



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

ANTONIO ADAILSON DE SOUSA SILVA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE TRITERPENOS ISOLADOS DA
Musa paradisiaca E DO ÁCIDO ANACÁRDICO E SEUS DERIVADOS
CONTRA *Leishmania infantum chagasi***

**FORTALEZA
2013**

ANTONIO ADAILSON DE SOUSA SILVA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE TRITERPENOS ISOLADOS DA
Musa paradisiaca E DO ÁCIDO ANACÁRDICO E SEUS DERIVADOS
CONTRA *Leishmania infantum 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. Selene Maia de Moraes

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho

Bibliotecário (a) Leila Cavalcante Sátiro – CRB-3 / 544

S586a Silva, Antonio Adailson de Sousa.
Atividade leishmanicida de triterpenos isolados de *Musa paradisiaca* e do ácido anacárdico e derivados contra *Leishmania infantum chagasi*/Antonio Adailson de Sousa Silva. — 2013.
CD-ROM 111f. : il. (algumas color.); 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof^a. Dr^a.Selene Maria de Moraes

1. Ácido anacárdico. 2. Triterpenos. 3. *Musa paradisiaca*. 4. *Leishmania infantum chagasi*. I. Título.

CDD: 636.089

ANTONIO ADAILSON DE SOUSA SILVA

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE TRITERPENOS ISOLADOS DA
Musa paradisiaca E DO ÁCIDO ANACÁRDICO E SEUS DERIVADOS
CONTRA *Leishmania infantum chagasi*

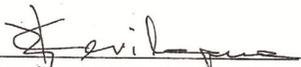
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade
de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora



Profª. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora



Profª. Dra. Micheline Soares Costa Oliveira
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Aos meus pais, Domingas Erotilde e Antonio Germano e às minhas irmãs, Adriana Silva, Evanilde Silva e Telma Silva.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará pela oportunidade de tornar-me mestre nesta área da ciência que é tão importante para a saúde humana e animal.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo fornecimento da Bolsa de estudo.

À minha orientadora, Profa Dra Selene Maia de Moraes, por aceitar me orientar para a seleção do mestrado mesmo sem me conhecer. Agradeço-a por ser tão maleável prestativa e pela sua simplicidade.

Às Professoras Dra Cláudia Maria Leal Beviláqua e Dra Micheline Soares Costa Oliveira que aceitaram participar da banca de defesa desta dissertação e que muito contribuíram para o melhoramento da dissertação deste trabalho.

A Profa Dra Maria Jania Teixeira do Setor de Estudos em Parasitologia, do Departamento de Medicina Legal e Patologia da Universidade Federal do Ceará, pelo ensino e paciência e por ter cedido seu laboratório para o desenvolvimento de parte deste estudo. E à Sayonara de Melo Viana, pela parceria e trabalho desenvolvido durante parte do experimento.

A Pesquisadora Dra Maria José Cajazeiras Falcão, pelo incentivo, ensino e paciência durante o período de extração dos compostos químicos usados neste trabalho e à Dra Nadja Soares Vila Nova por seus esclarecimentos e por estar sempre a disposição quando precisei.

A toda equipe do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Ceará, pelo acolhimento, paciência e colaboração em minhas pesquisas. Em especial, Clécio Galvão Martins, Joana de Barros Alexandre, Larissa Guerra e Pablito Augusto Travassos Ferreira.

Ao Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará. Em especial ao amigo, mestrando em Farmacologia, Francisco Stefânio Barreto por estar sempre à disposição, pelo auxílio durante os experimentos e exemplo de vida.

Ao Professor Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior e Camila Aparecida de Carvalho do Laboratório de Protozoologia da Universidade de São Paulo por todo o apoio e pela parceria que fundamental para a realização deste estudo.

A todos os professores do PPGCV, com os quais aprendi muito. Em especial às Professoras Dra Maria Fátima Teixeira e Dra Lúcia Daniel por todo o conhecimento e simplicidade passados aos alunos em suas disciplinas.

A Brena Galdino Marçal Silveira, por todo carinho, amor, atenção, paciência, incentivo, e inúmeros outros substantivos e adjetivos que estão acima de qualquer palavra. O meu muito obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos e por tudo que me proporcionou e proporciona hoje e sempre.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste projeto, o meu muito obrigado.

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença crônica grave e potencialmente fatal para o homem e para o cão. O tratamento em humanos é feito principalmente com medicamentos à base de antimônio pentavalente, porém essas drogas têm efeito tóxico, nem sempre são efetivas e são usadas em esquemas prolongados. O controle e o tratamento de cães com drogas sintéticas não têm apresentado cura da leishmaniose visceral canina. Alternativas para encontrar novos agentes com ação leishmanicida, tem sido a investigação de compostos de plantas. Diante do exposto, este trabalho visou testar a atividade leishmanicida de triterpenos isolados de *Musa paradisiaca* e do ácido anacárdico e derivados sintéticos deste frente à *Leishmania infantum chagasi*. Para isso, foram isolados esteróis e triterpenos da casca do fruto da banana prata (*Musa paradisiaca*) por meio de métodos cromatográficos e ácido anacárdico extraído de Líquido da Casca da Castanha do Caju e três derivados sintéticos. A atividade contra as formas promastigota e amastigota de *L. infantum chagasi* foi determinada *in vitro* e os extratos dissolvidos em DMSO. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços com os extratos nas concentrações decrescentes a partir de 100 µg/mL. A inibição de crescimento (CI₅₀) de promastigotas e a toxicidade em células de mamíferos foi determinada por método colorimétrico do MTT e para amastigotas usou-se o método de ELISA *in situ*. Como medicamento de referência foi usado a pentamidina e a anfotericina B para promastigota e amastigota respectivamente. No teste de citotoxicidade foram usadas células RAW 264.7 de murinos e células LLC-MK₂ de rins de macaco *Resus*. Observou-se que os melhores resultados foram obtidos com a mistura de estigmasterol e β-sitosterol e 24-metileno-cicloartanol da casca da banana, com CI₅₀ com 14,35 e 16,55 µg/mL respectivamente contra a forma promastigota. Contra a formas amastigota, o ácido anacárdico e seus derivados apresentaram atividade sem diferenças significativas entre si, com valores de CI₅₀ entre 61,62 e 74,83 µg/mL.

Palavra-chave: Ácido anacárdico. Triterpenos. *Musa paradisiaca*. *Leishmania infantum chagasi*.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a chronic serious disease and potentially fatal to man and dog. Treatment in humans is mostly done with drugs based on pentavalent antimony, but these drugs have toxic effects, are not always effective and are used in periods prolonged. The control and treatment of dogs with synthetic drugs have not shown healing of canine visceral leishmaniasis. Alternatives to find new agents with antileishmanial action, has been the investigation of plant compounds. Given the above, this study aimed to test the leishmanicidal activity of triterpenoids isolated from *Musa paradisiaca* and anacardic acid and synthetic derivatives of this front to *Leishmania infantum chagasi*. For this, sterols and triterpenes were isolated from the bark of the banana fruit silver (*Musa paradisiaca*) by chromatographic methods and anacardic acid extracted from Shell Liquid Cashew nuts and three synthetic derivatives. The activity against promastigote and amastigote forms of *L. infantum chagasi* was determined in vitro and extract dissolved in DMSO. The experiments were performed in 96-well plates with extracts at concentrations decreasing from 100 µg/mL. The inhibition of growth (IC₅₀) of promastigotes and toxicity in mammalian cells was determined by the MTT colorimetric method and the amastigote was used in situ ELISA method. The reference drug was used pentamidine and amphotericin B for promastigote and amastigote respectively. In the cytotoxicity test were used murine RAW 264.7 cells and LLC-MK2 cells from *Rhesus* monkey kidneys. It was observed that the best results were obtained with a mixture of stigmasterol and β-sitosterol and 24-methylene-cicloartanol of a banana skin with IC₅₀ with 14.35 and 16.55 µg/mL respectively against the promastigote form. Against amastigote, anacardic acid and its derivatives showed activity without significant differences between them, with IC₅₀ values between 61.62 and 74.83 µg/mL.

Keywords: Anacardic acid. Triterpenes. *Musa paradisiaca*. *Leishmania infantum chagasi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico da <i>Leishmania spp.</i>	17
Figura 2: A: Forma promastigota. B: Forma amastigota.	18
Figura 3: Pacientes sintomáticos apresentando hepatoesplenomegalia. A: período inicial ou fase aguda; B: período de estado e C: período final.	19
Figura 4: Cães com LV apresentando: A: lesões no corpo; B: onicogribose; C: lesões de face e orelha e D: ceratoconjuntivite e lesões de face e orelha.	20
Figura 5: Estrutura química do Tártaro emético	21
Figura 6: Estrutura química da ureia estibamina.	22
Figura 7: Estrutura química do Glucantime	22
Figura 8: Estrutura química do Pentostam.	23
Figura 9: Dois modelos propostos para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. 1: redução do Sb ^(V) a Sb ^(III) pelos tióis; 2: formação do complexo Sb ^(V) -ribonucleosídeos.	24
Figura 10: Estrutura química da Anfotericina B	26
Figura 11: Estrutura química da Pentamidina	27
Figura 12: Estrutura química da Miltefosine	28
Figura 13: Estrutura química do Alopurinol	29
Figura 14: <i>Anacardium occidentale</i> L.	38
Figura 15: Principais Constituintes do LCC: A: Ácido Anacárdico; B: Cardanol; C: Cardol e D: 2-metilcardóis.	39
Figura 16: Fruto da <i>Musa paradisiaca</i>	41
Figura 17: Dois principais triterpenos encontrados na casca da banana (<i>Musa spp.</i>). A: cicloeucalenona e B: 31-norcicloeucalenona.	44
Figura 18: Triterpenos isolados da <i>M. sapientum</i> . A: 3-epicicloeucalenol; B: 3-epicicloeucalenol (isômero de A); C: 3-epiciclomusalenol; D: 3-epiciclomusalenol (isômero de C); E: ciclofolidona; F: 28-norciclomusalenona e G: 24-oxo-29-norcicloartanona.	45
Figura 19: Esteróis de <i>Musa spp.</i> A: β -Sitosterol; B: campesterol e C: estigmasterol.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito leishmanicida <i>in vitro</i> de plantas.....	35
Tabela 2: Efeito leishmanicida <i>in vivo</i> de plantas	37
Tabela 3: Composição química do LCC natural e LCC técnico	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

CB – Casca da Banana

CE – Concentração Efetiva

CI – Concentração Inibitória

DO – Densidade Óptica

FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa e ao desenvolvimento Tecnológico

IC - Inhibitory Concentration

IS – Índice de Seletividade

LCC – Líquido da Casca da Castanha do Caju

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

MTT - brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium

OMS – Organização Mundial da Saúde

SDS – Sulfato Dodecil de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Leishmanioses	15
2.2 Leishmaniose Visceral	16
2.2.1 Agente etiológico.....	16
2.2.2 Ciclo biológico	17
2.2.3 Aspectos clínicos	18
2.2.3.1 No homem	18
2.2.3.2 No cão.....	19
2.2.4 Tratamento.....	20
2.2.4.1 Drogas de primeira escolha.....	21
2.2.4.2 Mecanismos de ação dos antimoniais	23
2.2.4.3 Efeitos adversos dos antimoniais	25
2.2.4.4 Drogas de segunda escolha.....	25
2.2.4.4.1 Anfotericina B	26
2.2.4.4.2 Pentamidina.....	27
2.2.4.4.3 Miltefosina.....	28
2.2.4.4.4 Alopurinol.....	28
2.3 Plantas medicinais.....	29
2.4 Plantas com atividade leishmanicida	31
2.4.1 Produtos de origem vegetal com atividade leishmanicida.....	31
2.4.1.1 Quinonas.....	31
2.4.1.2 Alcalóides	32
2.4.1.3 Terpenóides.....	32

2.4.1.4	Compostos fenólicos	33
2.4.1.5	Acetogeninas.....	33
2.4.2	Estudos <i>in vitro</i>	34
2.4.3	Estudos <i>in vivo</i>	36
2.5	Material vegetal	37
2.5.1	<i>Anacardium occidentale</i> L.....	37
2.5.2	Componentes químicos do LCC	39
2.5.3	<i>Musa paradisiaca</i>	40
2.6	Esteroides	42
2.6.1	Esteróis.....	43
2.6.2	Triterpenos	43
2.6.3	Esteroides de <i>Musa</i> spp.....	44
3	JUSTIFICATIVA.....	47
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	48
5	OBJETIVOS.....	49
5.1	Objetivo geral.....	49
5.2	Objetivos específicos	49
6	CAPÍTULO 1: Leishmanicidal and acetylcholinesterase inhibiting activities of anacardic acid and its derivatives.....	50
7	CAPÍTULO 2: Activity of triterpenes and sterols isolated from <i>Musa paradisiaca</i> fruit peel against <i>Leishmania infantum chagasi</i>.....	71
8	CONCLUSÕES	90
9	PERSPECTIVAS	91
10	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES	104

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças consideradas antropozoonoses, cujos agentes etiológicos são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (SILVA et al, 2007). São endêmicas em mais de 98 países, com uma estimativa de dois milhões de novos casos por ano, sendo 500 mil casos de leishmaniose visceral, forma potencialmente fatal e 1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (WHO, 2010). Nas Américas, o Brasil é o país com o maior registro de casos de leishmanioses, tanto da forma cutânea como visceral (FEITOSA; CASTELLÓN, 2002). A forma mais grave da doença é a leishmaniose visceral, que nas Américas é causada pela *L. infantum chagasi* (SILVA et al., 2007).

No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é o reservatório envolvido na manutenção do ciclo zoonótico predominante em várias regiões do país. O diagnóstico clínico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é precário e complexo, pois os sinais clínicos da doença são variáveis e inespecíficos, comuns a outras enfermidades que acometem o cão. Outro agravamento é a imunossupressão causada por *Leishmania* spp. que pode facilitar a ocorrência de infecções oportunistas, dificultando assim, o diagnóstico da LVC (BRASIL, 2006).

