetais, através de ensaios *in vitro* e *in vivo* sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* spp. Dentre eles alcalóides de *Dysoxylum binectariferum* (LAKSHMI et al., 2007), alcalóides β -carbolina isolado de *Peganum harmala* (MISHRA et al., 2009), diterpenos de *Laetia procera* (JULLIAN et al., 2005), chalconas (CHEN et al., 1993), naftoquinonas (KAYSER et al., 2000), iridóides espirolactonas de *Himanthus sucuuba* (CASTILLO et al., 2007), iridóides glicosídicos de *Scrophularia lepidota* (TASDEMIR et al., 2005), polifenólicos de *Cocos nucifera* L. (MENDONÇA-FILHO et al., 2004), taninos (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005); aminoglicosteróides e aminosteróides de *Holarrhena curtisii* (KAM et al., 1997), neolignanas de *Virola surinamensis* (BARATA et al., 2000) e flavonóides de *Centrolobium sclerophyllum* (ARAÚJO et al., 1998).

2.3.1 *Pithecellobium dulce*



Figura 13. Exemplar de *Pithecellobium dulce*.

Fonte: arquivo pessoal

Pithecellobium dulce Benth. (figura 13) é uma árvore que atinge até 18m de altura, nativa das Américas, sendo encontrada também em regiões tropicais como a Índia. É conhecida popularmente como espinheira. Esta planta pertence a família Fabaceae, considerada a terceira maior família das angiospermas, por compreender cerca de 750 gêneros e mais de 18.000 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais, áridas e semi-áridas (HEYWOOD, 1996; ALMEIDA et al., 2003; WINK, 2003). A espécie *P. dulce* está inserida na subfamília Mimosoideae, e é abundante no Nordeste brasileiro (TUCKER, 2003).

Nesta espécie, têm sido descrita a classe dos flavonóides, dentre estes são encontrados flavonóis, flavonóis glicosados, flavonas, isoflavonas, chalconas, entre outros (HARBONE, 1971). Já foram relatados vários tipos de metabólitos secundários, como antraquinonas, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, glicosídeos cianogênicos (WINK, 2003).

Pesquisas demonstram que a casca da planta tem sido utilizada contra disenteria, dermatite e inflamação ocular além de apresentar ação antipirética. As folhas são reportadas por possuir propriedades adstringentes, emolientes, abortivas, anticonvulsivantes, anti-ulcerosos, anti-diabéticos e no tratamento de distúrbios intestinais (SUGUMARAN et al., 2008; SIRI et al., 2008; SUGUMARAN et al., 2009).

2.3.2 *Peschiera affinis*



Figura 14. Exemplar de *Peschiera affinis*.

Fonte: http://www.territorioscuola.com/software/index_pt.php?title=Tabernaemontana

Peschiera affinis (figura 14) é um arbusto perene, podendo chegar ao porte de pequena árvore, bioprodutora de abundante látex branco e viscoso. Esta espécie é conhecida popularmente como grão de galo e é considerada ambígua no gênero, em relação aos tipos de alcalóides isolados do gênero *Tabernaemontana*, que apresentam diferenças químicas com discreta significação sistemática (WOLTER-FILHO et al., 1985). É um arbusto lactescente com ampla distribuição no Brasil, comum na região Nordeste, e pertencente à família Apocynaceae, que encontra-se entre as dez maiores famílias de angiospermas, englobando de 250 a 550 gêneros e entre 3700 a 5100 espécies, sendo representada em todos os continentes, com exceção da Antártica (SOUZA et al., 2006).

Dentre os metabólitos secundários mais conhecidos quimicamente e farmacologicamente e utilizados medicinalmente estão os alcalóides, mais especificamente alcalóides do tipo indólicos e bisindólicos. Estes compostos foram isolados em diferentes partes da planta, principalmente em cascas e folhas (RODRÍGUEZ et al., 2008). Pesquisas demonstram que estes alcalóides indólicos apresentam diversas atividades biológicas, tais como, contraceptiva, anti-inflamatória, antimalarial, anti-HIV, leishmanicida, antitumoral, antimicrobiana, anti-hipertensiva, anticolinesterase e estimulante do sistema nervoso central (SANTOS et al., 2009). É relatado que apresenta também nas suas estruturas químicas, compostos do tipo terpenóides, lignanas, glicosídeos, esteróides e triterpenos (RODRÍGUEZ et al., 2008).

As espécies *Peschiera australis* e *Tabernaemontana catharinensis* já foram testadas contra *Leishmania amazonensis* (RODRÍGUEZ et al., 2008).

2.3.3 *Pilocarpus microphyllus*



Figura 15. Exsicata de *Pilocarpus microphyllus*.

Fonte: http://www.herbs2000.com/herbs/herbs_jaborandi.htm

Pilocarpus microphyllus (figura 15) é uma espécie conhecida popularmente como jaborandi, considerada genuinamente brasileira, apresentando ampla ocorrência no Norte e Nordeste brasileiro. É uma árvore que pode atingir cerca de 6 a 8 metros, pertencente a família Rutaceae, que ocorre espontaneamente nos estados do Pará e Maranhão. Caracterizada como uma espécie de sub-bosque de mata pré-amazônica, podendo também ser encontrada em áreas desmatadas (EIRA et al., 1992). A família Rutaceae é constituída de 1600 espécies distribuídas em aproximadamente 150 gêneros (CORTEZ et al., 2006).

O gênero *Pilocarpus* compreende 13 espécies neotropicais distribuídas entre os trópicos de câncer e capricórnio. No Brasil são encontradas nove espécies, que recebem designação geral de jaborandi, sendo a pilocarpina produzida no país, em escala industrial, a partir do *P. microphyllus* (LUCIO et al., 2002). Esta planta tem sido estudada amplamente, devido à sua composição de metabólitos secundários e apresenta larga importância econômica para o Brasil, principalmente por conter em suas folhas um teor elevado de alcalóides, como a pilocarpina, um alcalóide imidazólico, utilizado mundialmente no controle do glaucomas primários. Desta espécie, além da pilocarpina foram isolados os alcalóides também imidazólicos conhecidos como isopilosina, epiisopilosina e epiisopiloturina (ANDRADE-NETO, 1997).

2.4 Metabólitos Secundários de Plantas

As plantas produzem uma série de substâncias químicas durante o seu metabolismo (BOSCOLO; VALLE, 2008). Os compostos resultantes do metabolismo primário são predominantes e essenciais à sobrevivência e desenvolvimento das plantas, como carboidratos e proteínas. Enquanto os metabólitos secundários não são necessariamente essenciais, porém estão envolvidos na resistência contra pragas e doenças, na atração de polinizadores, na interação com microorganismos simbióticos, entre outros. Porém estes metabólitos estão presentes em concentrações reduzidas nas plantas, a maioria deles são alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides e flavonóides, que têm sido empregados comercialmente como fármacos, corantes, aromas, inseticidas, entre outros. Esses compostos apresentam uma ampla diversidade em estruturas e tamanhos sendo encontrados e distribuídos por todo o reino vegetal (LOURENÇO, 2003).

2.4.1 Alcalóides

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas predominantemente em angiospermas (BOTSARIS, 2002). São substâncias orgânicas cíclicas que contêm um nitrogênio em estado de oxidação negativo, sendo distribuídas somente entre os organismos vivos. Estão presentes em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (HENRIQUES et al., 1999). A tabela abaixo demonstra resumidamente resultados obtidos por alcalóides de diferentes espécies vegetais sobre diversas espécies de *Leishmania* (MISHRA et al., 2009).

Tabela 1. Relação da atividade leishmanicida de alcalóides.

ALCALÓIDES	ESPÉCIES VEGETAIS	ATIVIDADE
ALCALÓIDES QUINOLINOS		
2-n-propilquinolina	<i>Galipea longiflora</i> <i>Krause</i> (Rutaceae)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> sobre <i>L. braziliensis</i>
Chimanina-D	<i>Galipea longiflora</i> <i>Krause</i> (Rutaceae)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> sobre <i>L. braziliensis</i>

ALCALÓIDES INDÓLICOS		
Pleiocarpina	<i>Kopsia griffithii</i> (Apocynaceae)	<i>In vitro</i> sobre promastigotas de <i>L. donovani</i>
Gabunina	<i>Peschiera van</i> <i>heurkii</i> (Apocynaceae)	<i>In vitro e in vivo</i> sobre promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>

Fonte: MISHRA et al., 2009

Com base na ampla diversidade química presente nos produtos naturais e nas atividades promissoras de alcalóides demonstradas contra *Leishmania* spp., estes podem ocasionar um impacto positivo sobre o tratamento da LV canina (MISHRA et al., 2009).

2.4.2 Flavonóides

Os flavonóides consistem em compostos fenólicos que apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (SIMÕES et al., 1999). Os flavonóides podem ser encontrados na forma aglicosilada, como a quercetina, contudo geralmente se apresenta no reino vegetal na forma glicosilada, unidas a moléculas de açúcares (SPANOS, WROLSTAD, 1992).

Os flavonóides são importantes por apresentarem uma estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, sendo antioxidantes com maior ação do que as vitaminas C e E (BARREIROS; DAVID, 2006). Porém esta atividade antioxidante depende da sua estrutura, sendo sugeridos vários métodos antioxidantes como a opressão da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres, a quelação de íons metálicos, o sequestro de radicais livres, a regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes e a indução de enzimas antioxidantes (MIDDLETON et al., 2000; PIETTA, 2000).

Os flavonóides apigenina e luteolina foram ativos quando testados contra *L. amazonensis* (SCHINOR et al., 2007). Foi demonstrado o efeito inibitório *in vitro* dos flavonóides luteolina e quercetina sobre o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*. E no tratamento *in vivo*, por via oral, com essas substâncias, causou uma significativa redução da carga parasitária em baços de hamsters infectados com *L. donovani* (MITTRA et al., 2000).

3. JUSTIFICATIVA

A ausência de tratamento efetivo contra LV canina além da possibilidade de desenvolvimento de cepas resistentes aos poucos fármacos utilizados no tratamento do homem, impulsionou a busca por novos agentes terapêuticos para combater esta doença. Considerando a biodiversidade existente na flora brasileira e o seu potencial como fonte de moléculas bioativas a serem estudadas e exploradas, acredita-se que muitos metabólitos podem apresentar efeitos promissores no tratamento da LV.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os extratos etanólicos e as frações de *Peschiera affinis* e *Pithecellobium dulce*, e os alcalóides, pilocarpina e epiisopilosina, isolados a partir de *Pilocarpus microphyllus* apresentam atividade leishmanicida sobre promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e baixa toxicidade sobre macrófagos de murinos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos extratos etanólicos e das frações de *P. affinis* e *P. dulce* e dos alcalóides isolados de *P. microphyllus* contra *L. chagasi*.

5.2 Objetivos específicos

- Testar a eficácia *in vitro* dos extratos etanólicos e das frações de *P. affinis* e *P. dulce* e dos alcalóides, pilocarpina e epiisopilosina, extraídos de *P. microphyllus* sobre promastigotas e amastigotas de *L. chagasi*;
- Determinar a citotoxicidade dos extratos, frações e alcalóides sobre células monocíticas de murinos RAW 264.7;
- Identificar os componentes químicos dos extratos e frações testados.

CAPÍTULO I

Atividade in vitro dos alcalóides isolados a partir de *Pilocarpus microphyllus* sobre *Leishmania chagasi*

In vitro activity of alkaloids isolated from *Pilocarpus microphyllus* on *Leishmania chagasi*

Phytomedicine

Novembro, 2010

In vitro* activity of alkaloids isolated from *Pilocarpus microphyllus* on *Leishmania chagasi

Marianna C. ALBUQUERQUE^a; Claudia M.L. BEVILAQUA*^a; Selene M. MORAIS^b; Heitor ANDRADE-JUNIOR^c; Fernanda C.M. RONDON^a; L.K. A. MACHADO^b; R.P. A CARDOSO^c; M. ANDRADE-NETO^d

^a Laboratório de Doença Parasitárias/PPGCV/Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil;

^b Laboratório de Produtos Naturais/PPGCV/Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil;

^c Laboratório de Protozoologia/Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil;

^d Laboratório de Química da Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil;

Abstract

The search for alternatives for the treatment of visceral Leishmaniasis has lead researchers to study medicinal plants because their secondary metabolites have been shown to be effective against *Leishmania* spp.

Aims of the study: To evaluate the leishmanicidal effect of the alkaloids pilocarpine and epiisopilosine isolated from *Pilocarpus microphyllus* on the promastigotes and the amastigotes of *Leishmania chagasi* and to determine the alkaloids cytotoxicity on the murine monocytic cells, RAW 264.7.

Materials and methods: The alkaloids were evaluated *in vitro* to determine the level of inhibition of the promastigotes and the amastigotes, and the cytotoxicity of the alkaloids was determined using the MTT method.