O ciclo biológico da *L. infantum chagasi* se dá através da picada do flebotomíneo infectado com a forma promastigota metacíclica (infectante) no hospedeiro vertebrado. O ciclo do parasito no inseto ocorre em torno de 72 horas e o período de incubação no cão varia de meses a anos (BRASIL, 2006).

As drogas de primeira escolha para o tratamento da LV são compostos à base de antimônio pentavalente (Sb^{5+}), porém estes fármacos que apresentam elevada toxicidade, nem sempre são efetivos e são usados em esquemas prolongados, de 20 a 30 dias (GONTIJO; MELO, 2004). Os principais mecanismos de ação dos leishmanicidas são apenas parcialmente conhecidos ou totalmente desconhecidos. No caso do Sb^{5+} , ainda não se conhece se quer sua fórmula estrutural (FRÉZARD et al., 2005).

As drogas de segunda escolha incluem anfotericina B lipossomal, pentamidina, miltefosina e alopurinol. Sendo a anfotericina B lipossomal a principal destas, usada quando o paciente não responde ao tratamento com Sb^{5+} (GONTIJO; MELO, 2004; QUEIROZ et al., 2004; MEDEIROS; ROSELINO, 2007). Porém, mesmo apesar do fato de que várias drogas estejam disponíveis para o tratamento das leishmanioses, novos e melhores medicamentos são urgentemente necessários. A maioria dos medicamentos disponíveis é cara,

requer regimes de tratamento longo e está se tornando mais e mais ineficaz (OPPERDOES; MICHEL, 2004).

Por outro lado, o Brasil tem a maior diversidade vegetal do mundo e as plantas, desde a antiguidade, têm sido usadas para tratar uma grande quantidade de doenças (LEÃO et al., 2007), pois a utilização de plantas como fonte de propriedades medicamentosas é tida como opção na busca de soluções terapêuticas, sendo utilizada principalmente pela população carente, uma vez que são de fácil acesso e apresentam alto índice de eficácia (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

Várias espécies de plantas apresentam atividade leishmanicida. Sendo esta atividade atribuída aos inúmeros metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Com destaque para as quinonas, alcaloides, terpenos e compostos fenólicos e derivados (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). Os mecanismos de ação de algumas plantas e extratos de plantas que podem afetar a viabilidade, mobilidade e fecundidade dos parasitos *in vitro* ainda carecem de estudos científicos (GOMES, 2010).

Diversos estudos testaram a atividade de terpenóides contra espécies do gênero *Leishmania* obtendo resultados significativos (DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008; TELES et al., 2011). Vários triterpenos, isolados de diversas espécies vegetais apresentam atividade leishmanicida *in vitro* significativa (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). O fruto de algumas espécies de *Musa* spp. apresentam boa quantidade de esteroides, sendo estes mais abundantes na casca da banana (CB). Os principais esteroides da CB da *Musa acuminata* são duas cetonas triterpênicas, 31-norciclolaudenona e cicloeucalenona, que são triterpenos encontrados em outras espécies de *Musa* spp. (OLIVEIRA et al., 2008).

A *Musa paradisiaca*, historicamente tem sido relatada como de uso contra asma, bronquite, queimaduras, diabetes, disenteria, hemorragia, febre, gangrena, gota, cefaléia, inflamação, insônia, sífilis, icterícia, tuberculose, convalescença, desnutrição, úlceras, feridas, verrugas, reumatismo e como antihipertensivo, antihelmíntico (IMAM; AKTER, 2011) e leishmanicida (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). O ácido anacárdico, composto fenólico presente na casca da castanha de caju (MAZZETTO et al. 2009) e em algumas plantas medicinais, vem sendo associado a uma série de atividades biológicas específicas (AGOSTINI-COSTA, et al., 2004).

Nesse contexto, triterpenos e esteróis isolados da casca do fruto da *M. paradisiaca*, usada tradicionalmente no tratamento da leishmaniose e o ácido anacárdico e seus derivados sintéticos, principal constituinte do líquido da casca da castanha de caju foram testados *in vitro* contra *L. infantum chagasi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, digenéticos, pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família *Tripanosomatidae*, os quais são encontrados no tubo digestório de flebotomíneos sob forma promastigota e parasitando o Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados nas formas amastigotas (BASANO; CAMARGO, 2004).

Os hospedeiros invertebrados se limitam apenas a flebotomíneos (Diptera; Phlebotomidae), sendo as fêmeas, os vetores do protozoário. Nos vertebrados, as leishmanias atacam uma grande variedade de mamíferos como canídeos, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos e alguns primatas, inclusive o homem (BASANO; CAMARGO, 2004; MEDEIROS; ROSELINO, 2007). O potencial vetorial de outras espécies de insetos na transmissão da *Leishmania* spp. em cães tem sido estudado. Os ectoparasitos *Rhipicephalus sanguineus* e *Ctenocephalides felis felis* apresentam capacidade vetorial na transmissão deste parasito, porém novos estudos são necessários para confirmar ou descartar esta hipótese (PAZ et al., 2010).

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma das seis principais doenças tropicais do mundo (MEDEIROS; ROSELINO, 2007), ocupando a segunda posição em nível de importância dentre as doenças parasitárias, ficando atrás apenas da malária. A OMS a considera uma zoonose endêmica em mais de 98 países no mundo (WHO, 2010). No continente Americano é encontrada em todos os países, com exceção do Canadá, Chile e Uruguai, com uma média de 400 mil novos casos por ano (FEITOSA; CASTELLÓN, 2002).

As *Leishmania* spp. causam uma variedade de doenças clínicas em humanos, de acordo com espécie e sua respectiva capacidade para proliferar em tecidos profundos ou próximo da superfície da pele, a temperaturas mais baixas. A OMS utiliza como princípio para classificar as leishmanioses, as várias manifestações da doença que se diferenciam em duas formas distintas: visceral e tegumentar ou cutânea. A tegumentar divide-se em três subtipos: mucocutânea, cutânea e cutânea difusa (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

2.2 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica grave potencialmente fatal para o homem, com epidemias em países do Mediterrâneo e América do Sul e uma média de 59 mil mortes anuais, representando um grave problema de saúde pública no Novo e no Velho Mundo (GUERIN et al., 2002).

Noventa por cento (90%) dos casos de LV ocorre em áreas rurais e suburbanas de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (BASANO; CAMARGO, 2004). A LV já foi descrita em pelo menos 12 países da América Latina, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste (BRASIL, 2006).

A LV é mais frequente em crianças menores de dez anos, com incidência ainda maior em crianças com menos de cinco anos. De acordo com o sexo, esta distribuição é de 60% e 40% no sexo masculino e feminino, respectivamente (BRASIL, 2006). No caso da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), não há relatos de predisposição quanto à raça, sexo e idade do cão. No entanto, acredita-se que raças miniaturas sejam menos susceptíveis, por habitarem dentro dos domicílios, limitando o acesso dos flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004).

2.2.1 Agente etiológico

Até recentemente, as espécies responsáveis pela LV eram classificadas como três espécies distintas do complexo *Leishmania donovani*. A *Leishmania donovani* na África Ocidental, Índia e China, a *Leishmania infantum* em países do Mediterrâneo e na Ásia e a *Leishmania chagasi* nas Américas (GONTIJO; MELO, 2004). Porém, alguns membros da espécie *L. donovani* apresentam mais características distintas entre si do que as diferenças entre *L. chagasi* e *L. infantum* (GÁLLEGO, 2004). Enquanto que alguns estudos com cepas destas duas últimas espécies oriundas de diferentes áreas geográficas, com a utilização de métodos como amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), análise da sequência de DNA da principal protease de superfície (Gp63) e hibridização com a sonda de DNA Lmet9, não revelaram diferenças significativas entre *L. chagasi* e *L. infantum* (MAURÍCIO et al., 1999).

Segundo Dantas-Torres (2006), a polêmica sobre a classificação taxonômica destas “duas” espécies é antiga, pois desde a classificação taxonômica da espécie *L. chagasi* nas Américas por Cunha e Chagas (1937), muitos debates têm surgido sobre a origem e

semelhança desta espécie com *L. infantum*. Portanto, alguns pesquisadores diferenciam *L. infantum* de *L. chagasi*, enquanto outros consideram uma única espécie, diferindo apenas geograficamente. Lainson e Rangel (2005) as classificam como duas subespécies *L. infantum infantum* e *L. infantum chagasi*. No presente trabalho será adotada a classificação *L. infantum chagasi*.

2.2.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *L. infantum chagasi* (figura 1) inicia-se quando o protozoário na forma promastigota (figura 2A) habita o intestino do flebotomíneo (BRASIL, 2006). Quando o homem ou outro animal é infectado por *Leishmania* spp., essas invadem as células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), onde se proliferam nos fagolisossomos, como amastigota (figura 2B). Quando o número de parasitas está muito elevado, os macrófagos se rompem, liberando-os, que serão fagocitados por outros macrófagos gerando um ciclo repetitivo (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004).

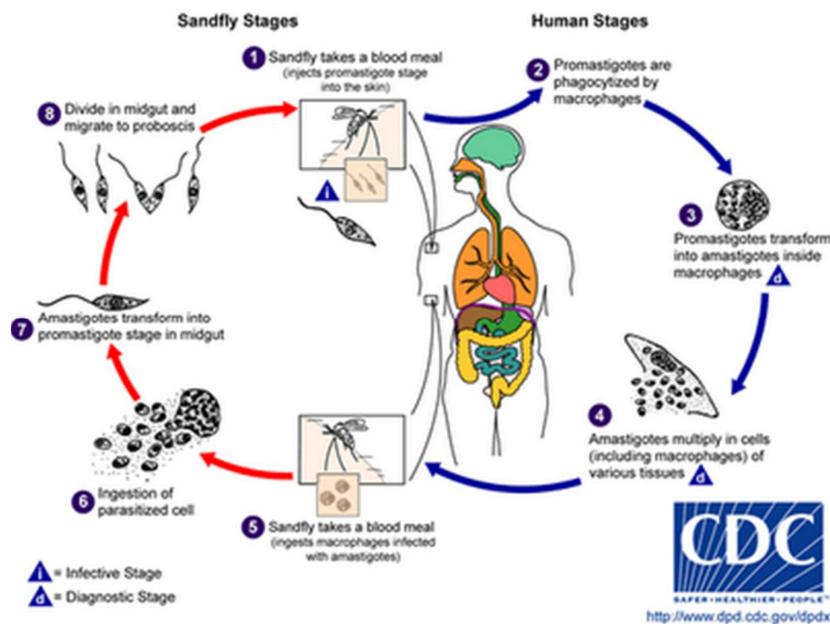


Figura 1: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Fonte: http://4.bp.blogspot.com/_Mz82Dvgeu0I/SdSsykT7NBI/AAAAAAAAAKY/ytLRPW00Ckk/s400/Imagem7.png. Acesso em 03 de junho de 2012.

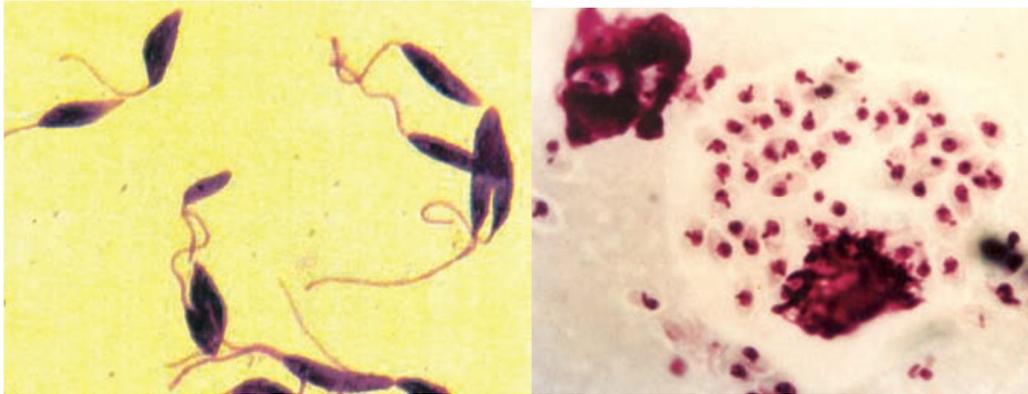


Figura 2: A: Forma promastigota. B: Forma amastigota.

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde (2006).

Quando indivíduos infectados são picados por flebótomos, as amastigotas de leishmania são sugadas juntas com o sangue. Chegando ao intestino delgado do vetor, transformam-se em promastigota, e o ciclo reinicia (BRASIL, 2006).

2.2.3 Aspectos clínicos

2.2.3.1 No homem

A sintomatologia da LV é caracterizada por um conjunto de manifestações clínicas: hepatoesplenomegalia, caquexia, pancitopenia, emagrecimento, palidez, hemorragias e febre, que podem levar à morte caso o paciente não seja tratado. A evolução clínica da LV é um processo contínuo, mas didaticamente está dividido em três períodos: período inicial, período de estado e período final (figuras 3) (BRASIL, 2006).

O período inicial ou fase aguda corresponde ao início da sintomatologia, que varia de acordo com cada paciente, mas geralmente inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (figuras 3A). O estado geral do paciente está preservado e o baço geralmente não ultrapassa 5 cm do rebordo costal esquerdo. O período de estado é caracterizado por febre irregular, na maioria das vezes associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia (figuras 3B). O quadro clínico apresenta-se comprometido, geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral. Caso o paciente não seja tratado, ou não responda ao tratamento, a doença poderá evoluir progressivamente para o período final (figuras 3C), com febre contínua e comprometimento

mais intenso do estado geral. Nesta fase, o paciente apresenta-se desnutrido e com edemas dos membros inferiores. Outras manifestações importantes nesta fase incluem hemorragias, icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (BRASIL, 2006).



Figura 3: Pacientes sintomáticos apresentando hepatoesplenomegalia. A: período inicial ou fase aguda; B: período de estado e C: período final.

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde (2006).

2.2.3.2 No cão

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC), geralmente é sistêmica e crônica, no entanto a evolução aguda e grave pode levar o animal ao óbito em poucas semanas. Em alguns cães a doença pode permanecer latente e até evoluir para a cura espontânea. No Brasil, a forma assintomática da doença é encontrada com índices variados, geralmente representa 40 a 60% de uma população soropositiva. O animal poderá apresentar-se assintomático dependendo da fase da doença e da imunidade deste (GÁLLEGO, 2004; BRASIL, 2006). Em casos sintomáticos, os principais sintomas são apatia, alopecia, emagrecimento, ceratoconjuntivite, onicogribose e lesões no corpo (figura 4) (BRASIL, 2006).



Figura 4: Cães com LV apresentando: A: lesões no corpo; B: onicogribose; C: lesões de face e orelha e D: ceratoconjuntivite e lesões de face e orelha.

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde (2006).

2.2.4 Tratamento

Desde o século 20, drogas como os antimoniais, alopurinol, anfotericina B, aminosidina, miltefosina e outras são amplamente utilizadas para o tratamento contra a leishmaniose visceral (QUEIROZ et al., 2004; GONTIJO; MELO, 2004; MEDEIROS; ROSELINO, 2007). Um fator preocupante, é que as drogas tradicionais apresentam alta toxicidade e resistência (TEMPONE et al, 2005).

Outros fatores inconvenientes, que merecem destaque, são as vias de aplicação, que podem ser intramuscular ou endovenosa, que geralmente são dolorosas e desconfortáveis e precisam ser administradas diariamente por longos períodos, o que muitas vezes requer hospitalização acarretando em desconforto ao paciente e alto custo aos cofres públicos (BRAGA et al, 2007).

2.2.4.1 Drogas de primeira escolha

Os medicamentos de primeira escolha são drogas à base de antimônio pentavalente (Sb^{5+}). O uso de compostos antimoniais para fins terapêuticos é conhecido há alguns séculos antes da era cristã, porém foi apenas em 1912 que o médico brasileiro Gaspar de Oliveira Viana descobriu a função leishmanicida do tártaro emético (figura 5), um antimoniato trivalente (Sb^{3+}) contra a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Em 1915 foi comprovada a eficácia terapêutica deste composto no tratamento da leishmaniose visceral (RATH et al., 2003; DEMICHELI; FRÉZARD, 2005).

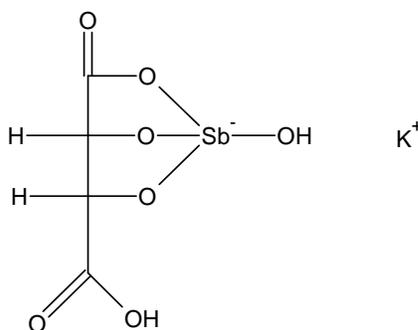


Figura 5: Estrutura química do Tártaro emético

Apesar da eficácia do tártaro emético, os graves efeitos colaterais provocados pelo seu uso e sua alta toxicidade para o ser humano levaram a uma rápida substituição por compostos à base de Sb^{5+} (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005). Os Sb^{5+} geralmente são dez vezes menos tóxicos em células de mamíferos do que os Sb^{3+} . O primeiro composto leishmanicida à base de antimônio pentavalente foi a uréia estibamina (figura 6), criado em 1920 por Bramachari. Este composto é um derivado uréico do ácido P-aminofenil estibínico. 16 anos depois (1936), Schmidt apresentou o gluconato de antimônio sódico, (Pentostan (Glaxo Wellcome) ou Solustibosan (Bayer)) como um composto promissor na terapêutica médica (RATH et al., 2003).

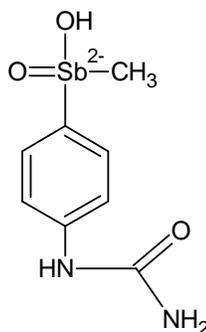


Figura 6: Estrutura química da ureia estibamina.

No Brasil, a droga de primeira escolha para o tratamento da LV é um Sb^{5+} , o N-metil glucamina (Glucantime[®]) (figura 7) (RAHT et al., 2003; MEDEIROS; ROSELINO, 2007). Outro Sb^{5+} muito empregado em outros países (principalmente os de língua inglesa) é o estibogluconato sódico (pentostan) (figura 8) (BORBOREMA, 2005; BRASIL, 2006). A taxa de cura total com Sb^{5+} é maior que 90% (WHO, 2010). Porém, dois fatores comprometem em parte, o uso desses fármacos:

A resistência a essas drogas que se tornou preocupante, principalmente em Bihar, na Índia e no Nepal, onde a falta de responsividade chega a 60%, embora isto não represente necessariamente a resistência do parasita (WHO, 2010). Outro problema relevante é o fato de essas drogas apresentarem efeito tóxico, nem sempre são efetivas e na LV são usadas em esquemas prolongados, de 20 a 30 dias (GONTIJO; MELO, 2004).

O glucantime, geralmente é excretado rapidamente pelos rins (KOROLKOLVAS; FRANÇA, 2004; MEDEIROS; ROSELINO, 2007). O principal efeito colateral deste composto é sua ação sobre o sistema cardiovascular (GONTIJO; MELO, 2004; BRASIL, 2006).

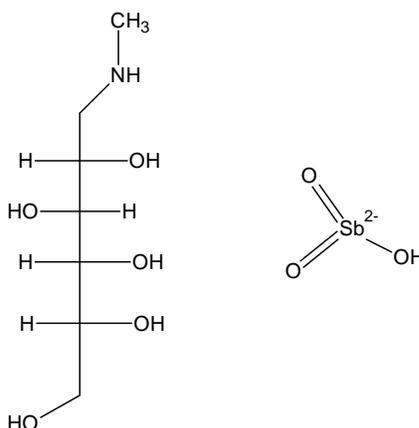


Figura 7: Fórmula molecular do Glucantime

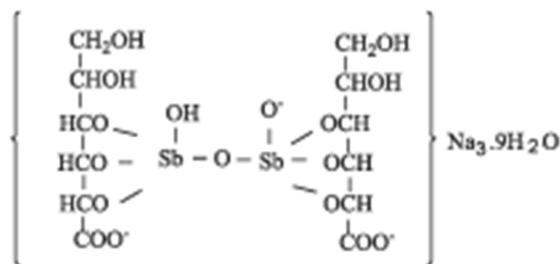


Figura 8: Estrutura química do Pentostam

Outros efeitos colaterais são: dor no local da aplicação e nas articulações, problemas gastrintestinais, cardiotoxicidade e em alguns casos, insuficiência renal e hepática (ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ, 2007), aumento dos níveis de transaminase hepática e as anomalias eletrocardiográficas, não devendo ser administrado em pacientes com cardiopatias, doença de Chagas, hepatopatias, nefropatias e tuberculose pulmonar. Sendo também contraindicado para pacientes grávidas, principalmente no primeiro trimestre da gestação (KOROLKOLVAS; FRANÇA, 2004).

2.2.4.2 Mecanismos de ação dos antimoniais

Apesar do uso de compostos no combate às leishmanioses existir a cerca de um século, seus principais mecanismos de ação ainda são conhecidos apenas em parte ou totalmente desconhecidos. Sendo que em alguns casos, não se conhece se quer sua fórmula estrutural, como é o caso dos antimonias pentavalentes (FRÉZARD et al., 2005).

Foi sugerido que o Sb⁵⁺ seria uma pró-droga, sendo reduzido no organismo hospedeiro a Sb³⁺ que seria a forma ativa e tóxica. Recentemente, foi mostrado que os tióis podem estar envolvidos nesse processo de redução. A glutatona apresenta um grupo sulfidila e é o tiol mais abundante no meio intracelular (figura 9.1) (RATH, et al., 2003; DEMICHELI; FRÉZARD, 2005).

O Sb³⁺ pode se ligar aos grupos sulfidrilas de algumas proteínas resultando em uma mudança conformacional e consequente perda de sua função. Porém sabe-se que o Sb⁵⁺ forma um complexo com ribonucleosídeos (figuras 9.2) interferindo no seu metabolismo e inibindo a topoisomerase do protozoário (DEMICHELI; FRÉZARD, 2005). Esta hipótese é reforçada, pelo elevado número de funções oxigenadas e nitrogenadas que os nucleosídeos e polinucleotídeos apresentam que se constituem em sítios doadores potenciais para íons

metálicos (GIL et al., 2007). Portanto esta interação é provável que tenha alguma implicação no mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes.

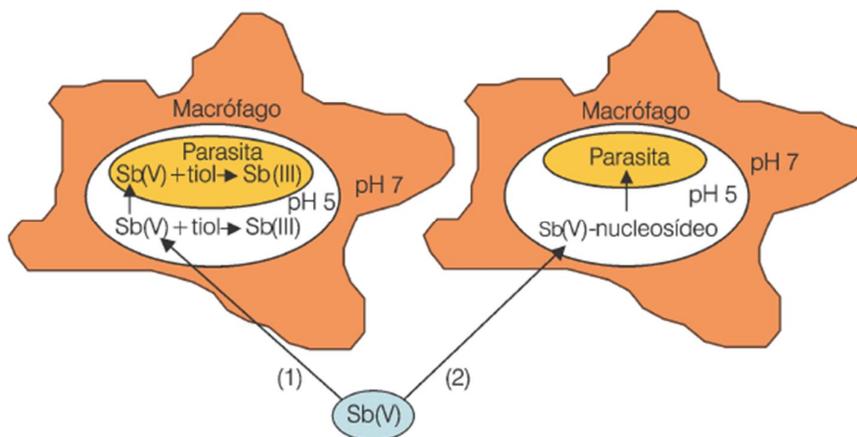


Figura 9: Dois modelos propostos para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. 1: redução do Sb^{5+} a Sb^{3+} pelos tióis; 2: formação do complexo Sb^{5+} -ribonucleosídeos.

Fonte: Demicheli e Frézard (2005).

Antimoniatos pentavalentes geralmente são dez vezes menos tóxicos em células de mamíferos do que os antimoniatos trivalentes. Esse fato reforça a hipótese de conversão metabólica de Sb^{5+} em Sb^{3+} , evidenciando a possibilidade de que o Sb^{3+} seja o agente tóxico ao parasito *Leishmania* spp. no espaço intramacrofágico. Outras hipóteses para ação do Sb^{3+} seriam a interferência deste composto nas vias de β -oxidação dos ácidos graxos e glicolíticas. Tais interações levariam a uma queda no metabolismo do parasito com consequente redução dos níveis de ATP (RATH et al., 2003).

Essa hipótese é reforçada por Chan-Bacab e Peña-Rodríguez (2001), que afirmam que o mecanismo de ação dos antimoniais é baseado na interferência de vários processos bioenergéticos do protozoário, ligando-se e inibindo diferentes proteínas/enzimas importantes nas vias energéticas de *Leishmanias* spp. tais como enzimas da glicólise e da β -oxidação dos ácidos graxos.

De acordo com Brasil (2007), os Sb^{5+} interferem nas vias bioenergéticas das amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares do protozoário, são inibidos, com consequente redução na produção de ATP e GTP. A exposição das formas amastigotas por quatro horas, nas doses de 150 a 500 mg de Sb^{5+} /mL, causa uma redução de determinados substratos, dose dependente

de CO₂. Quando expostos a 500 mg de Sb⁵⁺/mL, ocorre uma queda no nível de produção de CO₂ a partir da glicólise, facilitando a destruição do protozoário.

Rath e colaboradores (2003) afirmam ainda que a amastigota de *Leishmania* apresenta uma metaloprotease dependente de zinco (co-fator), sendo esta enzima essencial para o desenvolvimento do protozoário. Assim, o antimoniato poderá se ligar no sítio ativo desta enzima ocupando o lugar do zinco inativando assim metaloproteína.

Outra associação que se faz ao provável mecanismo de ação dos compostos metálicos, tais como os antimoniais, é sua capacidade de inibir a enzima superóxido dismutase (SOD), que por sua vez tem atividade e importância aumentadas em protozoários infectantes. Portanto, a inibição da SOD levaria a um aumento do nível de radicais superóxido e morte do parasito (RAYCHAUDHURY et al., 2005).

2.2.4.3 Efeitos adversos dos antimoniais

De acordo com Brasil (2007), podem ocorrer um ou mais efeitos adversos, na seguinte ordem de frequência: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA). Porém, essas queixas geralmente são leves e raramente exigem a suspensão do tratamento. Enquanto na dose de 20mg Sb⁵⁺/kg/dia, o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento.

Em algumas ocasiões, no início do tratamento, há uma exacerbação do quadro clínico com o aumento do infiltrado, do eritema, das secreções nasal e faríngea. Uma provável justificativa para esse fato seria uma resposta aos antígenos liberados com a morte do parasito (reação do tipo Jarish-Herxheimer). Este quadro pode ocorrer com qualquer tratamento específico (BRASIL, 2007).

2.2.4.4 Drogas de segunda escolha

Quando o tratamento com o antimonial pentavalente não apresenta resposta satisfatória, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina (BRASIL, 2007). Outras opções terapêuticas são a miltefosina e o alupurinol (RATH et al., 2003).

2.2.4.4.1 Anfotericina B

A Anfotericina B (figura 10) é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular. Esta droga apresentou-se 400 vezes mais potente que o antimônio pentavalente em hamsters e macacos infectados com *L. donovani*. É a droga de primeira escolha no tratamento de gestantes e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimônio pentavalente ou na impossibilidade de seu uso (BRASIL, 2007).

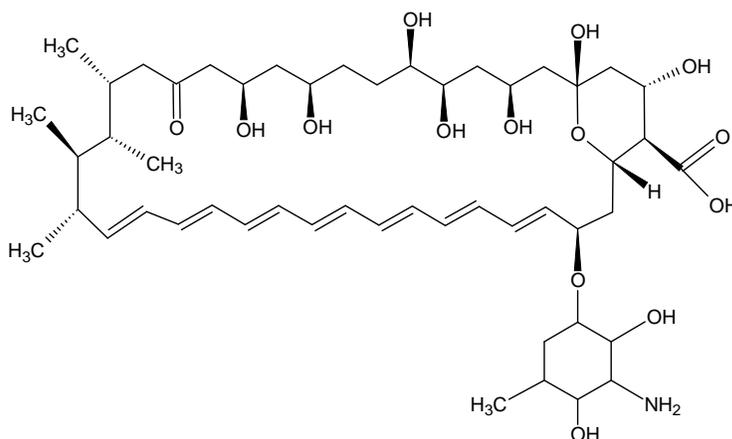


Figura 10: Estrutura química da Anfotericina B

Em caso de pacientes em período de gestação, não é recomendado o uso dos antimoniais, devido à ação sobre o feto, pois atravessa a parede placentária, podendo causar impregnação neural, ocasionando conseqüentemente vários graus de retardo mental no bebê. Nesse período, é recomendado o uso da anfotericina B, porém esta também apresenta efeitos tóxicos (GONTIJO; MELO, 2004; QUEIROZ et al., 2004; MEDEIROS; ROSELINO, 2007).