Results: The alkaloids showed IC₅₀ values on the promastigotes and the amastigotes that were statistically similar to the positive controls, amphotericin B and pentamidine (p>0.05). However, the cytotoxicity test demonstrated that the less toxic alkaloid, epiisopilosine, presented 83.9% of viable cells. This was not significantly different from pilocarpine or the positive control, amphotericin B.

Conclusions: We conclude that the alkaloids showed similar efficacy when compared to the reference drugs on the promastigotes and the amastigotes of *L. chagasi* and offer reduced cytotoxicity. Thus, we have demonstrated the potential of alkaloids extracted from *P. microphyllus* as a promising source in the search for new antiparasitic agents.

Keywords: antileishmanial, *Leishmania chagasi*, amastigotes, promastigotes, cytotoxicity.

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp. that is of great importance due to its zoonotic character. VL has high morbidity and mortality rates in tropical and subtropical countries and is endemic in 88 countries, including Bangladesh, Brazil, Nepal, Sudan and India, where 90% of cases occur (Lainson and Shaw, 1987; Rath et al., 2003, Mishra et al., 2009).

Brazil has banned the treatment of canine VL caused by *Leishmania chagasi* with products intended for human use because until recently, there have been no drugs that guaranteed the parasitological cure in canine therapy (Maia-Elkhoury et al., 2008).

Several studies have demonstrated the leishmanicidal activity of compounds isolated from plant species by both *in vitro* and *in vivo* methods against *Leishmania* spp, such as alkaloids isolated from *Dysoxylum binectariferum* (Lakshmi et al., 2007) and the β - carboline alkaloid isolated from *Peganum harmala* (Mishra et al., 2009).

Pilocarpus microphyllus (Rutaceae) is a species of great economic importance because the alkaloid pilocarpine, used worldwide to control glaucoma (Andrade-Neto, 1997), is extracted from its leaves.

This study aims to evaluate the cytotoxic effectiveness of the pilocarpine and episopilosina alkaloids extracted from *P. microphyllus* against *L. chagasi*. We will also determine the cytotoxicity of these alkaloids on monocytes from murine RAW 264.7 cells.

Materials and methods

Isolation of alkaloids

The pilocarpine and episopilosine alkaloids were isolated from the leaves of *P. microphyllus*. The alkaloid bases were extracted by dissolution in ethanol and the subsequent addition of concentrated nitric acid. The mixture of nitrate salts of the alkaloids was subjected to recrystallization for final purification. The alkaloids were identified by chromatographic analysis and were compared to reference samples (Andrade-Neto, 1997).

Cultivation of *L. chagasi* and RAW cells

The promastigotes of the *L. chagasi* strain, MHOM46/LC/HZ1, in the stationary phase of growth were grown in M199 medium (Cultilab) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Inlab), HEPES (Sigma-Aldrich), bovine Hemin (Inlab), sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich), gentamicin (Inlab) and 5% sterile human male urine in an incubator at 26°C (Simões-Mattos et al., 2002).

RAW 264.7 cells were grown in Dulbelcco medium supplemented with 5% inactivated fetal calf serum (Inlab) in an incubator with 5% CO² at 36°C.

Test on the promastigotes

The promastigotes were counted in a Neubauer chamber at a concentration of 1×10^6 promastigotes/well. The action of the alkaloids was assessed in duplicate at concentrations of 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0.8 µg/ml, 0.16 µg/ml, 0.032 µg/ml and 0.0064 µg/ml (Tempone et al., 2005). After incubation of the promastigotes with the alkaloids overnight, 5 mg/ml of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) was added to assess the viability of the protozoa. After four hours, a blocking solution consisting of 4 N HCl and 10% SDS was added, and the wells were read in a microplate reader with a 570-nm filter (Seifert et al. 2007). For the positive controls, 50 µg/ml pentamidine was added, and M199 medium was added in the negative controls.

Test on the amastigotes

Microplates containing monocytic lineage cells from murine RAW 264.7 were added to the promastigotes at a concentration of 1×10^5 promastigotes/well and incubated overnight. The alkaloids pilocarpine and epiisopilosine were added at concentrations of 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0.8 µg/ml, 0.16 µg/ml, 0.032 µg/ml and 0.0064 µg/ml and the plates were kept overnight in an incubator with 5% CO² at 36°C. After the overnight incubation, 5 mg/ml MTT was added and the cells were incubated for four hours. The blocking solution containing 4 N HCl, 10% SDS and isopropanol was added to the cells, and the cells were conditioned for one hour at 36°C. The plates were read on a microplate reader using a 570-nm filter. All tests were performed in duplicate. For the positive controls, 5 µg/ml amphotericin B was added to the cells, and in the negative controls, Dulbelcco medium was added.

Evaluation of Cytotoxicity

RAW 264.7 cells at a concentration of 1×10^5 cells/ml were plated in Dulbecco medium supplemented with 5% fetal calf serum and were placed in an incubator with 5% CO₂ at 36°C for 24 hours. The alkaloids were used at a concentration of 100 µg/ml. The plates were stored in an incubator with 5% CO₂ at 36°C overnight. MTT (5 mg/ml) was added for four hours, and then the blocking solution consisting of 4 N HCl, 10% SDS and isopropanol was added. After one hour of blocking, the results were obtained by using a microplate reader with a 570-nm filter. The tests were performed in triplicate with 5 µg/ml amphotericin B serving as the positive control and Dulbecco medium as the negative control.

Statistical analysis

The inhibitory concentration (IC₅₀) in the range of 95% was calculated using a nonlinear regression curve. The analysis of variance was tested using the One-Way ANOVA test and the comparative analysis between treatments was performed with Tukey's parametric test using the statistical software GraphPad Prism 5.0.

Results and discussion

The IC₅₀ values determined from the *in vitro* tests on the promastigotes of *L. chagasi* were 1.26 µg/ml to alkaloid pilocarpine and 1.30 µg/ml to alkaloid epiisopilosine. Pentamidine, used as a positive control, had an IC₅₀ value of 9 µg/ml. The efficacies of pilocarpine and epiisopilosine on the promastigotes were 51.43% and 51.50% respectively. These values were statistically similar ($p > 0.05$) to the positive control, which was determined to be 67%.

For the intracellular amastigotes, the IC₅₀ values were 0.23 µg/ml for pilocarpine and 0.08 µg/ml for epiisopilosine. The IC₅₀ of amphotericin B, used as reference drug, was 53.75 µg/ml. The efficacies of pilocarpine and epiisopilosine on the intracellular amastigotes were 58.99% and 63% respectively. These results were shown to be statistically similar to amphotericin B, which was 70% ($p > 0.05$).

The cytotoxicity tests on the murine RAW 264.7 cells demonstrated that epiisopilosine was the least toxic, presenting 83.9% of viable cells, compared with 66.29% when using pilocarpine. The positive control, amphotericin B, had 100% viability ($p > 0.05$).

There are no reports of the application of the alkaloids extracted from *P. microphyllus* on *Leishmania* spp., although the antileishmanial effect was reported in other species from the family Rutaceae. *Galipea longiflora* was tested against the promastigotes of *L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. donovani*. In this study, the quinoline alkaloids from these extracts were more potent than Glucantime® but 25-100 times less active than pentamidine (Fournet et al. 1994). In another study, the alkaloids gravacridonediol and rhodesiacridone isolated from the root of *Thamnosma rhodesia* had a high leishmanicidal activity against the intracellular amastigotes of *L. major*; but the alkaloids were not cytotoxic towards the macrophages (Ahua et al. 2004).

The search for new antiparasitic molecules is of great interest, and our results show the potential of the alkaloids extracted from *P. microphyllus* as a promising source in the search for new antiparasitic agents.

Acknowledgments

This work received financial support from CNPq (grant 464390/0). Dr. Claudia M. L. Bevilaqua and Selene Maia de Moraes have a grant from CNPq.

References

- Ahua, K.M.; Ioset, J.R.; Ransijn, A.; Mauël, J.; Mavi, S.; Hostettmann, K., 2004. Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. *Phytochemistry*. 65, 963-968.
- Andrade-Neto, M., 1997. Contribuição ao Conhecimento Químico de *Pilocarpus* spp. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará- UFC, Brasil.
- Fournet A., Barrios A. A., Muñoz V., Richomme P., Bruneton J., 1994. Antiprotozoal Activity of Quinoline Alkaloids Isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. *Phytotherapy Research*. 8, 174-178.
- Lakshmi, V.; Pandey, K.; Kapil, A.; Samant, M.; Dube, A., 2007. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of *Dysoxylum binetariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. *Phytomedicine*. 14, 36-42.
- Lainson, R; Shaw, JJ., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: Peters, W; Killick-Kendrick, R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London:Academic Press, 1-120.

- Maia-Elkhoury A. N. S., Alves W. A., Sousa-Gomes M. L., Sena J. M., Luna E. A., 2008. Leishmaníase visceral no Brasil: evolução e desafios. *Cadernos de Saúde Pública*. 24.
- Mishra B.B., Kale R.R., Singh R.K., Tiwari V.K., 2009. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*. 80, 81-90.
- Rath, S.; Trivelin, L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D. M.; Jesús, M. N.; Marzal, P. C.; Andrade-JR, H.F.; Tempone, A. G., 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaníase: estado da arte. *Química Nova*. 26, 550-555.
- Seifert, K., Lemke, A., Croft, S. L., Kayser, O., 2007. Antileishmanial structure-activity relationships of synthetic phospholipids: *in vitro* and *in vivo* activities of selected derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51, 4525-4528.
- Simões-Mattos L., Teixeira M.J., Costa D.C., Prata JR. J.R.C., Bevilacqua C.M.L., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G., 2002. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Veterinary Parasitology*. 103, 207-216.
- Tempone, A.G; Borborema, S.E.T; Andrade-JR, H.F.; Gualda, N.C.A; Yogi, A; Carvalho, C.S; Bachiega, D; Lupo, F.N; Bonotto, S.V; Fischer, D.C.H., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. *Phytomedicine*. 12, 382-390.

CAPÍTULO II

Atividade in vitro de *Peschiera affinis* e *Pithecellobium dulce* sobre *Leishmania chagasi*

In vitro activity of *Peschiera affinis* and *Pithecellobium dulce* on *Leishmania chagasi*

Phytotherapy Research

Dezembro, 2010

In vitro activity of *Peschiera affinis* and *Pithecellobium dulce* on *Leishmania chagasi*

M. C. ALBUQUERQUE¹; C. M.L. BEVILAQUA¹; S. M. MORAIS²; H. F. ANDRADE-JUNIOR³; F. C.M. RONDON¹; L. K. A. MACHADO²

¹Laboratório de Doença Parasitárias/PPGCV/Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil;

²Laboratório de Produtos Naturais/PPGCV/Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil;

³Laboratório de Protozoologia/Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Abstract

The visceral Leishmaniasis (VL) is a public health problem in tropical and subtropical regions due to its zoonotic character and lack of proven efficacy of the drugs used in dog therapy. In search of effective treatment for VL, the use of plants has shown a promising activity. Thus, this study aimed to screen the fractions of *Peschiera affinis* and *Pithecellobium dulce* on *Leishmania chagasi*. Ethanol extracts were obtained from leaves and stems of these plants which were subjected to acid-base fractionation and chromatography. These fractions were tested on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi* to evaluate the leishmanicidal effect and cytotoxicity on murine monocytic cells RAW 264.7. *In vitro* tests of inhibition of promastigotes and amastigotes, the EC₅₀ of extracts and fractions were statistically similar to the positive control, pentamidine and amphotericin B (p >0.05). The cytotoxicity test showed that the fraction Pd2 of *P. dulce* was less toxic, obtaining 89,96% of viable cells not different from other fractions and amphotericin B, positive control. We conclude that the drug-tested showed similar efficacy as drug reference on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi* and reduced cytotoxicity.

Keywords: antileishmanial, *Leishmania chagasi*, amastigotes, promastigotes, cytotoxicity.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is considered one of the six more important tropical illnesses and 88 countries are affected by this zoonosis, encompassing 12 million people infected and an increasing incidence of one to two million new cases per year, mostly in India, Sudan, Brazil and Bangladesh (Mishra et al., 2009). The disease causative agent is a heteroxenic protozoan belonging to the genus *Leishmania*. In the urban cycle, the dog acts as the principal reservoir and the human represents an accidental host. Leishmaniasis is transmitted through the bite of female sand flies of the family Psychodidae (Gontijo and Melo, 2004).

In Brazil, the commonly therapeutic used in humans, is antimonial drugs. However, these medications have limitations such as high toxicity, causing numerous side effects (Brasil, 2006; Mishra et al., 2009). In Brazil, the treatment of canine visceral Leishmaniasis with products of human use is prohibited. It is reported that the treatment did not decreased the importance of dogs as reservoirs of the parasite, as it was evidenced a low efficiency in terms of parasitological cure, besides the possibility of the occurrence of parasite resistance to drugs (Brasil, 2006).