O principal mecanismo de ação da anfotericina B, é justificado pela sua interferência com ésteres da membrana citoplasmática específicos dos parasitos, o episterol, precursor do ergosterol, atuando em *Leishmania* nas formas promastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo*. Apresentando, portanto, toxicidade seletiva para a *Leishmania*. (BRASIL, 2007). A administração da anfotericina B é contra-indicada em pacientes cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas (RATH et al., 2003).

Dentre os efeitos colaterais da anfotericina B, destacam-se febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão, que podem ser atenuados ou evitados usando-se respectivamente antitérmicos, antieméticos, reposição de potássio e hidrocortisona 50 a 100 mg acrescentados ao soro. Porém, a presença dos sintomas descritos não contra-

indica a administração da anfotericina B. Outros efeitos adversos menos frequentes, mas importantes são: anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (BRASIL, 2007).

Várias formulações, incluindo anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B, têm sido usados no tratamento. São semelhantes à anfotericina B na sua eficácia, mas significativamente menos tóxicos. São administradas por via intravenosa ao longo de 2 h. Reações à infusão leves (febre, calafrios e rigor) e dores nas costas podem ocorrer em alguns pacientes. Nefrotoxicidade transitória ou trombocitopenia é visto ocasionalmente. A maioria dos ensaios clínicos foi realizada com uma referência na formulação lipossomal de anfotericina B; todas as outras formulações lipídicas devem ser avaliadas quanto à toxicidade, bioequivalência e eficácia antes de serem utilizadas clinicamente (WHO, 2010).

2.2.4.4.2 Pentamidina

A pentamidina (figura 11) é uma substância com uma estrutura aromática derivada de diamidina, na qual se apresenta tóxica para vários protozoários e mostra-se útil no tratamento de pacientes com leishmaniose, onde por algum motivo o tratamento com antimoniais não obteve sucesso (RATH et al, 2003).

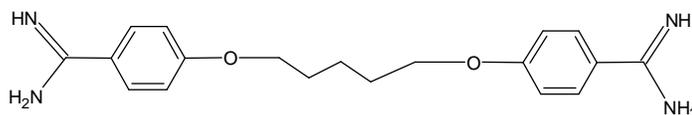


Figura 11: Estrutura química da Pentamidina

Os mecanismos de ação da pentamidina ainda não foram completamente elucidados, porém sabe-se que este fármaco interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto (PAULA et al., 2003). A teoria mais aceita tem sido a inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP et al, 2005).

Brasil (2007) alerta que, devido à ação deste fármaco no metabolismo da glicose, pode haver hipoglicemia seguida de hiperglicemia quando do seu uso. O paciente deve ser orientado a alimentar-se anteriormente e permanecer em repouso 15 minutos antes e após as injeções. O mecanismo da resposta bifásica ainda não está esclarecido, podendo ocorrer

indução de citólise das células beta do pâncreas e, conseqüentemente, diabetes *melitus* tipo 1. O efeito diabetogênico parece ser cumulativo e dose dependente. As reações adversas mais frequentes são: dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia.

2.2.4.4.3 Miltefosina

Outra opção terapêutica, é a miltefosina (figura 12), uma droga anti-neoplásica utilizada via oral e que mostrou atividade contra a *Leishmania* spp. em estudos *in vitro* e *in vivo* podendo ser a primeira droga de combate à leishmaniose visceral por via oral (RATH et al., 2003).

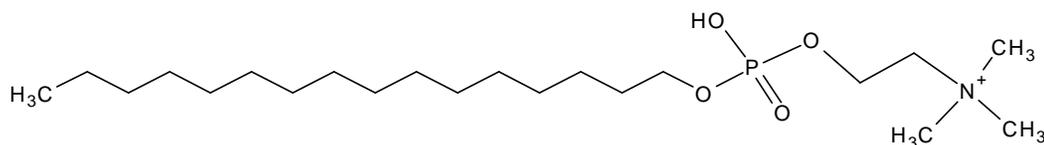


Figura 12: Estrutura química da miltefosina

Os efeitos colaterais mais frequentes da miltefosina são gastrintestinais, tais como anorexia, náusea, vômitos (38%), e diarreia (20%). A maioria dos episódios é breve e o tratamento pode ser continuado. Quando os efeitos colaterais são graves, requer a interrupção do tratamento. Alergia na pele, elevadas concentrações das transaminases hepáticas e, raramente, insuficiência renal pode ser observada. A administração da miltefosina deve ser feita após as refeições, e, no caso de doses múltiplas, essas devem ser divididas (WHO, 2010).

Miltefosina é potencialmente teratogênico e não deve ser utilizado por mulheres grávidas ou com possibilidade de engravidar para quem contracepção adequada não pode ser assegurada durante o tratamento e até 3 meses depois (WHO, 2010).

2.2.4.4.4 Alopurinol

O alopurinol (figura 13) é uma opção de uso no combate às leishmanioses. Suas principais vantagens são a via de introdução que é oral e sua baixa toxicidade. Porém há inúmeros relatos de que seu uso não foi eficaz como controle das leishmanioses (RATH et al., 2003).

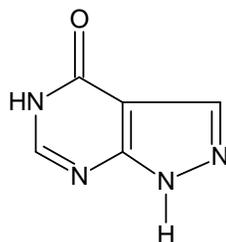


Figura 13: Estrutura química Alopurinol

De acordo com Denerolle e Bourdoiseau (1999), este fármaco é muito utilizado no protocolo terapêutico da LV, geralmente associado ao glucantime por possuir efeito apenas inibitório do crescimento de *Leishmania* spp. Sua toxicidade quando comparada aos antimônios e a via de administração oral são características que favorecem seu uso. No entanto, os resultados obtidos na monoterapia com alopurinol ou mesmo em associação não tem se mostrado eficaz na cura da LV canina.

Opperdoes e Michels (2011) afirmam que “apesar do fato de que várias drogas estejam disponíveis para o tratamento das leishmanioses, novos e melhores medicamentos são urgentemente necessários. A maioria dos medicamentos disponíveis é cara, requer regimes de tratamento longo e está se tornando mais e mais ineficaz.”.

Diante deste cenário, torna-se urgente a busca por novas drogas, destacando-se de forma promissória os fitoterápicos como alternativa no tratamento da leishmaniose visceral humana e canina, devido à inexistência de drogas sintéticas capazes de promover a total eliminação do parasita em cães, pois as atuais drogas alcançam apenas a cura clínica (NAKAMURA, 2006).

2.3 Plantas Medicinais

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas como medicamento ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

A utilização de plantas para fins terapêuticos é conhecida pelo homem desde a pré-história. Pois estiveram presentes durante boa parte da história da humanidade, como maior e mais importante aliada no combate a vários tipos de enfermidades e males sofridos pelo homem (GOMES et al., 2007; SOUZA; RIBEIRO, 2008). Portanto, a utilização de plantas como fonte de propriedades medicamentosas é tida como opção na busca de soluções

terapêuticas de fácil acesso e apresentam alto índice de eficácia (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

Oliveira e Araújo (2007) afirmam que “apesar das pesquisas científicas que têm como objetivo a validação do uso de plantas serem ainda recentes, as práticas relacionadas ao seu uso são o que muitas comunidades têm como alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde”.

De uma maneira geral, a expansão da fitoterapia e do uso de plantas medicinais se deve ao fato de haver uma crescente validação científica das propriedades terapêuticas de espécies vegetais, aliado ao baixo preço destes produtos e também aos efeitos adversos associados ao uso de fármacos convencionais (MOREIRA et al., 2010).

Nos últimos anos, têm-se observado um grande aumento nos estudos que comprovam o conhecimento da população sobre plantas medicinais, visto que na medicina popular é muito vasto o número de plantas utilizadas para fins terapêuticos. Acredita-se que 80% da população use as plantas como recurso terapêutico (SILVA; CECHINEL FILHO; 2002).

O isolamento da morfina a partir da *Papaver somniferum* (papoula-dormideira) em 1803 pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner deu início ao processo de extração de princípios ativos de plantas. A partir daí, o princípio ativo de outras plantas foram isolados, como a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona spp* (quina verdadeira) em 1819 e a atropina da planta *Atropa belladonna* (belladona) em 1831 que passaram a substituir os extratos vegetais da época (TUROLA; NASCIMENTO; 2006).

Atualmente, 25% dos fármacos empregados nos países industrializados são oriundos de produtos naturais, evidenciando a oportunidade de países em desenvolvimento que apresentam extensa biodiversidade vegetal, como é o caso do Brasil, entrarem para o mercado de fármacos e suplementos alimentares (FUNARI; FERRO, 2005).

Outro fator importante é a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o combate às doenças consideradas negligenciadas (tuberculose, doença de Chagas, malária, esquistossomose e leishmaniose) que atingem principalmente países em desenvolvimento. Sendo estas enfermidades pouco atraentes para as grandes indústrias farmacêuticas devido às populações destes países representarem apenas 20% do consumo global de medicamentos (FUNARI; FERRO, 2005). Neste cenário, diversas plantas têm sido testadas frente aos agentes causadores destas doenças, principalmente contra os protozoários.

Albernaz e colaboradores (2010) testaram a atividade de 217 extratos de 27 espécies de plantas do Cerrado brasileiro contra protozoários e fungos, dos quais, onze

extratos pertencentes a oito espécies apresentaram atividade significativa e destas, *Calophyllum brasiliense* (guanandi), *Diospyros hispida* (olho de boi) e *Spiranthera odoratissima* (manacá) apresentaram atividade leishmanicida.

2.4 Plantas com atividade leishmanicida

Diversas plantas são utilizadas na medicina popular para combater a leishmaniose. Dentre estas, várias espécies tiveram comprovação científica de atividade leishmanicida (DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008; ALBERNAZ et al., 2010; RONDON et al., 2011; VILANOVA et al., 2011; TELES et al., 2011, ACCIOLY et al., 2012). Outras espécies, mesmo que utilizadas no combate a outras enfermidades, quando testadas contra *Leishmania* spp. apresentaram bons resultados, mostrando-se promissoras para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas (MESQUITA et al., 2005).

2.4.1 Produtos vegetais com atividade leishmanicida

Vários metabólitos secundários de plantas apresentam atividade leishmanicida comprovada, dentre esses, destacam-se grupos: quinonas, alcaloides, terpenóides e acetogeninas (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

2.4.1.1 Quinonas

As quinonas naturais e sintéticas são um grupo de substâncias que apresentam potentes e diversos tipos de atividades biológicas como antitumorais, moluscidas, leishmanicidas, anti-inflamatórias, antifúngicas, tripanocidas, antiprotozoárias e inibidoras da transcriptase reversa, enzima do vírus HIV-1 (ALVES, 2008).

Hazra e colaboradores (1997) isolaram a diospirina, um derivado bis-naftoquinona a partir da casca de *Diospyros montana* (Ebenaceae) e relataram a atividade leishmanicida deste composto contra a forma promastigota de *L. donovani* com um MIC de 1 µg/mL, porém contra amastigotas, a diospirina não mostrou atividade. Posteriormente, Ray e colaboradores (1998) relataram que a ação desta quinona contra *L. donovani* ocorre devido à sua ligação com a enzima topoisomerase I do protozoário, inativando a enzima, ou por meio da estabilização da topoisomerase do complexo DNA-binário.

2.4.1.2 Alcalóides

Alcalóides são compostos pertencentes a um grupo de metabólitos secundário de plantas (principalmente). São compostos orgânicos heterocíclicos, que possuem um ou mais nitrogênios em seu esqueleto carbônico e tem uma gama de aplicações principalmente na produção de fármacos naturais. Alcaloides sempre foram usados pela humanidade, principalmente pelos alquimistas que apesar de não conhecerem suas estruturas químicas, conheciam suas propriedades farmacológicas (SANTOS, 2011).

Diversos pesquisadores citam o uso biológico dos alcalóides como antiparasitários (TEMPONE et al, 2005; CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUEZ, 2001). Dentre estes, pode-se exemplificar, anti-malária (*Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*), leishmanicida (*Leishmania* spp.), combate à Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), anti-helmíntica (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*) e outros (ANISZEWSKI, 2007).

Um alcaloide benzilisoquinólico, o *O*-metilarmepavino isolado das folhas de *Annona squamosa* apresentou CI_{50} de 23,3 e 25,4 $\mu\text{g/mL}$ contra promastigotas e amastigotas de *L. infantum chagasi*, respectivamente e citotoxicidade contra células de mamíferos com CI_{50} 79,7 $\mu\text{g/mL}$. Apesar da relativa toxicidade para células de mamíferos, este alcaloide apresentou uma pequena especificidade para o protozoário, com IS (índice de seletividade) de 3,42 e 3,13 para promastigota e amastigota respectivamente, o que aponta um possível potencial para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas (VILA-NOVA et al., 2011).

2.4.1.3 Terpenóides

Os terpenóides formam um grande grupo com estruturas bastante diversas derivadas das unidades isoprênicas C_5 . Estão subdivididos em seis classes: Iridoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e saponinas (CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUEZ, 2001). Na biossíntese, três moléculas de Acetil-CoA formam o ácido mevalônico. A descarboxilação e desidratatação do ácido mevalônico formam o isopentenil pirofosfato que se condensa com dimetilalil pirofosfato para dar origem aos monoterpenos (C_{10}) e assim por diante são formados os outros terpenos (MORAIS, 2012).

Chan-Bacab e Pena-Rodriguez (2001) citam diversos estudos que comprovam a atividade leishmanicida dos seis grupos de terpenóides. A atividade leishmanicida de um

triterpeno extraído do fruto do *Combretum leprosum*, o 3 β ,6 β ,16 β -triidroxilup-20(29)-eno, demonstrou uma excelente atividade contra *L. amazonensis* (TELES et al., 2011). Um sesquiterpeno poligodial foi isolado a partir do fracionamento do extrato hexânico da casca do caule de *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) e foi avaliado contra promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. amazonensis*, apresentando-se moderadamente ativos com valores de IC₅₀ entre 34,8 e 62,11 $\mu\text{g/mL}$ (TARIKU et al. 2011).

2.4.1.4 Compostos fenólicos

Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides. Morais (2005), conceituou flavonóides como compostos formados pela condensação dos ácidos cinâmicos com 3 unidades de malonil-CoA. A estrutura química de um flavonóide apresenta as unidades C₆-C₃-C₆, sendo dois anéis benzênicos (C₆) ligados pela unidade C₃ que pode formar um ciclo ou não.

O extrato do mesocarpo fibroso dos frutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae) apresenta grande quantidade de polifenóis. Mendonça-Filho e colaboradores (2004) avaliaram o efeito leishmanicida *in vitro* deste extrato contra *L. amazonensis* e relataram que o mesmo extrato apresentou CIM de 10 $\mu\text{g/mL}$, o que mostra a atividade leishmanicida dos polifenóis.

Através de fracionamento biomonitorado do extrato de *Mimulus bigelovii* (Phrymaceae) foram isolados flavonoides geranilados, flavanovas e flavonas, que se mostraram ativos contra *L. donovani* com CI₅₀ entre 4,8 e 14,6 $\mu\text{g/mL}$ (SALEM et al., 2011).

2.4.1.5 Acetogeninas

Acetogeninas são substâncias naturais encontradas nas cascas, raízes e, principalmente, em sementes de espécies da família Annonacea. Apresentam como característica principal, um esqueleto constituído de 32 a 34 átomos de carbono, contendo um anel γ -lactônico, geralmente α,β -insaturado e um, dois ou três anéis tetrahydrofurânicos, que podem ser adjacentes ou não (SANTOS et. al., 1994).

Grandic e colaboradores (2004) avaliaram a atividade leishmanicida de dose acetogeninas isoladas de *Annonaceae* spp. contra promastigota de *L. donovani*. Os valores de CI₅₀ encontrados, variam de 4,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a 47,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Três acetogeninas extraídas de Annonaceas, uma de *A. squamosa* e duas de *A. muricata* (annonacinona e corossolona) apresentaram atividade leishmanicida frente a *L. infantum chagasi*. A acetogenina de *A. squamosa*, a corossolona e a annonacinona apresentaram valores de CI_{50} de 26,4, 25,9 e 37,6 $\mu\text{g/mL}$ para promastigotas e 25,3, 28,7 e 13,5 contra amastigota respectivamente (VILA-NOVA et al., 2011). Em outro estudo, Vila-Nova e colaboradores (2013) mostraram que as acetogeninas corossolona e annonacinona, extraídas de *A. muricata* também apresentaram atividade frente à promastigotas de *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. major*, com valores de CI_{50} de 18,73, 18,64 e 16,14 para a corossolona e 7,66 8,00 e 6,72 $\mu\text{g/mL}$ para a annonacinona respectivamente.

2.4.2 Estudos *in vitro*

Muitos estudos realizados *in vitro* com diversas espécies de plantas apresentaram atividade promissora contra *Leishmania* spp. Alguns destes são apresentados na tabela 1. Porém, a maioria dos estudos relatados é voltada para promastigotas, as quais são encontradas no vetor, sendo que o estudo com amastigotas é clinicamente mais relevante, uma vez que esta é a forma predominante infectante em mamíferos.

Dos trabalhos que apresentaram os melhores resultados *in vitro*, destacam-se os de Mesquita et al. (2005), Dua et al. (2011), Rondon et al. (2011) e Accioly et al. (2012).

Em um estudo que testou a atividade leishmanicida e antitripanossomal de plantas do Cerrado brasileiro, os extratos de sete espécies vegetais utilizadas para tratar diversas enfermidades, apresentaram boa atividade contra *L. donovani*, agente etiológico da leishmaniose visceral na África Ocidental, Índia e China. Destas, destacou-se a *Cacearia sylvestris* (erva-de-lagarto) que apresentou CI_{50} entre 0,1 a 11,4 $\mu\text{g/mL}$ contra *L. donovani*, dependendo do solvente e da parte da planta usados (MESQUITA et al., 2005).

Rondon et al. (2011) testaram vários extratos de plantas contra *L. infantum chagasi*, dos quais os extratos de acetato de etila e metanólico da *Aloe vera* apresentaram excelente atividade, com CI_{50} de 1,49 e 1,54 $\mu\text{g/mL}$ contra promastigotas e 1,038 e 79,82 $\mu\text{g/mL}$ frente amastigotas respectivamente. Outro estudo realizado pela mesma equipe, com frações de *Spondias mombin* (cajazeira) e *Musa paradisiaca* (banana prata) *in vitro* contra *L. chagasi*, relataram atividade leishmanicida de algumas frações, mostrando o potencial destas espécies para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos como alternativa para o combate à leishmaniose (tabela 1) (ACCIOLY et al., 2012).

Tabela 1: Efeito leishmanicida *in vitro* de plantas

Planta	Leishmanias spp.	CI ₅₀ µg/mL		Autor(es)
		Promastigota	Amastigota	
<i>Acanthospermum hispidum</i> ()	<i>L. mexicana</i>	11,1*	-	Bero et al. (2011)
<i>Aloe vera</i> (babosa)	<i>L. infantum chagasi</i>	1,49 e 1,54*	1,038 e 79.82*	Rondon et al. (2011)
<i>Annona crassiflora</i> (araticum-do-Cerrado)	<i>L. donovani</i>	13,7 a 12,4*	-	Mesquita et al., (2005)
<i>Casearia sylvestris</i> (erva-de-lagarto)	<i>L. donovani</i>	0,1 a 11,4*	-	Mesquita et al., (2005)
<i>Combretum leprosum</i> (mufumbo)	<i>L. amazonensis</i>	24,8	-	Teles et al., (2011)
<i>Copaifera reticulata</i>	<i>L. infantum chagasi</i>	7,88	0,52	Rondon et al. (2012)
<i>Coriandrum sativum</i> (coentro)	<i>L. infantum chagasi</i>	3,18 e 7,10*	0,57 e 27,334	Rondon et al. (2011)
<i>Diospyros hispida</i> (olho de boi)	<i>L. infantum chagasi</i>	18,9	-	Albernaz et al. 2010
<i>Gustavia elliptica</i> (general, castanharana)	<i>L. brasiliensis</i>	6,4	-	Almeida et al. (2011)
	<i>L. guyanensis</i>	7,7	-	
<i>Himatanthus bovatus</i> (pau-de-leite e/ou janaguba)	<i>L. donovani</i>	7,5	-	Mesquita et al., (2005)
<i>Hyptis lacustris</i>	<i>L. amazonensis</i>	-	10,0	Céline et al. (2009)
<i>Julocroton triqueter</i>	<i>L. amazonensis</i>	29,5	-	Bezerra et al. (2006)
<i>Lantana</i> spp.	<i>L. amazonensis</i>		10,0	Céline et al. (2009)
<i>Leucas cephalotes</i> (Gumba)	<i>L. donovani</i>	-	3,96	Dua et al. (2011)
<i>Lippia sidoides</i> (alecrim-pimenta)	<i>L. infantum chagasi</i>	19,76	5,07	Rondon et al. (2012)
<i>Musa paradisíaca</i> (bananeira)	<i>L. infantum chagasi</i>	1,7 e 1,83*	16.54 e 14.18	Accioly et al. (2012)
<i>Pterodon emarginatus</i> (sucupira branca)	<i>L. amazonenses</i>	46,65	-	Dutra et al. (2009)
	<i>L. infantum chagasi</i>	> 100	-	
<i>Ricinus communis</i> (mamona)	<i>L. infantum chagasi</i>	2,85 e 3,45*	17,28 e 17,32*	Rondon et al. (2011)
<i>Serjania lethalis</i> (timbó)	<i>L. donovani</i>	5,2	-	Mesquita et al., (2005)
<i>Spondias mombin</i> L (cajazeira)	<i>L. infantum chagasi</i>	11,26	0,61 e 0,67*	Accioly et al. (2012)
<i>Viola canescens</i> (vanafsha)	<i>L. donovani</i>		0,4	Dua et al. (2011)

*Variando de acordo com a parte da planta e do solvente usados.

As espécies *Maytenus apurimacensis* (DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008), *Calophyllum brasiliense* (guanandi), *Diospyros hispida* (olho de boi) e *Spiranthera odoratissima* (manacá) (ALBERNAZ et al, 2010) apresentaram atividade frente à *Leishmania* spp.

Em estudo realizado com plantas medicinais usadas por índios Tapebas do Ceará, Morais et al. (2005) relataram duas espécies: a *Kalanchoe brasiliensis* (courama) e a *Plumbago scandens* (louco) que são usadas popularmente no combate a tumor e dor de dente respectivamente e que tiveram atividade leishmanicida comprovada. A *K. brasiliensis* tem função comprovada contra a leishmaniose cutânea, além de função imunomoduladora e antiinflamatória (IBRAHIM et al., 2002) e a *P. scandens* apresentou em seus componentes, a naftoquinona plumbagina, que demonstrou atividade leishmanicida, além de anticâncer e bactericida, sendo esta substância também efetiva contra insetos (PAIVA et al., 2004).

As espécies *Byrsonima crassifolia* (orelha de veado) (PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007), *Calophyllum caledonicum* (árvore de Santa Maria) (BILLO et al., 2005), *Conocarpus scoparioide* (vassourinha do brejo) (WENINGER et al., 2011), *Hiamatanthus sucuuba* (agoniada) (CASTILLO et al., 2007), *Piper hispidum* (aperta-ruão) e *Tabernaemontana sananho* (sanango) (ESTEVEZ et al., 2007) também apresentaram atividade contra *Leishmania* spp.

Estudos mais detalhados sobre os metabólitos secundários da *M. paradisiaca*, para determinar seus principais componentes, assim como testá-los frente à *Leishmania* spp. são necessários para que se possa desenvolver novos fármacos a partir dos constituintes químicos desta espécie, que é relatada por Chan-Bacab e Peña-Rodríguez (2001) como alternativa ao combate à leishmaniose na medicina popular.

2.4.3 Estudos *in vivo*

Estudos realizados *in vivo* ainda representam uma minoria das pesquisas voltadas para a atividade leishmanicida de compostos naturais. De acordo com Rondon (2011), estudos sobre a atividade leishmanicida de plantas *in vivo*, utilizando camundongos Balb/c e hamster, como modelos experimentais, não têm obtido resultados semelhantes aos *in vitro*, em alguns estudos. Os resultados de alguns estudos *in vivo* estão expostos na tabela 2.

Tabela 2: Efeito leishmanicida *in vivo* de plantas

Planta	Animal	<i>Leishmanias</i> spp.	Redução da carga parasitária	Autor(es)
<i>Aloe vera</i>	Balb/C	<i>L. donovani</i>	> 90% no fígado, medula óssea e baço	Dutta et al. (2008)
<i>Copaifera reticulata</i>	Hamsters	<i>L. infantum</i> <i>chagasi</i>	40,0 a 74,7% no baço*; 58,8 a 80,2 no fígado*	Rondon (2011)
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Balb/C	<i>L. amazonensis</i>	Reduziu o tamanho das lesões	Patrício et al. (2008)

*Variando de acordo com a dose (50 ou 100µg/mL) e com o período de tratamento (D45 e/ou D90).

2.5 Material vegetal

Duas espécies de plantas foram estudadas para verificar a atividade leishmanicida *in vitro*, são elas: *M. paradisiaca* (banana prata) e *A. occidentale* L. (cajueiro). Destas, foram usados à casca da banana e o líquido da casca da castanha do caju respectivamente.

2.5.1 *Anacardium occidentale* L.

A espécie *A. occidentale* L. (figura 14) é a principal representante do gênero *Anacardium*, que possui 11 espécies descritas na literatura. O caju (*A. occidentale* L.), além de ser muito conhecido pelo sabor e valor nutricional de suas amêndoas e pedúnculos (pseudofruto), é uma cultura de grande importância sócio-econômica para o Brasil. A amêndoa e o líquido da casca da castanha do caju (LCC) são os principais produtos de exportação (SANTOS; MAGALHÃES, 1999). O pedúnculo apresenta elevado teor de vitamina C e grande valor nutricional, entretanto, o aproveitamento ainda é insignificante em relação à quantidade da matéria-prima potencialmente disponível nesta região do país (AGOSTINI-COSTA et. al., 2004).

No Brasil, o uso do cajueiro na medicina popular, é relatado para diversas aplicações como analgésico, diurético, líquido para higiene bucal, tratamento de astenia, problemas respiratórios, gripe, bronquite, tosse, escorbuto infantil, eczema, infecções genitais, sarna, doenças de pele, verrugas, feridas (MAZZETTO et al. 2009), diabetes, dor de garganta, aftas, cólicas intestinais, fraqueza do organismo e debilidade muscular (BOSCOLO; SENNA-VALLE, 2008). Diversas atividades desta espécie, já foram comprovadas: antiinflamatória (MATOS, 1998); adstringente (MOTA et al., 1985); antimicrobiana (HIMEJIMA; KUBO, 1991; PEREIRA et al., 2010) e antitumoral (KUBO et al., 1993).



Figura 14: *Anacardium occidentale* L.

Fonte: Google imagens

O fruto do cajueiro, popularmente conhecido como castanha de caju, possui casca coriácea lisa, mesocarpo alveolado. A amêndoa está localizada na parte mais interna da castanha e é constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, que compõem a parte comestível do fruto, revestida por uma película em tons avermelhados (MAZZETTO et al. 2009). A castanha é comestível depois de assada e muito apreciada em outros países como tira-gosto e na produção de doces. Em alguns desses países, a castanha é consumida até mesmo crua e exerce uma grande competitividade com a produção de nozes, amendoins, avelãs, pistaches, entre outras. A elas são atribuídas propriedades tônico-excitantes, úteis contra a impotência e na debilidade decorrente de grandes enfermidades (AGRA et al., 2007).