A new strand of research has used secondary metabolites of plants as the focus of -leishmanicidal activity, . Among these, alkaloids of *Dysoxylum binectariferum* (Lakshmi et al., 2007), β -carboline alkaloids isolated from *Peganum harmala* (Mishra et al., 2009), polyphenolics of *Cocos nucifera* (Mendonça-Filho et al., 2004), tannins (Kolodziej and Kiderlen, 2005), flavonoids of *Centrolobium sclerophyllum* (Araújo et al., 1998).

Considering chemosystematic analysis and the access, the plants *Peschiera affinis* belonging to family Apocynaceae and *Pithecellobium dulce* to family Fabaceae were selected as representatives of the Brazilian northeast. Research has shown that the bark of *P. dulce* contains 37% tannin catechol-type, and can be used in cases of dysentery, dermatitis and eye inflammation in addition to presenting antipyretic (Sugumaran et al., 2008; Siri et al., 2008). While the leaves are astringent, emollient, abortion, anticonvulsants, anti-ulcer, anti-diabetics, to treat intestinal disorders (Sugumaran et al., 2008; Siri et al., 2008; Sugumaran et al., 2009). The genus *Peschiera* is also called *Ervatamia* and *Tabernaemontana*. Ethnobotanical studies indicate the use of this genus as an antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor (Delorenzi et al., 2001). The species *Tabernaemontana*

catharinensis and *Peschiera australis* showed activity against *Leishmania amazonensis* (Rodríguez et al., 2008).

Thus, this study aimed to do a screening of fractions of *P. affinis* and *P. dulce* against promastigotes and amastigotes of *L. chagasi* and cytotoxicity on murine monocytic cells RAW 264.7.

MATERIALS AND METHODS

Extracts and fractions from *P. affinis* and *P. dulce*

Samples of the plants *P. affinis* (Pa) and *P. dulce* (Pd) were collected, on august until november 2009, in Fortaleza, Ceara State, Brazil. The plants were identified by botanists of the Herbarium Prisco Bezerra of the Universidade Federal do Ceará. A voucher was deposited under the numbers 47233 and 47026, respectively.

Leaves and stems were dried in shade at room temperature. They were then ground, weighed (1.5 kg) and immersed in ethanol 96% for seven days. The material was filtered and rotoevaporated—obtaining the ethanol extract, which was subjected to two processes: acid-base fractionation and column chromatography on silica gel.

Acid-base fractionation consisted of washes with 10% phosphoric acid and n-hexane 99% by forming a biphasic solution, which was filtered and buffered with ammonium hydroxide 24% to reach pH 9, and it washed with dichloromethane. The extract was then filtered, dried with anhydrous sodium sulfate and rotoevaporated, obtaining the fractions Pa5 and Pd5.

The ethanol extract of the plant was subjected to column chromatography on silica gel using the solvent hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol mixtures of increasing polarity, diluted in 100% hexane, hexane: chloroform (1:1), chloroform 100% , chloroform: ethyl acetate (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), ethyl acetate 100% ethyl acetate: methanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) and 100% methanol.

Based on chromatography analysis we selected for in vitro testing six fractions of *P. dulce*: ethanol extract, Pd1 (chloroform: ethyl acetate 8:2), Pd2 (chloroform: ethyl acetate 7:3), Pd3 (ethyl acetate: methanol 6:4), Pd4 (ethyl acetate: methanol 4: 6) and Pd5 (product of the acid-base fractionation). And six fractions of *P. affinis*: ethanol extract, Pa1 (chloroform: ethyl acetate 6:4), Pa2 (ethyl acetate: methanol 7:3), Pa3

(ethyl acetate: methanol 6:4), Pa4 (ethyl acetate: methanol 5: 5) and Pa5 (product of the acid-base fractionation).

Cultivation of *L. chagasi* and RAW cells

The promastigotes of *L. chagasi* strain, MHOM46/LC/HZ1, in the stationary phase of growth were grown in M199 medium (Cultilab) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Inlab), HEPES (Sigma-Aldrich), bovine Hemin (Inlab), sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich), gentamicin (Inlab) and 5% sterile human male urine in an incubator at 26°C (Simões-Mattos et al., 2002).

RAW 264.7 cells were grown in Dulbecco medium supplemented with 5% inactivated fetal calf serum (Inlab) in an incubator with 5% CO² at 36°C.

Test on promastigotes

The promastigotes were counted in a Neubauer chamber at a concentration of 1x10⁶ promastigotes/well. The action of the ethanol extracts and fractions of each plant were accessed in duplicate at concentrations of 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0.8 µg/ml, 0.16 µg/ml, 0.032 µg/ml and 0.0064 µg/ml (Tempone et al., 2005). After incubation of the promastigotes with the ethanol extracts and fractions of each plant overnight, 5 mg/ml of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) was added to assess the viability of the protozoa. After four hours, a blocking solution consisting of 4 N HCl and 10% SDS was added, and the wells were read in a microplate reader with a 570-nm filter (Seifert et al. 2007). For the positive controls, 50 µg/ml pentamidine was added, and M199 medium was added in the negative controls.

Test on amastigotes

Microplates containing monocytic lineage cells from murine RAW 264.7 were added to the promastigotes at a concentration of 1x10⁵ promastigotes/well and incubated overnight. The ethanol extract and fractions of the plants were added at concentrations of 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4 µg/ml, 0.8 µg/ml, 0.16 µg/ml, 0.032 µg/ml and 0.0064 µg/ml and the plates were kept overnight in an incubator with 5% CO² at 36°C. After the overnight incubation, 5 mg/ml MTT was added and the cells were incubated for four hours. The blocking solution containing 4 N HCl, 10% SDS and isopropanol was added to the cells. The cells were conditioned for one hour at 36°C. The plates were read on a microplate reader using a 570-nm filter. All tests were performed in duplicate. For the

positive controls, 5 µg/ml amphotericin B was added to the cells, and in the negative controls, Dulbelcco medium was added.

Evaluation of Cytotoxicity

RAW 264.7 cells at a concentration of 1×10^5 cells/ml were plated in Dulbelcco medium supplemented with 5% fetal calf serum and were placed in an incubator with 5% CO² at 36°C for 24 hours. The fractions and ethanol extracts of plants were used at a concentration of 100 µg/ml. The plates were stored in an incubator with 5% CO² at 36°C overnight. MTT (5 mg/ml) was added for four hours, and then the blocking solution consisting of 4 N HCl, 10% SDS and isopropanol was added. After one hour of blocking, the results were obtained by using a microplate reader with a 570-nm filter. The tests were performed in triplicate with 5 µg/ml amphotericin B serving as the positive control and Dulbelcco medium as the negative control.

Chemical analysis

All fractions and extracts were subjected to vibrational spectroscopy in the infrared (IR) spectroscopy and scanning ultraviolet (UV) visible and qualitative phytochemical tests of phenols, tannins, catechins, leucoanthocyanidins, flavonoids, steroids, terpenes, quinones, saponins and alkaloids to determine the chemical components.

Statistical analysis

The inhibitory concentration (IC₅₀) in the range of 95% was calculated using a nonlinear regression curve. The analysis of variance was tested using the One-Way ANOVA test and the comparative analysis between treatments was performed with Tukey's parametric test using the statistical software GraphPad Prism 5.0.

Results

The phytochemical analysis of *P. dulce* in ethanol Pd showed the presence of the steroid glycoside, steroid free, flavonoids, flavonones, catechins and xanthonones; in Pd1 was found steroid-ketone; in Pd2 steroid free; in Pd3 and Pd4 steroid glycosides; and flavonoids, flavonones, xanthonones and catechins in Pd5. While in samples of *P. affinis*, in ethanol Pa observed steroid free and steroid alkaloid glycoside; in Pa1, steroid ester function; in Pa2, flavonoid glucoside, in Pa3 and Pa4, steroid glycoside, and alkaloids in

Pa5 that characterize the structure of ibogamine compound. The phytochemicals found in tests results are complemented by the spectral data arranged in tables 1 and 2.

Table 1. Spectral data of the fractions and ethanol extract of *P. dulce* and *P. affinis*.

Fractions	UV data (λ max nm)	IR data (cm^{-1})
<i>P. dulce</i> ethanol extract	205,265, 296, 316, 319, 329, 335, 338, 343	3300, 2850, 1630, 1380,1050
Pd1	193, 205, 212, 214, 221, 224, 241, 352, 355, 363, 408	3400, 2900 2830 1714, 1430, 1350 1125
Pd2	191, 201, 204, 213, 218, 228, 231, 235, 241, 271, 328, 412	2900, 2850, 1750, 1720, 1490, 1350, 680
Pd3	205, 269, 323, 340, 347, 350, 358, 361, 369, 384, 391, 407	3450, 2900, 2890, 1640, 1350, 1020
Pd4	205, 269, 338, 340, 356, 390, 396, 400	3375, 2813, 1580, 1500, 1020
Pd5	206, 279, 349, 360, 368, 374, 380, 383, 406	3350, 2850, 2795, 1650, 1600, 1100, 1470, 1050
<i>P. affinis</i> ethanol extract	207, 267, 316, 403, 406	3400, 2875, 1750, 1700, 1670, 1485, 1010
Pa1	201, 210, 220, 227, 232, 242, 368, 379, 388, 405	3490, 2850, 1700, 1480, 1050
Pa2	207, 272, 279, 321, 330, 372, 394	3400, 2875, 2785, 1690, 1600, 1490, 1010
Pa3	206, 268, 280, 288, 330, 395	3275, 2930, 2830, 1690, 1600, 1490, 1465, 1010, 690
Pa4	268,312, 316, 322, 372	3375, 2885, 1665, 1370, 1040
Pa5	205, 284, 291,317, 320, 369	3380, 2920, 1650,1625, 1485, 1120

Table 2. Infrared absorption frequencies.

Fractions	O-H	N-H	C-N	C-H	C=C	C-O	C=O	C=C aromático	C-H alifático	C-H deformação
<i>P. dulce</i> ethanol extract	3300	-	-	2850	1630	1050	-	-	1380	-
Pd1	3400	-	-	2900 ; 2830	-	1125	1714	-	1430; 1350	-
Pd2	3400	-	-	2900 ; 2850	-	-	1750; 1720	-	1490; 1350	680
Pd3	3450	-	-	2900 ; 2890	1640	1020	-	-	-	1350
Pd4	3375	-	-	2813 ; 1500	1580 ; 1500	1020	-	-	-	-
Pd5	3350	-	-	2850 ; 2795	-	1100 ; 1050	1650	1600	1450	-
<i>P. affinis</i> ethanol extract	3400	-	-	2875	1670	1010	1750; 1700	-	-	1485
Pa1	3490	-	-	2850	-	1050	1700	-	-	1480
Pa2	3400	-	-	2875 ; 2785	-	1010	1690	1600; 1490	-	-
Pa3	3275	-	-	2930 ; 2830	-	-	1690	1600; 1490; 1465	-	1000; 690
Pa4	3375	-	-	2885	1665	1040	-	-	-	1370
Pa5	-	3380	1120	2920	1650 ; 1625					1485

The action of ethanol extracts and fractions of each plant on promastigotes and amastigotes, as well as cytotoxicity on murine RAW 264.7 cells are shown in Table 3.

Table 3. Concentration of extracts and fractions of *P. dulce* and *P. affinis*, and alkaloids of *P. microphyllus* able to inhibit 50% of promastigotes and amastigotes and percent of viability on RAW 264.7.

Fractions	IC ₅₀ promastigotes (µg/mL)	IC ₅₀ amastigotes (µg/mL)	% Viability
<i>P. dulce</i> ethanol extract	0,52	1,02	70,73
Pd1	5,07	1,38	72,91
Pd2	3,05	0,41	89,96
Pd3	2,52	0,24	68,52
Pd4	2,61	0,49	75,64
Pd5	2,05	2,76	74,1
<i>P. affinis</i> ethanol extract	11,3	0,42	84,43
Pa1	1,58	0,56	60,52
Pa2	4,09	14,6	80,7
Pa3	18,7	0,68	88,17
Pa4	3,15	0,22	87,46
Pa5	1,73	1,82	73,54
Amphotericin B	0,1	53,75	100
Pentamidine	9	4,08	-

The effect of extracts and fractions were tested on the survival of promastigotes and amastigotes showed that the fractions were statistically similar to positive controls ($p > 0.05$).

Discussion

The results obtained by phytochemical analysis of *P. dulce* were similar to those found in the literature regarding the species of the family Fabaceae (Siri et al. 2008; Sugumaran et al. 2009; Lombarto et al., 2009).