O mesocarpo é repleto de um líquido escuro quase preto, cáustico e inflamável, chamado de LCC ou *cashew nut shell liquid* (CNSL) como é conhecido internacionalmente. O LCC tem uso industrial (resinas e freios) e medicinal (antissépticos e vermífugos). Existem várias possibilidades de exploração desta matéria-prima, no entanto, são concentradas em segmentos de baixo valor agregado. O parque industrial do agronegócio do caju no Brasil é composto por 12 empresas, sendo distribuídas em três estados do nordeste: 8 no Ceará, 3 no Rio Grande do Norte e 1 no Piauí e concentra-se na exportação da amêndoa de castanha de caju. Juntas, essas empresas têm capacidade de processar até 360 mil toneladas/ano de castanha, gerando 70 mil toneladas de amêndoas e 45 mil toneladas de LCC por ano (MAZZETTO et al. 2009).

De acordo com os mesmos autores, no mercado internacional, o LCC tem sido adquirido e utilizado no processamento do óleo e na produção de resinas e polímeros. Por outro lado, os preços do LCC são muito variados e dependem exclusivamente da política adotada pelo cartel das multinacionais, oscilando a um valor médio irrisório quando se consideram suas potencialidades. Por outro lado, a mão-de-obra nos países produtores concorrentes é considerada barata e à busca por fontes renováveis como matéria-prima alternativa à petroquímica, fazem da estratégia de valorização do LCC uma perspectiva bastante atrativa, o que pode indicar que poderão ser alcançadas maiores rentabilidades com os derivados do LCC.

2.5.2 Componentes químicos do LCC

As principais características do LCC são sua viscosidade, cor castanha escura e ação caústica, que impregna o mesocarpo da castanha sendo liberado no processamento para obtenção da amêndoa (CHAVES et al., 2010). O LCC compõe aproximadamente 25% do peso da castanha. Este líquido é uma das fontes mais ricas de lipídeos fenólicos não-isoprenoides de origem natural (MAZZETTO et al. 2009). Seus constituintes são ácidos anacárdicos (figura 15A), cardanolis (figura 15B), cardóis (figura 15C) e 2-metilcardóis (figura 15D). Estes compostos apresentam uma cadeia lateral alifática de quinze carbonos na posição meta em relação à hidroxila, contendo de zero a três insaturações localizadas em C-8' (monoeno), C-8' e C-11' (dieno) e C-8', C-11' e C-14' (trieno) (CHAVES et al., 2010).

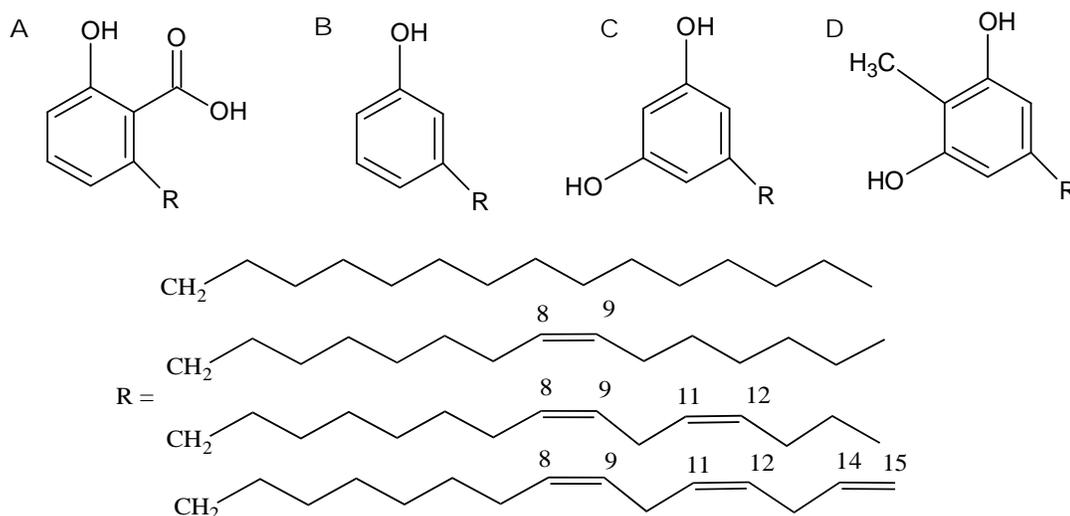


Figura 15: Principais Constituintes do LCC: A: Ácido Anacárdico; B: Cardanol; C: Cardol e D: 2-metilcardóis.

Porém, a percentagem dos compostos do LCC é variável, oscilando de acordo com sua origem e o processo de extração (tabela 3) (GEDAM; SAMPATHKUMARAN, 1986; MAZZETTO et al. 2009). Se a extração é realizada a temperaturas entre 180-200 °C, como adotada no processo industrial, resulta na descarboxilação do ácido anacárdico conduzindo ao cardanol, componente maioritário neste processo, conhecido como LCC técnico, enquanto que na extração a frio, o ácido anacárdico é o principal constituinte do LCC (TYCHOPOULOS; TYMAN, 1990).

Tabela 3: Composição química do LCC natural e LCC técnico

Componentes Fenólicos	LCC natural (%)	LCC técnico (%)
Ácido Anacárdico	71,70 – 82,00	1,09 – 1,75
Cardanol	1,60 – 9,20	67,82 – 94,60
Cardol	13,80 – 20,10	3,80 – 18,86
2-Metilcardol	1,65 – 3,90	1,20 – 4,10
Componentes minoritários	2,20	3,05 – 3,98
Material polimérico	----	0,34 – 21,63

Fonte: Mazzetto et al. (2009).

Os ácidos anacárdicos são compostos fenólicos biosintetizados a partir de ácidos graxos. Eles constituem grande parte do LCC natural, sendo que, em tais concentrações, apresentam propriedades cáusticas e irritantes (DIÓGENES et al., 1996).

As propriedades biológicas do ácido anacárdico fazem do pseudofruto do caju uma fonte promissora de compostos bioativos, cujo aproveitamento poderá vir a ser estimulado. Estudos futuros sobre a ingestão dietética do ácido anacárdico, nas concentrações encontradas nos pedúnculos de caju, podem abrir caminho para a confirmação da atuação deste composto na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Estas propriedades poderão inserir perspectivas para exploração do pedúnculo de caju como alimento funcional, evitando-se as perdas ocorridas, reforçando-se o valor nutricional na alimentação da população em geral e favorecendo o desenvolvimento econômico e social, principalmente, na região Nordeste do Brasil (AGOSTINI-COSTA et. al., 2004).

2.5.3 *Musa paradisiaca*

A espécie vegetal *M. paradisiaca* pertencente à família Musaceae, conhecida popularmente como bananeira, é encontrada em todo o Brasil, sendo nativa ou cultivada para

fins principalmente alimentares, pois seu fruto, a banana, apresenta grande valor nutricional, sendo amplamente consumido. É encontrada em todas as regiões tropicais do mundo e tem grande importância econômica em vários países em desenvolvimento. Em termos de produção, dentre os alimentos de colheita, o fruto desta espécie (figura 16) é o quarto mais importante do mundo, ficando atrás apenas do arroz, do trigo e do milho (OLIVEIRA, 2007). De acordo com a mesma autora, a *M. paradisiaca*, foi primeiramente descrita em sua morfologia e taxonomia por Linnaeus em 1753 em sua obra '*Species Plantarum*'.



Figura 16: Fruto da *Musa paradisiaca*

A *M. paradisiaca* apresenta valor farmacológico. Os frutos e as outras partes da planta são usados para tratar diferentes doenças em humanos na medicina tradicional (IMAM; AKTER, 2011). Historicamente seu uso é relatado contra gripe, asma, bronquite, inflamações em geral e diarreia (ALBUQUERQUE et al., 2007), úlceras e queimaduras (AGRA et al., 2007), diabetes, disenteria, hemorragia, febre, gangrena, gota, cefaléia, insônia, sífilis, icterícia, tuberculose, convalescença, desnutrição, feridas, verrugas, reumatismo, e como antihipertensivo e antihelmíntico (NGO et al., 2012), leishmanicida (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001) e hemostático (WEREMFO et al., 2011).

De acordo com Chan-Bacab e Peña-Rodrigues (2001), a casca e o fruto da *M. paradisiaca* são usados na medicina tradicional no combate às leishmanioses. Diversos estudos relatam a presença de triterpenos em *Musa* spp. (AKIHISA et al., 1998; OLIVEIRA,

et al., 2008) e segundo Chan-Bacab e Peña-Rodríguez (2001), triterpenos apresentam atividade leishmanicida, o que justifica seu uso para este fim.

Os frutos verdes (imatuos) desta espécie são adstringentes e utilizadas para tratar diarreia. Suas folhas são usadas no combate à tosse e bronquite. As raízes podem deter hemoptise e possuem forte adstringência, assim como propriedades anti-helmínticas. A seiva pode ser utilizada para fins antiofídicos (ACCIOLY, 2009).

Estudos em animais demonstraram que o extrato etanólico de frutos verdes de *M. paradisiaca* apresenta atividade antiulcerogênica (COSTA et al., 1997; RAGHU et al., 2012). Outras ações incluem atividade antimicrobiana do extrato da raiz devido ao alto conteúdo de taninos (RAGHU et al., 2012) e hipocolesteremiante (SARASWATHI; GNANAM, 1997).

De acordo com Weremfo e colaboradores (2011), o sumo do caule de *M. paradisiaca* apresenta propriedade hemostática, reduzindo significativamente o sangramento e o tempo de coagulação, o que pode justificar ao menos parcialmente o uso desta planta no tratamento de hemorragia a partir de ferimentos.

Estudos citam diversos compostos químicos presentes na *M. paradisiaca*, dentre esses incluem-se taninos, eugenol, tiramina, compostos fenólicos, antocianinas, sais minerais e vitaminas A, C, B1, B2, B5; serotonina, levarterenol, dopamina (fruto maduro e casca); alcalóides, ferro, e esteróides como beta-sitosterol e estigmasterol (NGO et al., 2012).

Resultados obtidos por Oliveira e colaboradores (2008) mostram que os extratos lipofílicos da banana (*Musa* spp.) são uma importante fonte de fitosteróis, tais como esteróis livres, ésteres de estéril, e glucosídeos de estéril, que podem ser componentes bioativos para vários fins, tais como aplicações de alimentos funcionais e outros. Com destaque para os esteroides encontrados na casca da banana, que apresentando elevada quantidade de dois triterpenos cetônicos (31-norciclolaudenona e cicloeucaalenona).

2.6 Esteroides

Esteroides são compostos tetracíclicos de alta massa molecular. Os esteroides vegetais (fitosteróides) compreendem uma grande classe de compostos encontrados em diversas partes das plantas sendo, no reino vegetal, o equivalente ao colesterol entre os mamíferos. Estes compostos têm várias funções na planta, como precursores de hormonas e outros metabolitos secundários, bem como um papel importante no controle de processos metabólicos associados com a membrana, como os regulamentos da permeabilidade da membrana e fluidez, eventos de transdução de sinal e enzimas ligadas a atividade da

membrana (GÜL; AMAR, 2006). Quantidades muito pequenas mostram atividade biológica considerável, e pequenas variações na estrutura destas moléculas, resultam em grandes diferenças nos seus efeitos (LUZ, 2013). Há evidências de que alguns fitoesteróides são eficazes contra doenças cardiovasculares, reduzindo os níveis de colesterol sendo, por isso, considerados alimentos funcionais e usados atualmente em alguns alimentos industrializados (BECCEL, 2011). Os principais esteroides de plantas são os esteróis e os triterpenos.

2.6.1 Esteróis

Os esteróis são subgrupo dos esteróides e ocorrem naturalmente em plantas, animais e fungos (JINDAL; KUMAR, 2013). Sua estrutura contém um ou mais grupos -OH e nenhum grupo C=O. No reino vegetal, os esteróis são encontrados em diversas espécies e apresentam inúmeras funções, e assim como o colesterol em mamíferos, são essenciais para a formação e estabilização da estrutura da membrana celular da planta (LEI, 2000). Na área da saúde humana, quando utilizada terapeuticamente, fitoesteróis pode diminuir significativamente o colesterol, diminuindo o risco de doenças coronárias. No entanto numerosas outras vantagens têm sido atribuídas aos fitosteróis, como anti-inflamatórios, anticancerígenos e de proteção do sistema imunológico (QUILEZ et al., 2003). Não há estudos da atividade leishmanicida de esteróis relatados na literatura.

2.6.2 Triterpenos

Os triterpenos são esteroides pertencem a um grupo de metabólitos secundários produzidos exclusivamente por plantas. São sintetizados a partir do óxido de esqualeno (2,3 epoxi-esqualeno) e apresentam um esqueleto com 30 átomos de carbono (ARAÚJO, 2009). Apresentam atividade leishmanicida, porém alguns são tóxicos para macrófagos de mamíferos o que pode limitar seu uso (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). Em diversos estudos, a atividade de triterpenos contra espécies do gênero *Leishmania* foi testada e obtiveram-se resultados significativos (DELGADO-MÉNDEZ et al., 2008; TELES et al., 2011).

Dentre os triterpenos, incluem o ácido ursólico e betulinaldeído, encontrados na casca da *Jacaranda copaia* e na haste de *Dolioscarpus dentatus*, respectivamente. Ambos com atividade frente às formas amastigotas de *L. amazonensis*, porém este último é tóxico para os macrófagos peritoneais em ratos e o ácido ursólico apresenta atividade limitada *in vivo*. Dois

triterpenos obtidos a partir de folhas de *Celaenodendron mexicanum* (ácido (24Z)-3-oxotirucalla-7,24-dien-26-óico e o ácido *epi*-oleanólico) são efetivos contra a forma promastigotas de *L. donovani*. Uma provável explicação para a atividade leishmanicida destes compostos é a presença do grupo ácido carboxílico na sua estrutura, que pode estar relacionado à sua função (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

Lima e colaboradores (2009) descrevem a presença de seis triterpenos (acetato de *a*-amirina, cicloartenona, 3b,19a,23-triidroxi-urs-12-eno e os ácidos ursólico, 3-b-O-b-D-glicopiranosilquinóvico e 3b,6b,19a,23-tetraidroxi-urs-12-en-28-óico) isolados de extratos das folhas (CHCl₃), da casca do caule (CH₂Cl₂) e do caule de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae).

2.6.3 Esteroides de *Musa* spp.

Os esteroides são abundantes no fruto da banana. Porém diferem significativamente na quantidade de acordo com a parte do fruto. De 8 a 13% dos componentes lipofílicos (CL) da poupa da banana são esteroides, enquanto que na casca, os esteroides representam de 53 a 71% dos CL. Os principais esteroides da casca da banana (*Musa acuminata*) são duas cetonas triterpênicas (cicloeucaleanona e 31-norciclocloaudenona) (figura 17). Estes mesmos triterpenos têm sido encontrados em outras espécies de *Musa* na casca do fruto e em flores (OLIVEIRA et al., 2008).

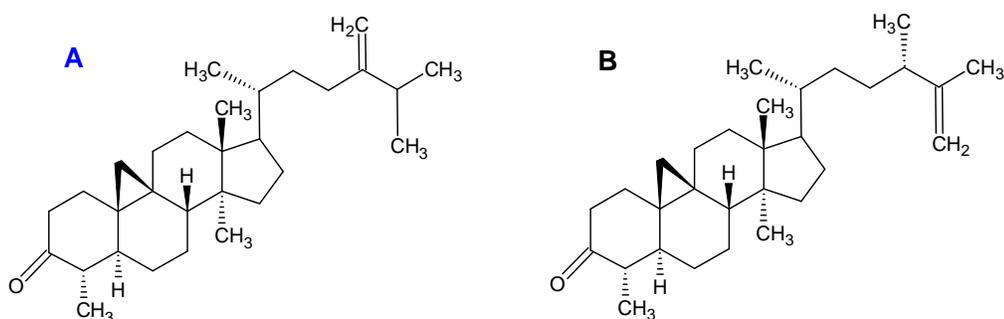


Figura 17: Dois principais triterpenos encontrados na casca da banana (*Musa* spp.). A: cicloeucaleanona e B: 31-norciclocloaudenona.

A casca da *Musa sapientum* apresenta boa quantidade de dois triterpenos: a cicloeucaleanona [24-metil-29-norcicloart-24(24¹)-en-3-ona] (figura 17A) e a ciclomusalenona [(24S)-24-metil-29-norcicloart-25-en-3-ona], sendo esta última, sinônimo da 31-

norcicloeucalenona (figura 17B) (AKIHISA et al., 1998). São encontrados também, triterpenos do grupo 3-oxi-28-norcicloartana: o 4-epicicloeucalenona [24-metil-28-norcicloart-24 (24)-en-3-ona] e o 4-epiciclomusalenone [(24S)-24-metil-28-norcicloart-25-en-3-ona] e cinco triterpenos cicloartanos (figura 18) (AKIHISA et al., 1998).

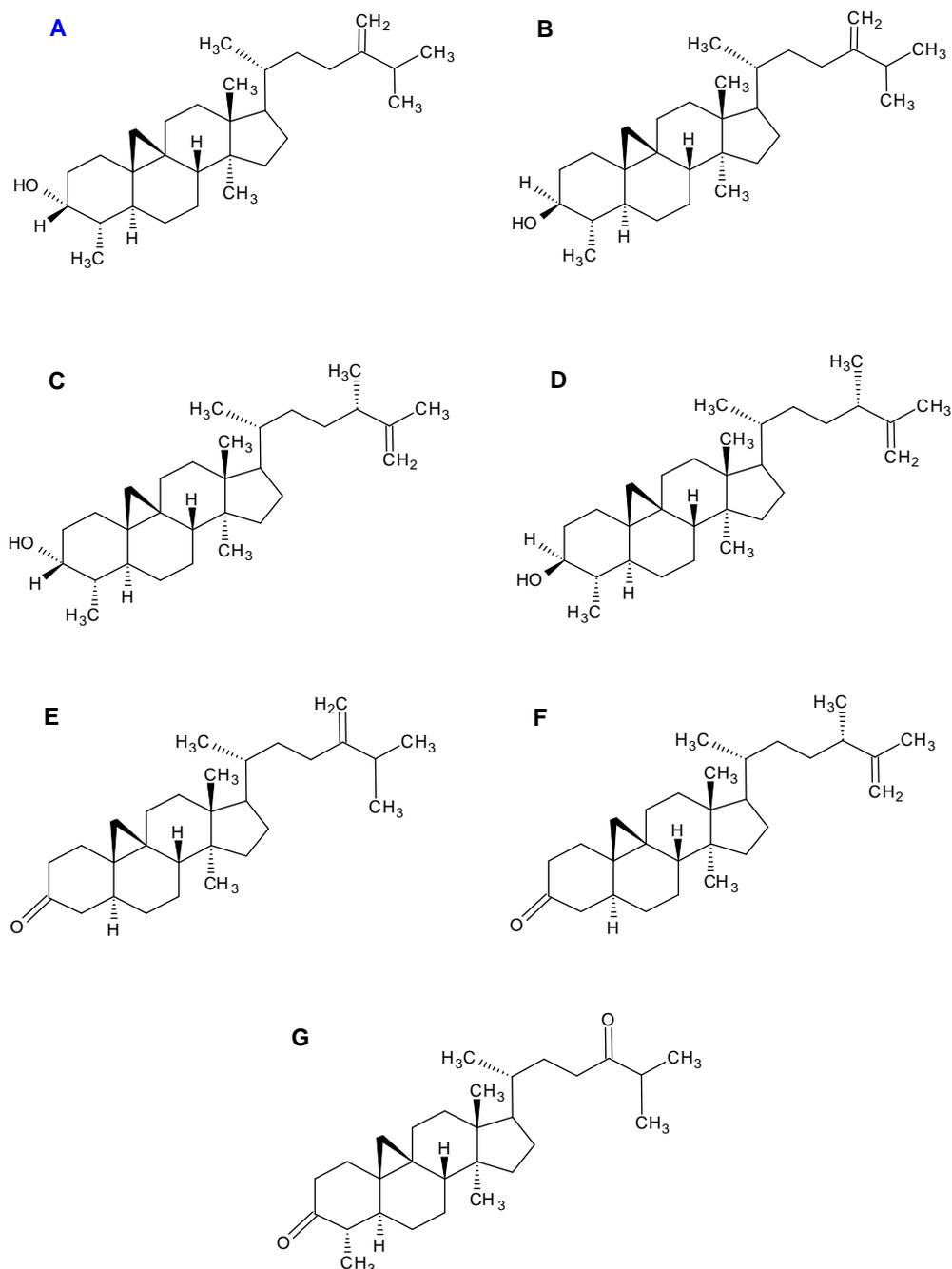


Figura 18: Triterpenos isolados da *M. sapietum*. A: 3-epicicloeucalenol; B: 3-epicicloeucalenol (isômero de A); C: 3-epiciclomusalenol; D: 3-epiciclomusalenol (isômero de C); E: ciclofolidona; F: 28-norciclomusalenona e G: 24-oxo-29-norcicloartanona.

Os principais esteróis encontrados na polpa da banana são o β -Sitosterol seguido pelo campesterol e estigmasterol (figura 19) (OLIVEIRA et al., 2008).

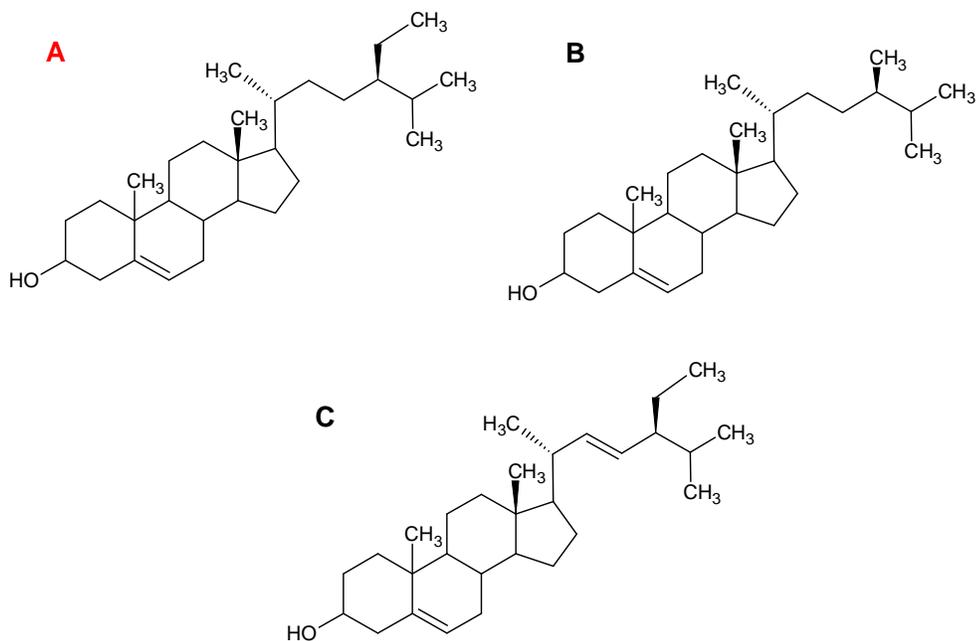


Figura 19: Esteróis de *Musa* spp. A: β -Sitosterol; B: campesterol e C: estigmasterol.

3 JUSTIFICATIVA

Varias doenças que acometem primordialmente os países em desenvolvimento, são consideradas negligenciadas por diversos aspectos, mas, principalmente, pela falta de auxilio na investigação de novas alternativas para o seu tratamento ou prevenção.

Entre essas doenças, encontra-se a leishmaniose, que consiste em uma zoonose endêmica que acomete pele, mucosas e vísceras.

Por apresentar alternativa à quimioterapia convencional, o uso de plantas medicinais e o interesse em suas propriedades antiparasitárias, inseticida e larvicida têm aumentado na área da medicina veterinária.

Neste sentido, triterpenos isolados da *M. paradisíaca* e o ácido anacárdico e seus derivados sintéticos, podem ser considerados como uma estratégia de combate ao parasita *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Triterpenos e esteróis isolados da *Musa paradisiaca* e ácido anacárdico e seus derivados sintéticos apresentam atividade frente à *Leishmania infantum chagasi*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida de esteróis e triterpenos isolados de *Musa paradisiaca* e do ácido anacárdico e seus derivados sintéticos contra *Leishmania infantum chagasi*.

5.2 Objetivos específicos

- Extrair triterpenos e esteróis da casca do fruto da *Musa paradisiaca*.
- Determinar a estrutura dos triterpenos e dos esteróis isolados por métodos espectroscópicos.
- Isolar o ácido anacárdico a partir do LCC.
- Sintetizar ácido anacárdico acetilado, anacardato de sódio e anacardato de sódio acetilado a partir do ácido anacárdico.
- Determinar a CL₅₀ dos compostos isolados contra *Artemia spp.*
- Determinar a CE₅₀ dos compostos isolados contra macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.
- Avaliar a atividade leishmanicida dos compostos isolados contra *Leishmania infantum chagasi*.

6 CAPÍTULO 1

Atividade leishmanicida e inibição da acetilcolinesterase do ácido anacárdico e seus derivados sintéticos

Leishmanicidal and acetylcholinesterase inhibiting activities of anacardic acid and its derivatives

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose caracterizada pela infecção de células do sistema fagocítico mononuclear por *Leishmania infantum chagasi*. O principal reservatório doméstico é o cão. O tratamento de cães com o uso de drogas sintéticas não demonstraram eficácia em reduzir a incidência da doença no homem. Na pesquisa por novos agentes leishmanicidas, o ácido anacárdico foi isolado a partir do líquido da casca de castanha de caju (LCC) e foi testado contra promastigotas e amastigotas de *L. infantum chagasi* em conjunto com três derivados sintetizados, ácido *O*-acetil-anacárdico, anacardato de sódio e *O*-acetil-anacardato de sódio. Os ensaios *in vitro* em promastigotas de *L. infantum chagasi* e a citotoxicidade em células RAW 264.7 foram determinados pelo método colorimétrico de MTT e o método de ELISA *in situ* foi utilizado contra amastigotas. Todos os compostos apresentaram atividade contra promastigota e amastigota semelhante à pentamidina e à anfotericina respectivamente, com exceção do anacardato de sódio acetilado que apresentou CE₅₀ acima de 100 µg/mL contra promastigota. A inibição da acetilcolinesterase sugere um possível mecanismo de ação.

Palavra-chave: Ácido anacárdico. LCC. *Leishmania infantum chagasi*.

Leishmanicidal and acetylcholinesterase inhibition activities of anacardic acid and derivatives

Antonio Adailson de Sousa Silva^a, Selene Maia de Moraes^{a,b*}, Pablito Augusto Travassos Ferreira^b, Sayonara de Melo Viana^c, Maria Jania Teixeira^c, Francisco Stefânio Barreto^d, Camila Aparecida de Carvalho^e, Roselaine Pereira Alvim Cardoso^e, Heitor Franco de Andrade Junior^e.

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Veterinárias - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

^bCurso de Química, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

^cDepartamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, CEP 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil

^dDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, CEP, 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brazil

^eInstituto de Medicina Tropical, Laboratório de Protozoologia, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 470, 05403-000, SP, São Paulo, Brazil

***Author for correspondence: E-mail:selenemaiademorais@gmail.com**

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease characterized by infection of cells of the mononuclear phagocyte system by *Leishmania infantum chagasi*. The main domestic reservoir is the dog. The treatment of dogs with the use of synthetic drugs has not shown efficacy in reducing the incidence of the disease in humans. In the search for new antileishmanial agents, anacardic acid was isolated from the cashew nut shell liquid (CNLS) and was tested against promastigotes and amastigotes of *L. infantum chagasi* in combination with three synthesized derivatives, *O*-acetyl-anacardic acid, sodium anacardate and sodium *O*-acetyl-anacardate. *In vitro* assays were performed with promastigotes of *L. infantum chagasi*, cytotoxicity in RAW 264.7 cells, determined by the MTT colorimetric method and against amastigotes the method *in situ* with ELISA was used. All compounds showed activity against promastigote and amastigote similar to pentamidine and amphotericin respectively, with the exception of *O*-acetyl-anacardate sodium salt, which showed EC₅₀ above 100 µg/mL against promastigote. The compounds exhibit inhibition of acetylcholinesterase suggesting a possible mechanism of action.