It is believed that the efficacy of *P. dulce*, probably due to the presence of flavonoids, because the groups of sterols are common compounds in plants. It is also considered previous research that demonstrated the effect of these compounds on *Leishmania* spp. as evidenced by the flavonoids apigenin and luteolin are active against

L. amazonensis (Schinor et al., 2007). Besides the inhibitory effect *in vitro* of luteolin and quercetin on the growth of promastigotes and amastigotes of *L. donovani*, the test on hamsters infected with *L. donovani* caused a significant reduction in parasite load of spleens (Mitra et al., 2000). The mechanism of action of these metabolites on the parasite is not yet known, but function as an antioxidant may be involved, as determined by the chemical structure of the compound, which has a basic structure of C6-C3-C6 (two phenyl rings A and B- linked through a pyran ring-C) and flavonoids may vary depending on the substitution and the level of oxidation in ring C. Moreover, these components enable the inhibition of oxidation of low density lipoproteins (LDL) by macrophages, and some of them can inhibit the expression of nitric oxide synthase and nitric oxide formation in macrophages (Piette, 2000; Flórez-Martínez et al. , 2002).

Based on the phytochemical analysis performed on *P. affinis*, as well as flavonoids, alkaloids can justify the action of extracts and fractions on *L. chagasi*. Considering the presence of the alkaloid ibogaine structures confirming the prevalence of type iboga alkaloids, belonging to the indole group in the northeastern Brazilian samples (Wolter-Filho et al., 1985).

The ethanol extract of stem of *Peschiera australis* obtained by chemical fractionation identified the iboga-type indole alkaloid coronaridine (12.5µg/ml) that inhibited the growth of promastigotes of *L. amazonensis* in 97% and 79% of amastigotes. Depending mainly on factors such as season and soil type, different concentrations of coronaridine can be naturally found in *P. affinis* (Delorenzi et al., 2001).

It is suggested that although the mechanism of alkaloid on *Leishmania* spp. is not yet understood, it is believed that there is a correlation between chemical structure and length of the substitution group, it is likely that the structure of these components can significantly influence the activity on the parasites (Staerk et al. 2000; Rodríguez et al., 2008). The alkaloids may affect the mitochondria of macrophages, increasing its size by amorphous material (Delorenzi et al., 2001). Additionally, it was reported that ibogaine, 18-Methoxycorinaridine and coronaridine decreased the activity of nitric oxide synthase in the brains of mice treated intravenously, suggesting that the death of *L. amazonensis* can not be mediated increased activity of NO synthase. This factor is considered because the leishmania parasites are obligate intracellular that develop into macrophages, where production of nitric oxide

by these cells represents the most important mechanism immunologically mediated amastigote killing (Mauel and Ransijn, 1997; Popik and Skolnick, 1999).

Plant extracts have been shown to be a useful source of new compounds to be administered alone or as adjuvant to improve the leishmanicidal action. However, purified fractions of these extracts should be evaluated in order to verify the potential of these species.

Acknowledgments

This work received financial support from CNPq (grant 464390/0). Dr. Claudia M. L. Bevilaqua and Selene Maia de Moraes have a grant from CNPq.

References

- ARAÚJO CAC, ALEGRIO LV, LEON LL. 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* **49**: 751-754.
- BRASIL MS. 2006. Manual de Vigilância e Controle da leishmaníase Visceral. Série A normas e manuais. Brasília – DF: Editora MS, 122.
- CASTRO CMS. 2006. Estudo químico de *Peschiera affinis* (Muell. Arg.) Miers, planta utilizada pelos tapebas em problemas dermatológicos. Monografia da Universidade Estadual do Ceará.
- CHAGAS AP, MÜLLER AH, SOARES MBP, GARCEZ LM. 2010. Potencial anti-Leishmania e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). *Revista Pan-Amazônica de Saúde* **1**:117-124.
- DELORENZI JC, ATTIAS M, GATTASS C, ANDRADE M, REZENDE C, DA CUNHA A, HENRIQUES A, BOU-HABIB D, SARAIVA E. 2001. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1349-1354.
- GONTIJO CMF, MELO MN. 2004. Leishmaníase Visceral no Brasil:quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **7**:338-347.
- KOŁODZIEJ H, KIDERLEN AF. 2005. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasited RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* **66**:2056-2071.

- LAKSHMI V, PANDEY K, KAPIL A, SAMANT M, DUBE A. 2007. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of *Dysoxylum binetariaferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. *Phytomedicine* **14**: 36-42.
- LOMBARDO M, KIYOTA S, KANEKO TM. 2009. Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **30**:9-17.
- MARCHÁN E, ARRIECHE D, HENRIQUEZ W, CRESCENTE O. 2000. Efecto *in vitro* de una sustancia alcaloidea aislada de *Amphimedon virides* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. *Revista de Biología Tropical* **48**: 31-38.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ S, GONÁLEZ-GALEGO J, CULEBRAS JM, TUÑÓN MJ. 2002. Os flavonoides: propriedades e ações antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* **17**: 271-278.
- MAUEL J, RANSIJN A. 1997. *Leishmania* spp. Mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. *Experimental Parasitology* **87**: 98–111
- MENDONÇA-FILHO RR, RODRIGUES IA, ALVIANO DS, SANTOS ALS, SOARES RM, ALVIANO CS, LOPES AHCS, ROSA MSS. 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolic rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology* **155**:136–143.
- MISHRA BB, KALE RR, SINGH RK, TIWARI VK. 2009. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* **80**: 81–90.
- PIETTA PG 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**:1035-42.
- POPIK P, SKOLNICK P. 1999. Pharmacology of ibogaine and ibogaine-related alkaloids. *Alkaloids* **52**: 197–231.
- RODRÍGUEZ AM, CAMARGO JR, GARCÍA FJB. 2008. Actividad *in vitro* de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. Apocynaceae sobre amastigotes de *Leishmania braziliensis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **18**:350-355.
- ROYO VA, SANTOS FF, SOUZA VA, PEREIRA AC, DA SILVA R, VINHÓLIS AHC, DONATE P M, SILVA MLA, ALBUQUERQUE S, BASTOS JK. 2003. Biological activity evaluation of dibenzilbutirolactones lignans derivatives against *Leishmania braziliensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **13**:18-21.
- SEIFERT K, LEMKE A, CROFT SL, KAYSER O. 2007. Antileishmanial structure-activity relationships of synthetic phospholipids: *in vitro* and *in vivo* activities of selected derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 4525-4528.

- SIMÕES-MATTOS L, TEIXEIRA MJ, COSTA DC, PRATA JRJRC, BEVILAQUA CML, SIDRIM JJC, ROCHA MFG. 2002. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Veterinary Parasitology* **103**:207–216.
- SIRI S, WADBUA P, WONGPHATHANAKUL W, KITANCHAROEN N, CHANTARANOTHAI P. 2008. Antibacterial and Phytochemical Studies of 20 Thai Medicinal Plants against Catfish-Infectious Bacteria, *Aeromonas caviae*. *KKU Science Journal* **36**:1-10.
- SOARES DC, PEREIRA CG, MEIRELES MA, SARAIVA EMB. 2003. Anti-*Leishmania (L.) amazonensis* activity of supercritical CO₂ + ethanol extracts from *Tabernaemontana catharinensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **45**:110.
- STAERK D, LEMMICH E, CHRISTENSEN J, KHARAZMI A, OLSEN CE, JEROSZEWSKI J. 2000. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. *Planta Medica* **66**: 531-536.
- SUGUMARAN M, VETRICHELVAN T, DARLIN QUINE S. 2008. Free Radical Scavenging Activity of Folklore: *Pithecellobium dulce* Benth. Leaves. *Ethnobotanical Leaflets* **12**:446-451.
- SUGUMARAN M, VETRICHELVAN T, QUINE SD. 2009. Antidiabetic potential of aqueous and alcoholic leaf extracts of *Pithecellobium dulce*. *Asian Journal of Research in Chemistry* **2**:1-3.
- TEMPONE AG, BORBOREMA SET, ANDRADE JRHF, GUALDA NCA, YOGI A, CARVALHO CS, BACHIEGA D, LUPO FN, BONOTTO SV, FISCHER DCH. 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. *Phytomedicine* **12**: 382-390.
- WOLTER-FILHO W, ANDRADE CHS, BRAZ-FILHO R, MATOS F JA. 1985. Alcalóides de *Peschiera affinis* (Muell. Arg) Miers (Apocynaceae). *Acta Amazônica* **15**:193-197.

CONCLUSÕES

Dessa forma, conclui-se que os extratos etanólicos e as frações testadas de *Peschiera affinis* e *Pithecellobium dulce*, e os alcalóides pilocarpina e epiisopilosina de *Pilocarpus microphyllus* apresentaram sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi* eficácia semelhante às drogas de referência (anfotericina B e pentamidina), além de apresentarem citotoxicidade reduzida sobre as células monocíticas de murinos RAW 264.7.

PERSPECTIVAS

Para futura aplicação desse material como fitoterápico faz-se necessário um estudo mais detalhado do potencial leishmanicida de *Peschiera affinis* e *Pithecellobium dulce* através da purificação e isolamento dos constituintes químicos dos extratos e frações testados *in vitro*, com a posterior definição da estrutura dos metabólitos em questão. Além de requerer o estudo pré-clínico com animais de laboratório dos constituintes isolados e dos alcalóides pilocarpina e epiisopilosina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; FORMIGA, S. C., LOCATELLI, E. Plantas Medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba. Parte I Subclasse Asteridea. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 75, p. 61 – 64, 1994.

AHUA, K.M.; IOSET, J.R.; RANSIJN, A.; MAUËL, J.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. **Phytochemistry**, n. 65, p. 963-968, 2004.

ALBUQUERQUE U.P., MEDEIROS P.M., ALMEIDA A.L.S. , MONTEIRO J.M., NETO E.M.F.L., MELO J.G., SANTOS J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil:A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology** v.114, p.325–354, 2007.

ALMEIDA J.R.G.S., DA-CUNHA E.V.L., SILVA M.S., ATHAYDE-FILHO P.F., BRAZ-FILHO R., BARBOSA-FILHO J.M. Outros constituintes químicos de *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 44-46, 2003.

ALVAR, J., CAÑAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES W. A.; BEVILACQUA P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaníase visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, p.259-265, 2004.

ANDRADE-NETO, M. Contribuição ao Conhecimento Químico de *Pilocarpus* spp. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Ceará, 1997.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 751-754, 1998.

ARAÚJO, M.S.S. Alterações imunológicas no sangue periférico de cães submetidos à imunoprofilaxia para leishmaníase visceral canina. Belo Horizonte. **Tese (Doutorado em Imunoparasitologia)**. UFMG, p.180, 2006.

BALANHA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435-443, 1998.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000.

BARBOSA P. B. B. M.; QUEIROZ P. V. S.; JERÔNIMO S. M. B.; XIMENES M. F. F. M. Experimental infection parameters in *Galea spixii* (Rodentia: Caviidae) with *Leishmania infantum chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, p. 545-548, 2008.

BARREIROS A. L. B. S., DAVID J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BERGMANN, B.R., COSTA, S.S., MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal Association for the Advancement of Science** v. 49, p 395-402, 1997.

BEZERRA R. J. S.; LEON L.; GENESTRA M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, 2004.

BOECK P., FALCÃO C. A. B, LEAL P.C, YUNES R.A, CECHINEL FILHO V.,TORRES-SANTOS E. C., ROSSI-BERGMANN B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 1538-1545, 2006.

BOSCOLO O.H., VALLE L.S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 63, p. 263-277, 2008.

BOTSARIS A.S. **Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras**. 2ed., p.37-41, 2002.

BRASIL, M. S. **Manual de Vigilância e Controle da leishmaníase Visceral**. Série A normas e manuais. Brasília – DF: Editora MS, p.122, 2006.

BRAVO, C. Doença silvestre chaga aos grandes centros urbanos. **Revista Pesquisa Médica: do laboratório à prática clínica**. n.2, p. 47-51, 2007

CABRERA, MAA; PAULA, AA; CAMACHO, LAB; MARZOCHI, MCA; XAVIER, SC; SILVA, AV. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**,v.45,p.79-83,2003.

CAMACHO M. R., PHILLIPSON S. L, CROFT P. N, MARSHALL S. J., GHAZANFAR S. A. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, 185-191, 2003.

CARVALHO P.B.; FERREIRA E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v.72, p. 599 -618, 2001.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J. L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIM, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 410-414, 2007.

CASTRO C. M. S. Estudo químico de *Peschiera affinis* (Muell. Arg.) Miers, planta utilizada pelos tapebas em problemas dermatológicos. **Monografia da Universidade Estadual do Ceará**, 2006.

CHAGAS A. P., MÜLLER 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**, v. 1, p.117-124, 2010.

CHANG, K.P.; MCGWIRE, B.S.; Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2002.

CHATTERJEE M.; BANETH G.; MANDAL C. Diagnostic and prognostic potential of antibodies against oacetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.70, p.55-56, 1999.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Lipo-chalcone a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2550-2556, 1993.

CORTEZ L. E. R., FERREIRA A. G., VIEIRA P. C., SILVA M. F. G., FERNANDES J. B., NAKAMURA C. V., FILHO B. P. D., CORTEZ D. A. G. Atividades biológicas de extratos obtidos das partes aéreas de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A.St.-Hil. e *Conchocarpus gaudichaudianus subsp. bahiensis Kallunki (Rutaceae)*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, p.50 -54, 2006.

DEANE L. M.; DEANE M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará, **Hospital**, v.48, p.61-70,1955.

DEANE L. M. leishmaníase visceral no Brasil. **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. Rio de Janeiro,1956.

DELORENZI J. C, ATTIAS M., GATTASS C., ANDRADE M., REZENDE C., DA CUNHA A., HENRIQUES A., BOU-HABIB D., SARAIVA E. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1349-1354, 2001.

DEL RAYO M., PHILLIPSON J. D., CROFT S., ROCK P., MARSHALL S., SCHIFF P. L. In vitro activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. **Phytotherapy Research** v.16, p. 432-436, 2002.

DENEROLLE, P.; BOURDEISEAU, G. Combination allopurinol and antimony treatments versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 413-415, 1999.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; AKHMEDJANOVA, V.; OLLIVIER, E.; BESSONOVA, I.; RIAD, E.; TIMON-DAVID, P. *In vitro* antileishmanial activity of diphyllin isolated from *Haplophyllum bucharicum*. **Planta Medica**, n. 71, p. 366-369, 2005.

EIRA M.T.S., VIEIRA R. F., MELLO C. M.C., FREITAS R.W.A. CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus* STAPF). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, p. 37-39, 1992.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Medicina Interna Veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole, p. 565 – 567, 1997.

FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. Medical Microbiology and Immunology, v. 190, p. 85-87, 2001.

FOURNET A., BARRIOS A. A., MUNÓZ V., HOCQUEMILLER C. A. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L.venezuelensis*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 43, p. 219-222, 1992.

FOURNET A., BARRIOS A. A., MUÑOZ V., RICHOMME P., BRUNETON J. Antiprotozoal Activity of Quinoline Alkaloids Isolated from *Galipea longijlora*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. **Phytotherapy Research**, v. 8, p.174-178, 1994.

FOURNET A., FERREIRA M.E., ROJAS A.A., TORRES O.S., FUENTES S., NAKAYAMA H., SCHININI A. *In vitro* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous

leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 2447-2451, 1996.

FREIRE-DE-LIMA L., DELORENZI J., OKADA L. H., SARAIVA E. M. B. Potential leishmanicide activity of *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 312, 2000.

GENARO, O.; MICHALICK, M.S.M. leishmaníase Visceral Americana. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 67-83.

GENARO, O.; REIS, A.B. leishmaníase Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005a. p. 47-66.

GONTIJO C.M.F., MELO M.N. leishmaníase Visceral no Brasil:quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p.338-347, 2004.

GRIMALDI G. JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

HARBONE J. B. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**, 1971.

HARITH A. E.; KOLK A. H. J.; LAARMAN J. J. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis comparison with IFAT and Elisa. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, p.603-606, 1987.

HENRIQUES A.T.,*et al.*. Alcalóides,generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.*. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed, p. 641-655, 1999.

HEYWOOD V. H. **Flowering plants of the world**,1996.

JULLIAN, V.; BONDUELLE, C.; VALENTIN, A.; ACEBEY, L.; DUIGOU, A. G.; PRÉSVOT, M. F.; SAUVAIN, M. New clerodane diterpenoids from *Laetia procera*

(Poepp.) Eichler (Falcourtiaceae) with antiplasmodial and antileishmanial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5065-5070, 2005.

KAM, T. S.; SIM, K. M.; KOYANA, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASH, M.; KOMIYAMA, K. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglyco steroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal Natural Products**, v. 61, p 1332-1336, 1997.

KAM T. S., SIM K. M., KOYANO T., TOYOSHIMA M., KOMIYAMA K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffi thii*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 75-79, 1999.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H.; CROFT, S. L. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 77, p. 307-314, 2000.

KEAWPRADUB N., KIRBY G. C., STEELE J. C. P., HOUGHTON P. J. Antiplasmodial activity of extracts and alkaloids of three *Alstonia* species from Thailand. **Planta Medica**, v. 65, p. 690-694, 1999.

KILLICK-KENDRICK R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. **Bulletin of the Exotic Pathology Society**, v. 78, p.747-755, 1985.

KOŁODZIEJ, H., KIDERLEN, A.F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasited RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**. v.66. p.2056-2071, 2005.

LAINSON, R; SHAW, JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press; p. 1-120, 1987.

LAINSON R., SHAW J. J., SILVEIRA F. T., BRAGA R. R., ISHIKAWA E. A. Y. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Vian-nia) naïffi* Lainson and Shaw, 1989. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, v. 65, p. 282-284, 1990.

LAINSON R, RANGEL E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** ,v.100, p.811-827, 2005.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; KAPIL, A.; SAMANT, M.; DUBE, A. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Dysoxylum binetariaferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 36-42, 2007.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Appied. Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 151-162, 2005.

LOMBARDO M., KIYOTA S., KANEKO T. M. Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, p. 9-17, 2009.

LOURENÇO M.V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biológico**, v.65, p.63-65, 2003.

LUCIO E. M. R. A.; SHARAPIN N.; FRANÇA H. S. Estudo de alcalóides de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 130-131, 2002.

LUVIZOTTO M. C. R et al.. Lesão nodular na cavidade oral de cão causada por *Leishmania* sp. – relato de casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**,v.57, p.18-19, 2005.

MADEIRA, M. F., BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; MARZOCHI, M. C. A. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatropic leishmania strains. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 645-648, 1999.

MAFEZOLI J.; VIEIRA P.C.; FERNANDES J.B.; SILVA M. F. G. F.; ALBUQUERQUE S. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 335–340, 2000.

MAHIOU V, ROBLOT F, HOCQUEMILLER R, CAVE A, ROJAS DE ARIAS A, INCHAUSTI A, YALUFF G, FOURNET A. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 890-895, 1994.

MAIA-ELKHOURY A. N. S., ALVES W. A., SOUSA-GOMES M. L., SENA J. M., LUNA E. A. Leishmaníase visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.12, 2008.

MANNA L., REALE S., PICILLO E., VITALE F., ELIO GRAVINO A.E. Urine sampling for real-time polymerase chain reaction–based diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 64-67, 2008.

MARCHÁN E., ARRIECHE D., HENRIQUEZ W., CRESCENTE O. Efecto in vitro de una sustancia alcaloidea aislada de *Amphimedon virides* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. **Revista de Biología Tropical**, v. 48, p. 31-38, 2000.

MARZOCHI, M. C., TEIXEIRA, P. C., MARZOCHI, K. F., CONCEIÇÃO, N. F., COUTINHO, W., BRITO, D. B. Vacuum aspiratory puncture system For *Leishmania* culturing, isolation and transport preliminary report; **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.35, p.301 - 303, 1993.

MAURICIO, I. L.; GAUNT, M. W.; STODARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. **Parasitology**, v. 122, p. 393-403, 2001.

MATTOS JR D. G.; PINHEIRO J. M.; MENEZES R.C.; COSTA D.A. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaníase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.199-122, 2004.

MENDONÇA-FILHO, R.R., RODRIGUES, I.A., ALVIANO D.S., SANTOS, A.L.S., SOARES R.M., ALVIANO, C. S., LOPES A.H.C.S., ROSA M.S.S. Leishmanicidal activity of polyphenolic rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Research in Microbiology**, v.155., p.136–143. 2004.

MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. *et al.* **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 41-46.

MINDDLETON E., KANDASWAMI C., THEOHARIDES T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p.673-751.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaníase visceral (calazar). 2 ed. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da leishmaníase Visceral. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília,DF, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação**, 2005.

MISHRA B.B., KALE R.R., SINGH R.K., TIWARI V.K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia** v. 80, p. 81–90, 2009.

MITTAL N., GUPTA N., SAKSENA S., GOYAL N., ROY U., RASTOGI A. K. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Science** , v.63, p. 1823-1834, 1998.

MITTRA B., SAHA A., CHOWDHURY A. R., PAL C., MANDAL S., MUKHOPADHYAY S., BANDYPADHYAY S., MAJUMDER H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase ii-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, v.6, p.527-541, 2000.

MOHAMMED A.R.; WRIGHT E. P.; ABDEL RAHMAN A. M.; KOLK A.; LAARMAN J. J.; PONDMSN K. W. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparación of Elisa—imunofluorescence and indirect haemagglutination. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p.271-274, 1986.

MUNGANTIWAR A. A., NAIR A. M., SHINDE U. A., DIKSHIT V. J., SARAF M. N., THAKUR V. S. Studies on the immunomodulatory effects of alkaloidal fraction. **Journal of Ethnopharmacology**, v.65, p.125-31, 1999.

MUNÕZ V., MORETTI C., SAUVAIN M., CARON C., PORZEL A., MASSIOT G., RICHARD B., MEN-OLIVIER L. L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (syn. *Tabemaemontana van heurkii*). **Planta Medica** , v.60,p. 455–459, 1994.

NELSON, R. W. ; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1037-1038, 2001.

NIETO, J.; SAUGAR, J. M.; MIRET, J.; GONZÁLES, F. La Leishmaniosis canina. 1a Parte. Terapéutica. Inf. Vet. **Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España**, p. 34-40, 2005.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 213-232, 2005.

PAULA C. D. R., SAMPAIO J. H. D., CARDOSO D. R., SAMPAIO R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaníase tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 365-371, 2003.

PESSÕA, S. B; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PIETTA P. G. J. Flavonoids as antioxidantes. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

POLI, A.; SOZZI, S.; GUIDI, G, BANDINELLI P.; MANCIANTI F. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p. 263-271, 1997.

QUEIROZ E. F., ROBLLOT F., CAVE A. Pessoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v.59, p. 438-440, 1996.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; DE ANDRADE JR, H.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaníase: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

RIOUX J.A, LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P., PERIERES J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v.65, p. 111-125, 1990.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1234-1239, 1995.

ROCHA L.G., ALMEIDA J.R.G.S., MACEDO R.O., BARBOSA-FILHO J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** v.12, p. 514–535, 2005.

ROCHA G.M., ROCHA M.E.N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.1, p.76-85, 2006.

RODRÍGUEZ A. M., CAMARGO J. R., GARCÍA F. J. B. Actividad in vitro de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. Apocynaceae sobre amastigotes de *Leishmania braziliensis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 350-355, 2008.

ROYO V. A., SANTOS F. F., SOUZA V. A., PEREIRA A. C., DA SILVA R., VINHÓLIS A. H. C., DONATE P. M., SILVA M. L. A., ALBUQUERQUE S., BASTOS J. K. Biological activity evaluation of dibenzilbutirolactones lignans derivatives against *Leishmania braziliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 18-21, 2003.

SACKS, D., KAMHAWI, S. Molecular aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, p. 453- 483, 2001.

SALDANHA ACR. *Estudo comparativo entre o estibogluconato de sódio BP88® (Shandong Xinhua - China) e o antimoniato de meglumina (Rhodia - Brasil) no tratamento da forma cutânea de leishmaníase tegumentar americana, na área endêmica de Corte de Pedra, Bahia, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.31, p.239-241, 1998.*

SAMPAIO R. N. R., ANDRADE G. B., PEREIRA A. C., SILVA E. A., CUBA C. A. Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaníase tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p.557-561, 2002.

SAUVAIN M., KUNESCH N., POISSON J., GANTIER J-C., GAYRAL P., DEDET J-P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dellineaceae). **Phytotherapy Research**, v.10, p.1-4, 1996.

SANTOS A. K. L., MAGALHÃES T. S., MONTE F. J. Q., MATTOS M. C., OLIVEIRA M. C. F., ALMEIDA M. M. B., LEMOS T. L. G., BRAZ-FILHO R. Alcaloides iboga de *Peschiera affinis* (Apocynaceae) – atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 32, 1834-1838, 2009.

SCHINOR E. C., SALVADOR M.J., PRAL E.M.F.; ALFIERI S. C.; ALBUQUERQUE S.; DIAS D. A. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, 2007.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. **Boletim Epidemiológico**, Leishmaníase Visceral, 2007.

SEIFERT, K., LEMKE, A., CROFT, S. L., KAYSER, O. Antileishmanial structure-activity relationships of synthetic phospholipids: *in vitro* and *in vivo* activities of selected derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 4525-4528, 2007.

SHERLOCK I. A.; MIRAND J. C.; SADIGURSKY M.; GRIMALDI JR G. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.79, p.511,1984.

SILVA J. C. F. leishmaníase visceral canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

SILVA E. S.; PIRMEZ C.; GONTIJO C. M. F.; FERNANDES O.; BRAZIL R.P. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **The Veterinary Record**, v. 147, p. 421-422, 2000.

SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, p. 819, 1999.

SIMÕES-MATTOS L., TEIXEIRA M.J., COSTA D.C., PRATA JR. J.R.C., BEVILAQUA C.M.L., SIDRIM J.J.C., ROCHA M.F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Veterinary Parasitology**, v.103, p.207–216, 2002.

SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, p. 173-180, 2004.

SIRI S., WADBUA P., WONGPHATHANAKUL W., KITANCHAROEN N., CHANTARANOTHAI P. Antibacterial and Phytochemical Studies of 20 Thai Medicinal Plants against Catfish-Infectious Bacteria, *Aeromonas caviae*. **KKU Science Journal**, v.36, p. 1-10, 2008.

SOARES D. C., PEREIRA C. G., MEIRELES M. A., SARAIVA E. M. B. Anti-*Leishmania (L.) amazonensis* activity of supercritical CO₂ + ethanol extracts from

Tabernaemontana catharinensis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 110, 2003.

SOUZA J. J., VIEIRA I. J. C., MATHIAS L. E BRAZ-FILHO R. Alcalóides Indólicos de *Tabernaemontana hystrix*. **Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

SOUZA R. M. ATR: avanço da espectroscopia de infravermelho na análise de materiais plásticos. **Boletim de Tecnologia e desenvolvimento de embalagens**, v. 21, p. 01-03, 2009.

SPANOS G. A., WROLSTAD R. E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage-a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p.1478–1487, 1992.

STAERK D., LEMMICH E., CHRISTENSEN J., KHARAZMI A., OLSEN C. E., JEROSZEWSKI J. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. **Planta Medica**, v. 66, p. 531-536, 2000.

SUGUMARAN M., VETRICHELVAN T., DARLIN QUINE S. Free Radical Scavenging Activity of Folklore: *Pithecellobium dulce* Benth. Leaves. **Ethnobotanical Leaflets** , v. 12, p.446-451, 2008.

SUGUMARAN M., VETRICHELVAN T., QUINE S. D. Antidiabetic potential of aqueous and alcoholic leaf extracts of *Pithecellobium dulce*. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v.2,p. 1-3, 2009.

SVOBODOVÁ M., JANVOTÝPKA. Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hamsters and mice by the bite of *Phlebotomus sergenti*. **Microbes and Infection** v.5 , p. 471–474, 2003.

TASDEMIR, D.; GÜNER, N. D.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; DÖNMEZ, A. A.; ÇALIS, I.; RÜEDI, P. Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of *Scrophularia lepidota* roots. **Phytochemistry**, v. 66, p. 355-362, 2005.

TEMPONE, A.G; BORBOREMA, S.E.T; ANDRADE JR, H.F.; GUALDA; N.C.A; YOGI; A; CARVALHO; C.S; BACHIEGA; D; LUPO; F.N; BONOTTO; S.V; FISCHER; D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. **Phytomedicine**, v.12, p. 382-390, 2005.

TILLEY, L.P.; SMITH JUNIOR, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 minutos**. 2 ed. São Paulo: Manole, p.892 , 2003.

TUCKER S. C. Floral Development in Legumes. **Plant Physiology**, v. 131, p. 911-926, 2003.

VEXENAT, J. A.; OLLIARO, P. L.; FONSECA DE CASTO, J. A.; CAVALCANTE, R.; FURTADO CMPOS, J. H.; TAVARES, J.P.; MILES, M.A. Clinical recovery and limited 119 cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidina (paromomycin). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 448-453, 1998.

WINK M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WOLTER-FILHO W.; ANDRADE C. H. S.; BRAZ-FILHO R.; MATOS F. J. A. Alcalóides de *Peschiera affinis* (Muell. Arg) Miers (Apocynaceae). **Acta Amazônica**, v. 15, p. 193-197, 1985.

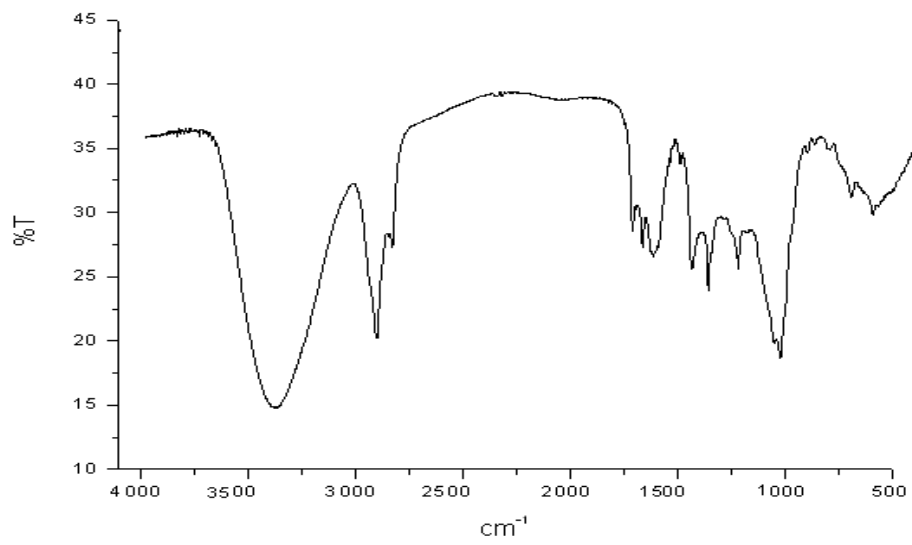
WYLLIE S., FAIRLAMB A.H. Refinement of techniques for the propagation of *Leishmania donovani* in hamsters. **Acta Tropica**, v. 97, p. 364-369, 2006.

ANEXOS

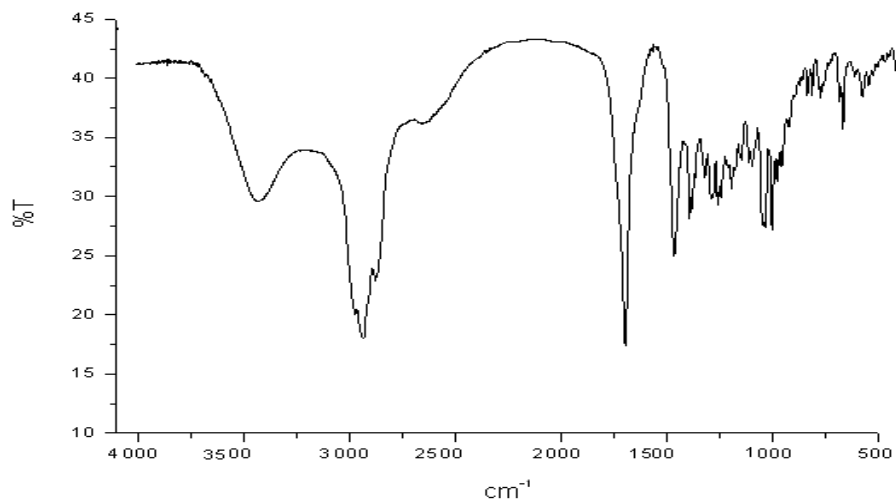
DADOS ESPECTRAIS INFRAVERMELHO (IR)

Peschiera affinis

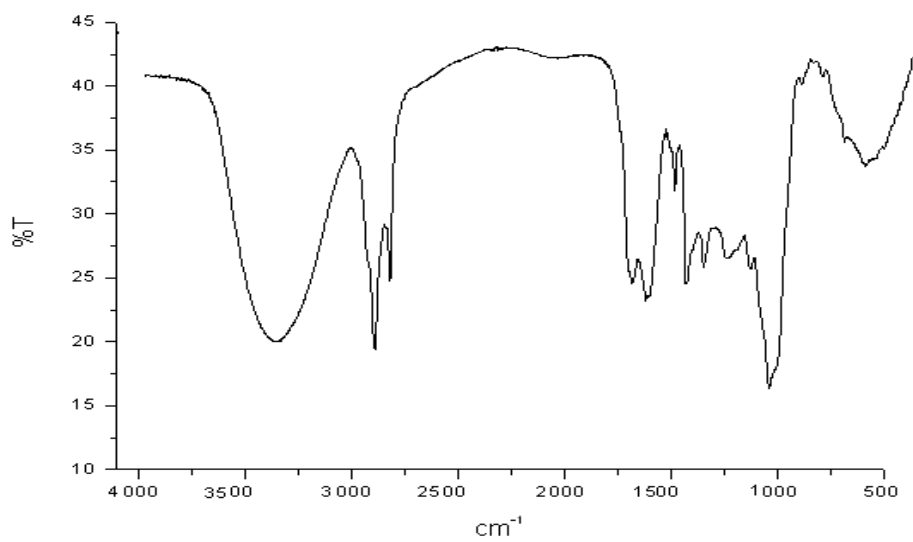
Extrato etanólico



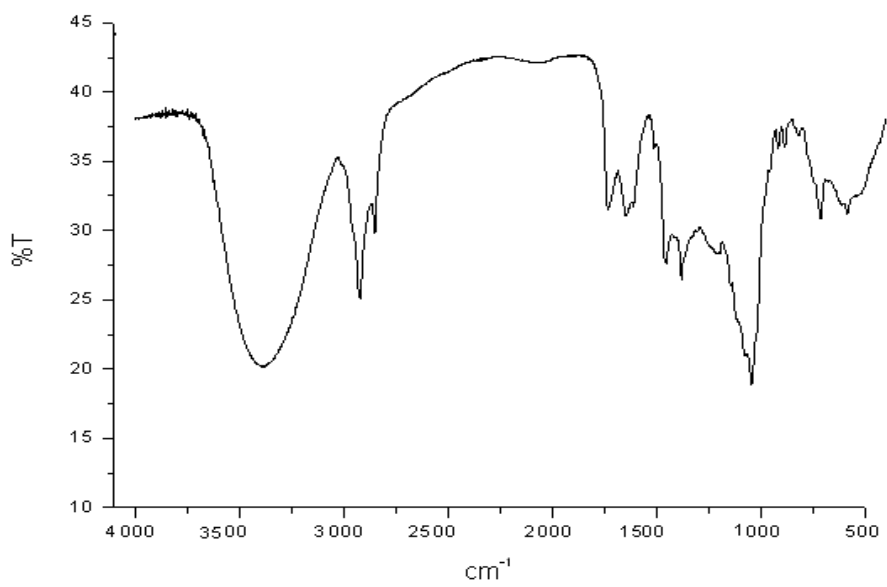
Pa1



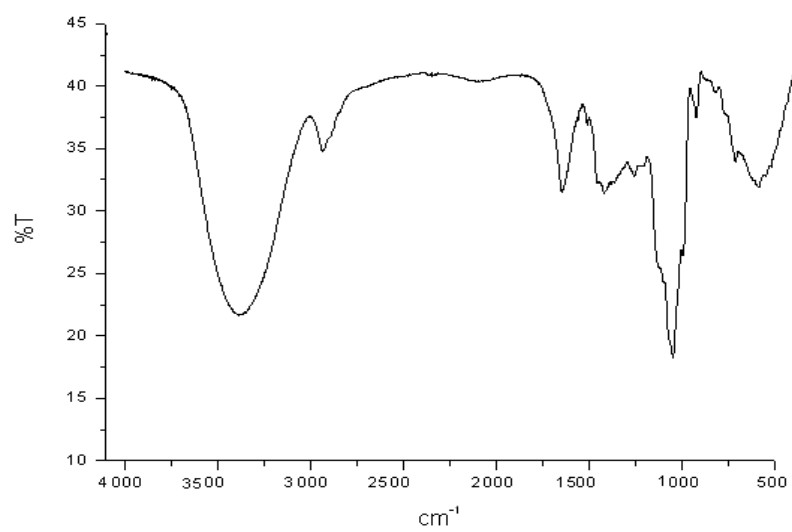
Pa2



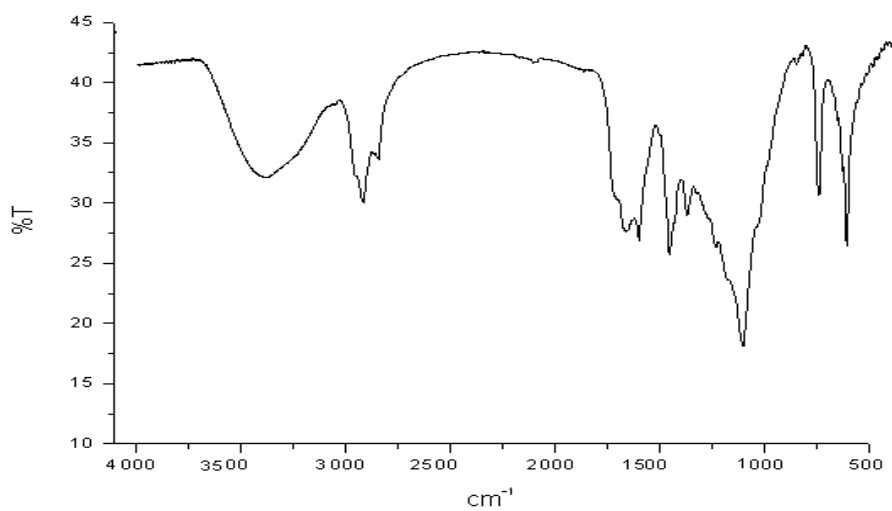
Pa3



Pa4

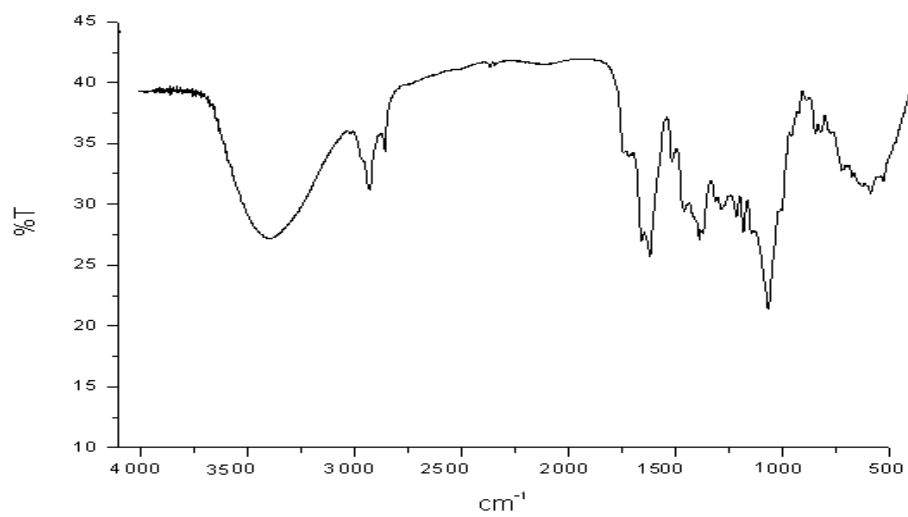


Pa5

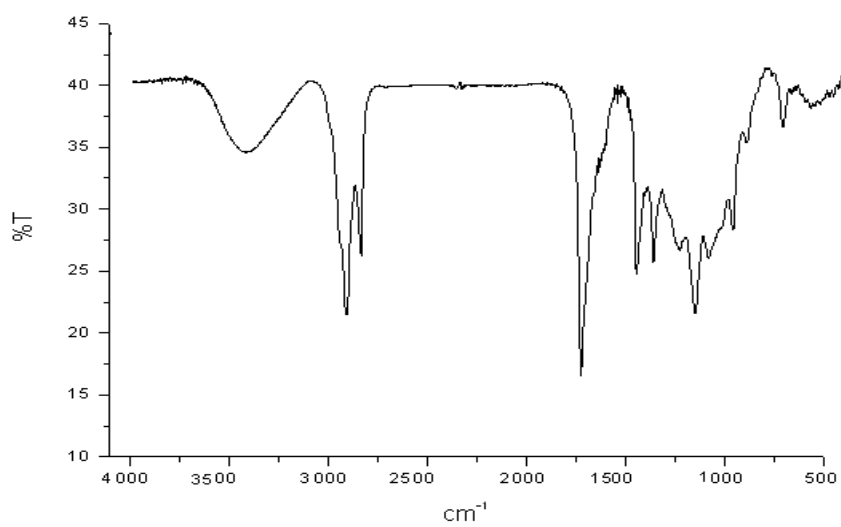


Pithecellobium dulce

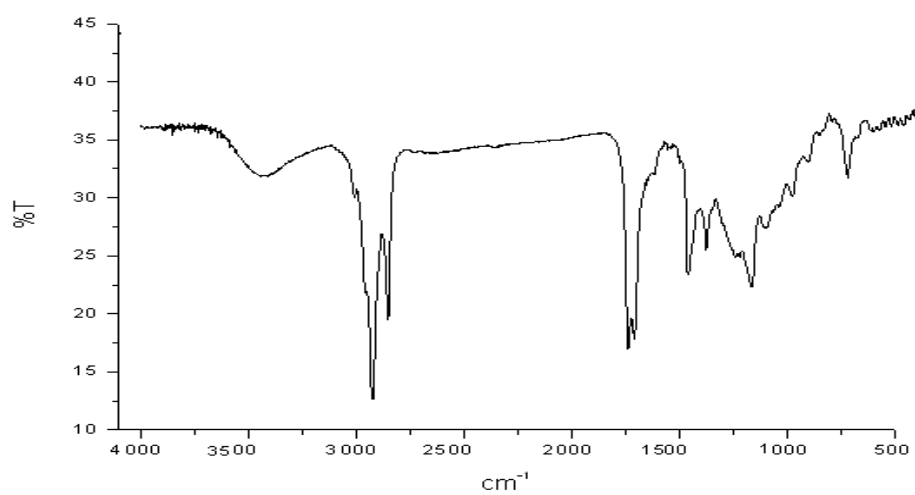
Extrato etanólico



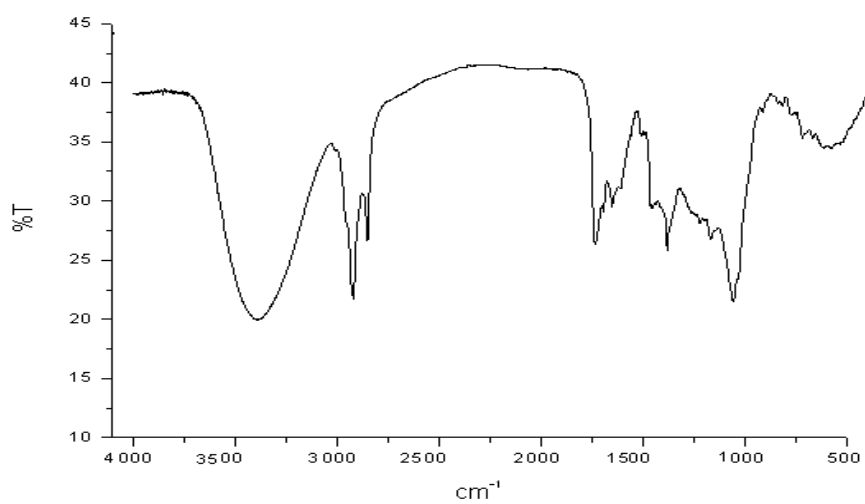
Pd1



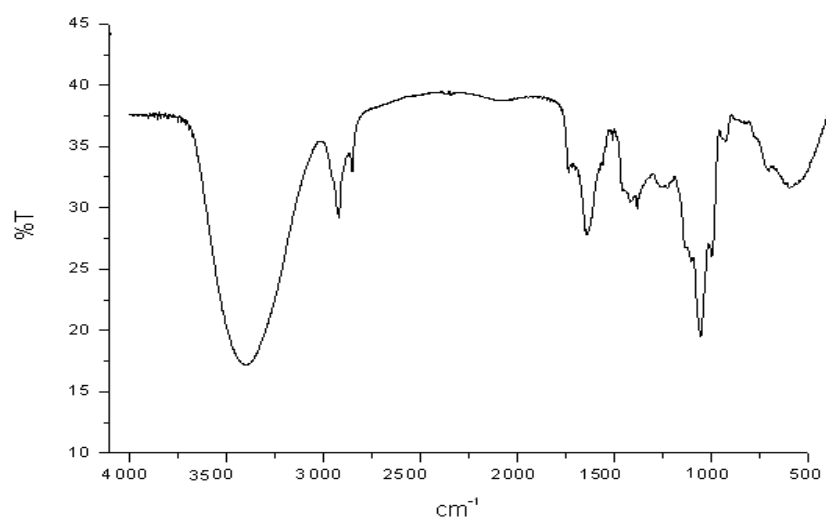
Pd2



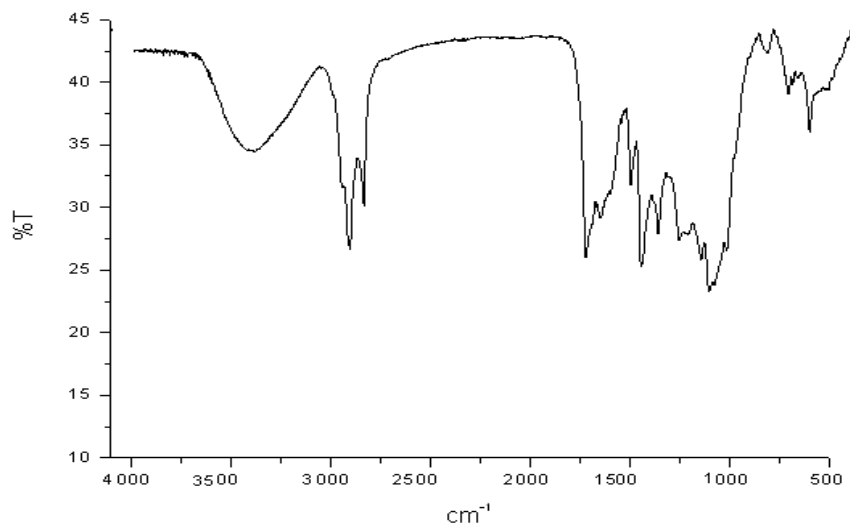
Pd3



Pd4



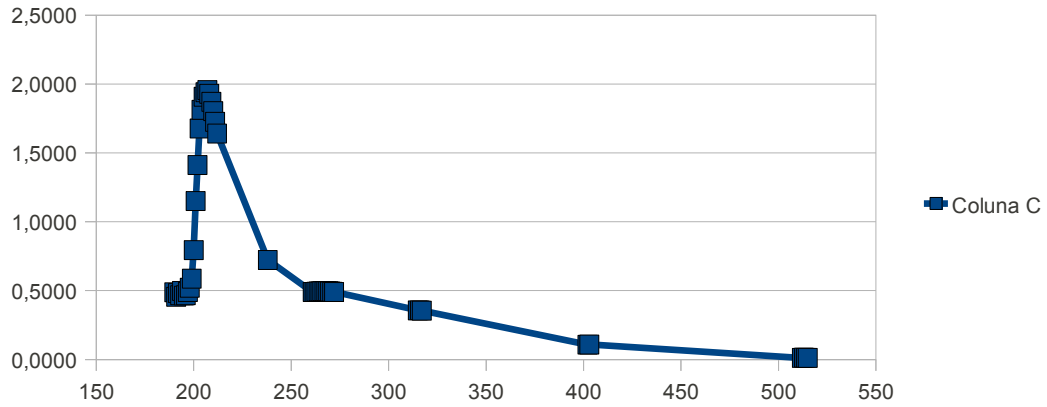
Pd5



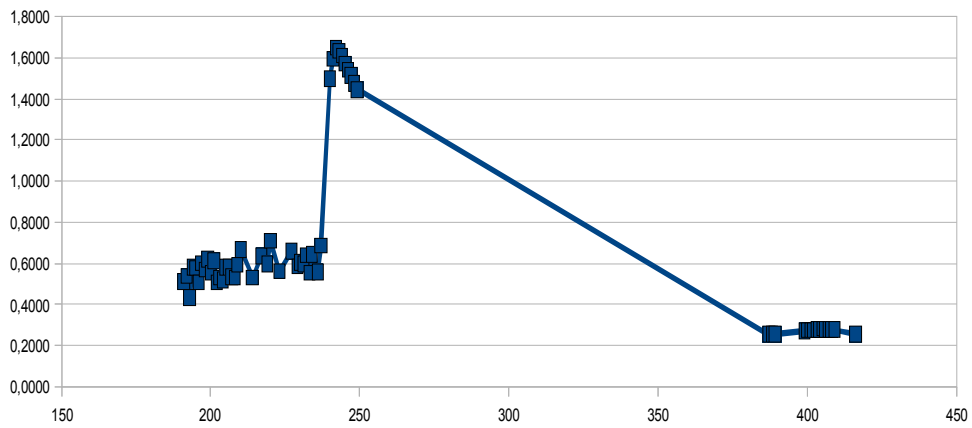
DADOS ESPECTRAIS ULTRAVIOLETA (UV)

Peschiera affinis

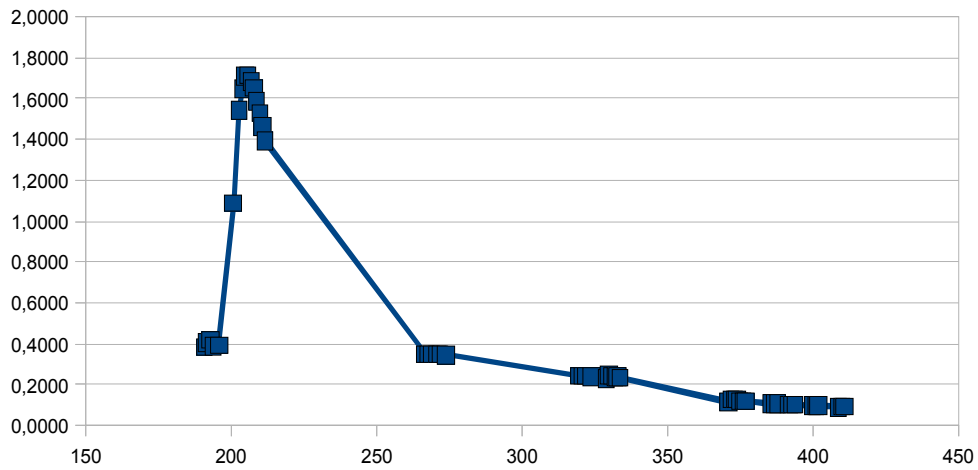
Extrato etanólico



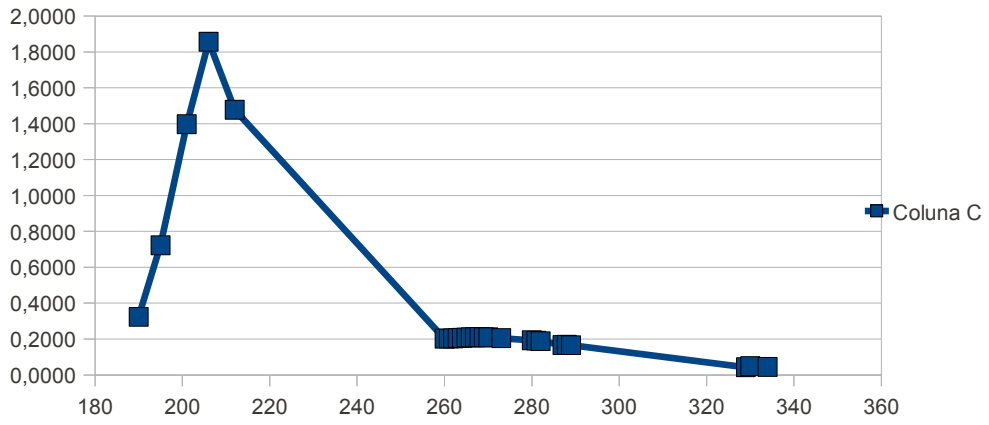
Pa1



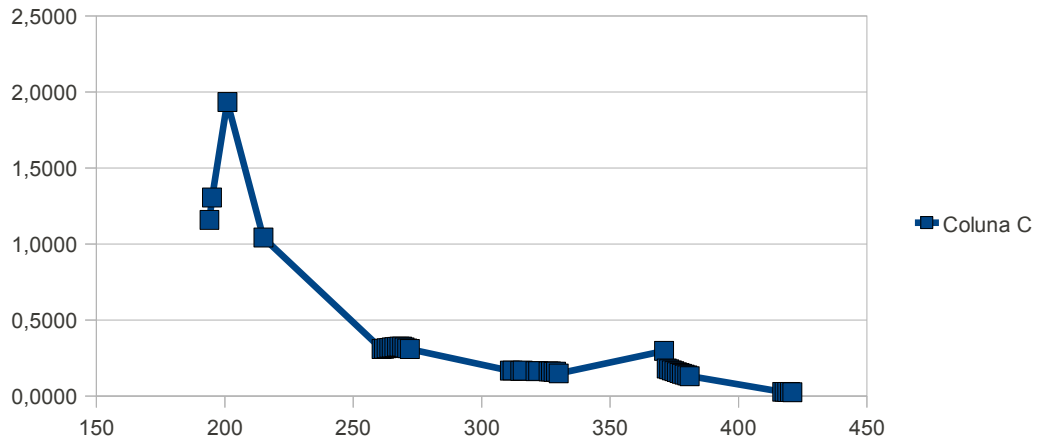
Pa2



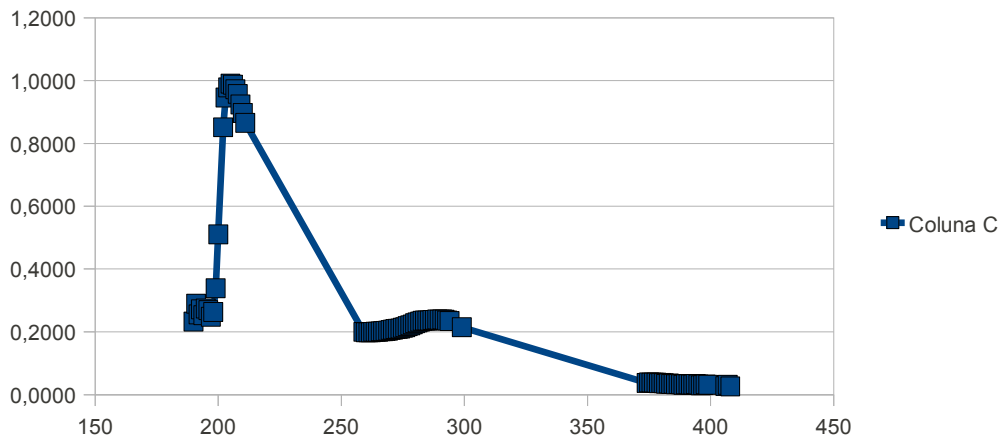
Pa3



Pa4

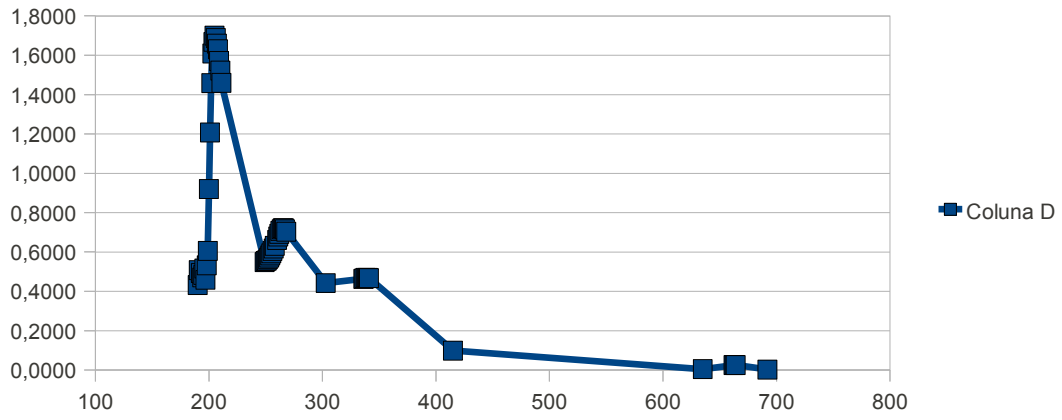


Pa5

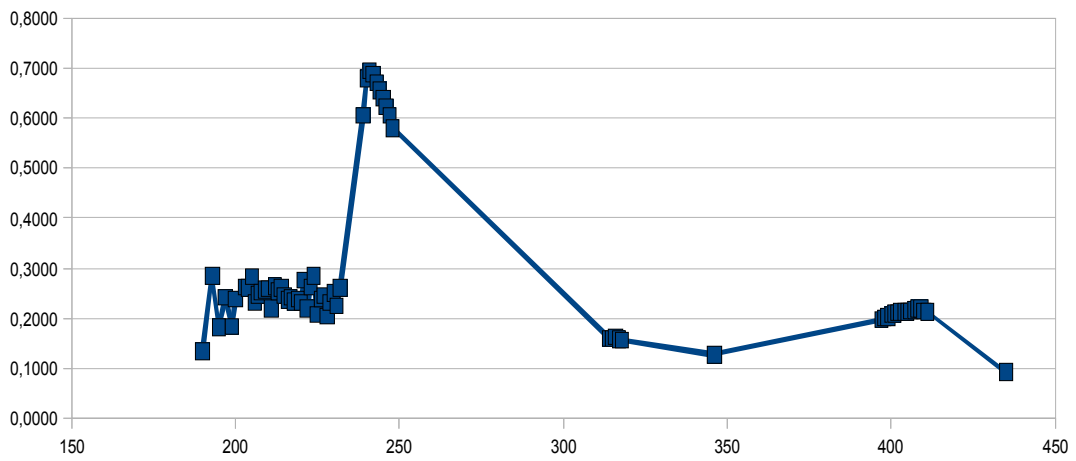


Pithecellobium dulce

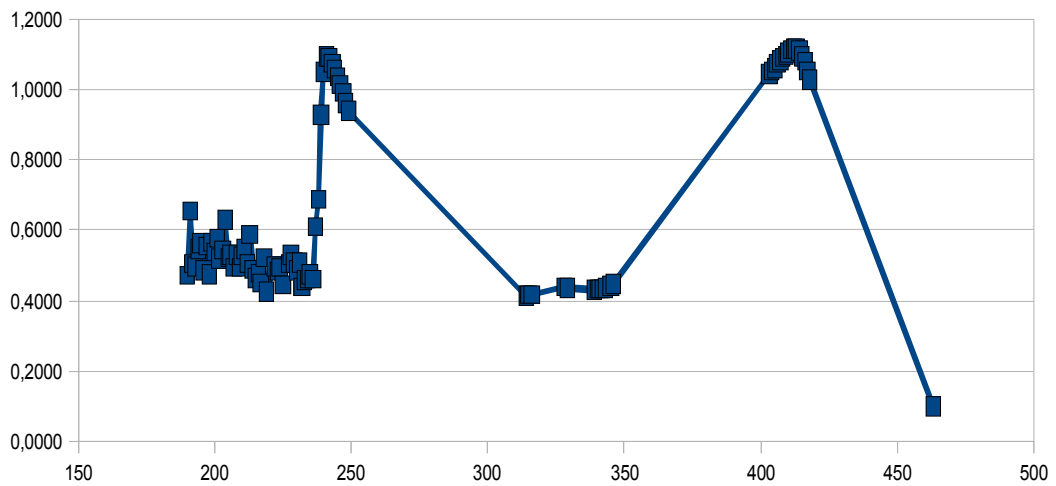
Extrato etanólico



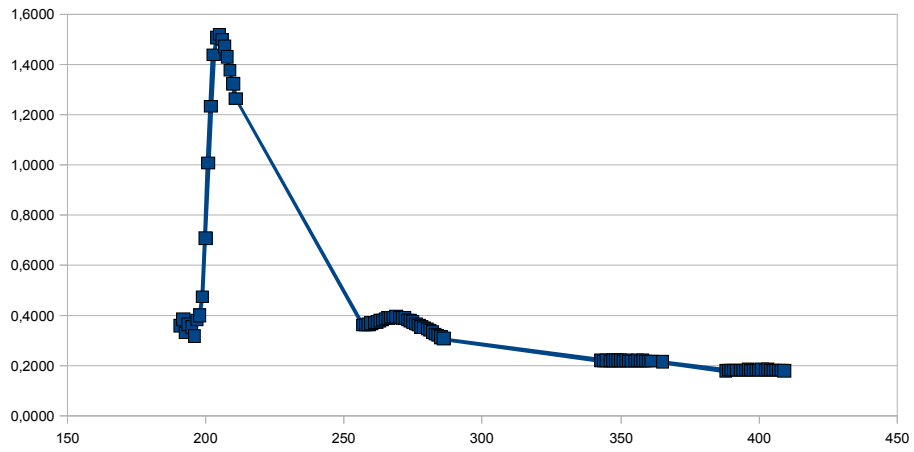
Pd1



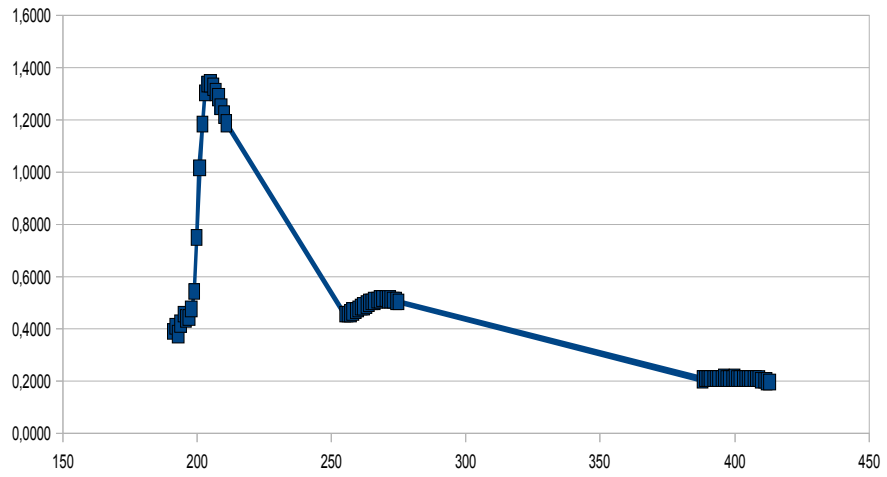
Pd2



Pd3



Pd4



Pd5