Keywords: Anacardic acid; CNSL; *Leishmania infantum chagasi*

1. Introduction

Currently, the therapeutic arsenal available for the treatment of leishmaniasis is very limited, being restricted to two lines of medicines: antimonial and non-antimonial (Gil et al., 2008), both have high toxicity and resistance (Tempone et al, 2005). Other factors which are drawbacks to conventional treatment are the routes of application, which are usually painful and uncomfortable and the fact that the drug must be given daily for long periods, which often requires hospitalization resulting in patient discomfort and high costs (Braga et al, 2007).

Many pieces of research are looking for new antileishmanial agents, and anti-neoplastic compounds represent new sources for discovering antileishmanial drugs, for example miltefosine, which has shown activity against *Leishmania* spp. *in vitro* and *in vivo* studies (Rath et al., 2003) and Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) which is used to treat a variety of solid tumors (Einhorn, 2002), has been reported as an antileishmanial agent against promastigotes and axenic amastigotes of *L. donovani* (Tavares et al., 2007). This drug significantly reduced parasite burden in BALB/c mice experimentally infected with *L. donovani* (Kaur et al., 2010). Focusing on natural antitumoral agents, annonaceous acetogenins exhibit remarkable anticancer activities (Dan and Wen, 2009) and they also exhibit antileishmanial action (Vila-Nova et al, 2011).

In this context, the anacardic acid, an abundant by-product of the cashew nut processing industry was chosen to be tested against *L. infantum chagasi* due to its antitumor properties (Kubo et al., 1986). The aim of this work was to evaluate *in vitro* anacardic acid and three synthetic derivatives against promastigotes and amastigotes of *L. infantum chagasi*, their cytotoxicity in mammalian cells as well as the potential to inhibit the enzyme acetylcholinesterase.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Cashew nuts were obtained from early dwarf cashew trees (*Anacardium occidentale* L.) kept in the germplasm bank of the EMBRAPA-Tropical Agroindustry Experimental Station in Pacajus, Ceará, Brazil.

2.2. Extraction and separation of CNLS constituents

Natural CNLS was left in contact with hexane for one week. Then hexane was eliminated in a rotary evaporator. CNLS constituents were obtained according to the following methodology developed by Paramashivappa et al. (2001). CNLS (100g) was dissolved in 5% aqueous methanol, and 50 g of calcium hydroxide was slowly added to the resulting solution. The calcium anacardate precipitate (110 g) was washed with methanol, filtered in a Buchner funnel and dried under vacuum at 45-50 °C for 2 h. 11M HCl (60 mL) was added to calcium anacardate (110 g) which was suspended in distilled water (440 mL), and stirred for 1 h. The resulting solution was extracted with ethyl acetate (2 x 100 mL) and the combined organic layers were washed with distilled water, dried with anhydrous Na₂SO₄ and evaporated. This process resulted in a 60 g yield of anacardic acid. The anacardic acid and derivatives were characterized by infrared spectrum.

2.3 Synthesis of sodium anacardate

Anacardic acid (1.43g) was dissolved in 15 mL of dichloromethane and stirred for 15 min. Then 0.164 g of sodium hydroxide was added while stirring. The reaction was monitored by thin layer chromatography. After completion of the reaction time, 30 ml of water was added while stirring and the pH was adjusted to result in a neutral solution. The material was transferred to a separator funnel and the organic fraction separated, rota-evaporated then

dissolved in water and lyophilized. The yield was 97.8%. The product was characterized by infrared spectrum.

2.4. Acetylation reaction

The methodology adopted for the acetylation of anacardic acid was based in Furniss et al (1989), with minor modifications. The compound (6g) was dissolved in a mixture of acetic anhydride (12g) and pyridine (4 g) while stirring. After 24 hours of reaction at room temperature, accompanied by thin layer chromatography (TLC), the formation of acetylated product was observed. The mixture was transferred to a beaker and 20 mL of ice water was slowly added. The solution was neutralized by addition of 5% HCl. The reaction mixture was transferred to a separator funnel and extracted with chloroform (20 ml) three times. The organic fraction containing acetylated material was washed with water (20 mL) three times and dried with anhydrous sodium sulfate. The solvent was evaporated under reduced pressure. The product was characterized by infrared spectrum.

2.5. Infrared spectra of compounds

The infrared spectra was obtained on a spectrometer Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 using UATR (Universal Attenuated Total Reflectance Accessory), in the frequency region 400-4000 cm^{-1} , belonging to the Laboratory of Mass Spectrometry (Northeast LEMANOR), Federal University of Ceará. Solid samples were placed directly on the zinc selenide crystal holder UATR, while the resinous samples were dissolved in chloroform and then placed on the crystal through a capillary.

2.6. Toxicity on *Artemia* spp.

Artemia spp. (Artemiidae), also known as brine shrimp larva, is an invertebrate normally used as a safe, practical and economic substitute assay to determine toxicity of

compounds from natural products (Barbosa et al., 2009). The lethality test against *Artemia* spp. was performed according to the method proposed by Meyer et al. (1982) with some modifications. Eggs of *Artemia* spp. were incubated in artificial seawater, at room temperature for 48 hours in a small aquarium. With the aid of a light source, the larvae were attracted to light and collected with a Pasteur pipette and transferred to a beaker with saline water. Extract solutions were prepared with the solvents methanol, dimethylsulfoxide (DMSO) and seawater in concentrations ranging from 10,000 to 1 µg/mL. 10 metanauplius were transferred to test tubes containing 5 ml each of the solutions tested. A control group was prepared containing only the solvent (DMSO and saline) and larvae. Assays were performed in triplicate. The number of dead larvae was counted after 24 hours and this number used for the calculation of LC₅₀ using the Probit analyze with the software SPSS Statistics 17.0.

2.7. In vitro tests against the promastigote of *L. infantum chagasi*

L. infantum chagasi IOCL2272 was obtained from a culture maintained in the Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil. The methodology used to evaluate the leishmanicidal activity of anacardic acid and its derivatives against promastigotes of *L. infantum chagasi* was based on Tempone et al. (2001). *L. infantum chagasi* were placed in Schneider (Sigma[®]) medium supplemented (gentamicin 40 mg/ml, 5% human male sterile urine and 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab[®]) and 10% PBS) with different concentrations of the compounds and the parasite in the absence of compounds (control). The compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted in Schneider medium (Sigma[®]). The final concentration of DMSO did not exceed 1%. The experiments were performed in 96-well plates with compounds at concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL. Promastigotes of *L. infantum chagasi* were used at 10⁶ parasites per well in logarithmic phase. The reference medicine used was

pentamidine. Negative controls were performed with 10^6 parasites in Schneider (Sigma[®]) medium supplemented without compounds. The promastigotes were incubated at 26 °C for 48 hours. Afterwards cell viability was examined based on the conversion of soluble tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5 diphenyltetrazolium bromide) (Sigma[®]) into insoluble formazan by mitochondrial enzymes. Twenty μ l of MTT [5 mg/mL] per well were added to the culture, kept for 4 hours at 26 °C. Thereafter, 100 μ l of a solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%: isopropyl alcohol (1:1) was added. After 15 minutes stirring the optical density in a spectrophotometer at 595 nm was read. Assays were performed in triplicate.

2.8. Tests in vitro against amastigotes of *L. infantum chagasi*

L. infantum chagasi IOCL2272 amastigotes were cultured with murine monocyte RAW 264.7 cells in 96-wells micro plates. Murine monocyte RAW 264.7 cells were counted in a Neubauer chamber and the concentration used was 1×10^6 cells/well and incubated at 37 °C for 6 hours. *L. infantum chagasi* promastigotes were added at a ratio of 10:1 parasites to cell. These cells were cultured in Dulbecco's (Cultilab[®]) plus 5% fetal bovine serum, sodium bicarbonate, and gentamicin (Inlab[®]) at a concentration of 40 mg/mL. The culture was maintained with 5% CO₂ at 37 °C. Subsequently, culture medium was removed by means of aspiration, and then the drugs were added at concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 and 1.56 μ g/mL in the micro plates containing the confluent layer of cells with amastigotes. The in situ immunoassay to determine the EC₅₀ was performed by ELISA according to Piazza et al. (1994). Before starting the tests, the infected cells were stained and parasites observed under a microscope. When more than 50% of infected cells in a microscopic field were observed, the parasite load was considered appropriate to perform the test. Briefly, after 18 h incubation with the compounds, the micro plate wells were incubated with 0.01% saponin

(Sigma–Aldrich[®]) in 1× PBS plus 1% bovine serum albumin (Sigma–Aldrich[®]) for 30 min at 37 °C. The blocking reaction was done with 1x PBS plus 5% skimmed milk (Nestle[®]) for 30 min at 37 °C. The microplates were washed and dried three times, then the serum from immunized rabbits was added, diluted 1:500 in 1× PBS followed by 3% skimmed milk 0.05% in Tween 20 (PBSLT) plus 10% FCS, and the plates were kept at 37 °C overnight. The conjugated anti-rabbit IgG (Sigma–Aldrich[®]) was diluted 1:10,000 in PBSLT and after further washing, orthophenylenediamine chromogen (OPD) (Sigma–Aldrich[®]) was added. In order to stop the reaction 4N HCl (Novaquímica[®]) was added, and the reading was performed using a 570nm filter in a microplate reader. The positive control for this assay was 40µg/mL amphotericin B (Sigma–Aldrich[®]) and the negative control was the Dulbecco medium alone (Cultilab[®]). The rabbits were immunized against promastigotes of *L. infantum chagasi* and the serum was obtained after 30 days of immunization.

2.9. Cytotoxicity in Mammalian Cells

Monocyte line cells from murine RAW 264.7 were used from a culture maintained in the Laboratory of Protozoology, USP, São Paulo. Anacardic acid and its synthetic derivatives were dissolved in DMSO and diluted in RPMI medium at a concentration of 200 µg/mL. After checking the viability, cells were detached and re-suspended in 2 mL Dulbecco medium. Cells were counted in Neubauer chamber and placed in a 96 well plate at a concentration of $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l/well}$. The plate was incubated for 6 hours at 37 °C. After this period, drugs were added to an initial concentration of 100µg/mL with serial dilutions (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.56 µg/mL). The negative control contained only cells and culture medium without drugs. For the positive control, cells were used, medium and SDS 10%. After 24 hours, 15 µl of MTT (5mg/mL) per well was added and the culture was

incubated for 4 hours at 37 °C. After this time 70 μ l of SDS 10% per well was added. After 2 hours reading was taken on a micro plate reader at 570 nm. Tests were performed in triplicate.

2.10. Qualitative antiacetylcholinesterase activity test

This test was performed on the basis of Rhee et al. (2001), with minor modifications. The solutions used were 5,5'-dithiobis 2nitrobenzoic (DTNB) iodide and acetylcholine (ATCI) in buffer. The samples (2 mg/mL) were applied in chromate plate. After evaporation of the solvent, the substrate was sprayed (ATCI, 1 mM in buffer) and Ellman's reagent (DTNB in buffer 1 mM). After 3 to 5 minutes the enzyme was sprayed (3U/mL) for 10 minutes and the plate developed yellow color. White halos appeared around the samples indicating inhibition. The halos were measured and compared with the standard, the alkaloid Physostigmine.

2.11. Statistical analyses

The EC₅₀ values (drug concentration able to inhibit 50% of parasites) with a confidence interval of 95% were calculated using a curve of non-linear regression using the statistical software GraphPad Prism 5.0. The entire experiment was performed in triplicate. For the calculation of LC₅₀ of the tested compounds in the *Artemia* spp. the Probit analyze of the statistical software SPSS Statistics 17.0 was used.

3. Results and discussion

The cashew nut shell liquid (CNLS) contains a variety of phenolic compounds (anacardic acids, cardanols, cardols and 2-metilcardols). These compounds have an aliphatic side chain of fifteen carbon atoms in the meta position relative to the hydroxyl, containing of zero to three unsaturations located at C-8' (monoeno), C-8' and C-11' (diene) and C-8', C-11'

and C-14' (triene) (Tyman et al., 1989). The anacardic acid exhibits several biological properties which led us to choose this molecule to be used against *L. infantum chagasi* and preparing derivatives, in the effort to find good leishmanicidal agents. Anacardic acid was submitted to acetylation and then to form respective sodium salt modifying the structure for testing against *L. infantum chagasi*. These derivatives were chosen to evaluate the role of two OH groups (phenol and carboxyl) on the activity of anacardic acid. The reaction was followed by thin layer chromatography, and the structures of compounds were confirmed by infrared spectroscopy, the results of which are shown in table 1. The main absorption bands of compounds are explained to confirm performed reactions. The presence of O-H from carboxylic acid moiety was shown as a broad band in 3500 - 2500 cm^{-1} , in 3009 the C-H cm^{-1} from aromatic ring, carbonyl groups of acetylated compounds absorb in 1737 and 1739 cm^{-1} and C=O from carboxylic acid between 1698 - 1645 cm^{-1} . In sodium anacardate, there is an absorption band in 3415 cm^{-1} of OH phenolic group and in acetylated sodium anacardate this peak is not present.

Table 1. Main Infrared spectrum bands due to main bonds of anacardic acids and derivatives, expressed in cm^{-1} .

Compounds	OH	=C-H	C-H side chain	C=O Ester group	C=O Carboxy group	C=C Aromatic ring	CH ₂ side chain	C-O
AA	3300- 2500	3009	2925 2854	-	1645	1607	1447	1247, 1207
AAA	3300- 2500	3009	2924 2854	1737	1698, 1661	1607	1452	1197
SA	3415	3009	2923 2853	-	1645	1583	1456	1248, 1220
SAA	-	3009	2924 2854	1739	1686, 1658	1606	1451	1200

AA = anacardic acid, AAA = acetyl-anacardic acid, SA = sodium anacardate, SAA = sodium acetyl-anacardate.

Figure 1 shows the structures of anacardic acid (A) and synthesized compounds: *O*-acetyl-anacardic acid (B), sodium anacardate (C) and sodium *O*-acetyl-anacardate (D).

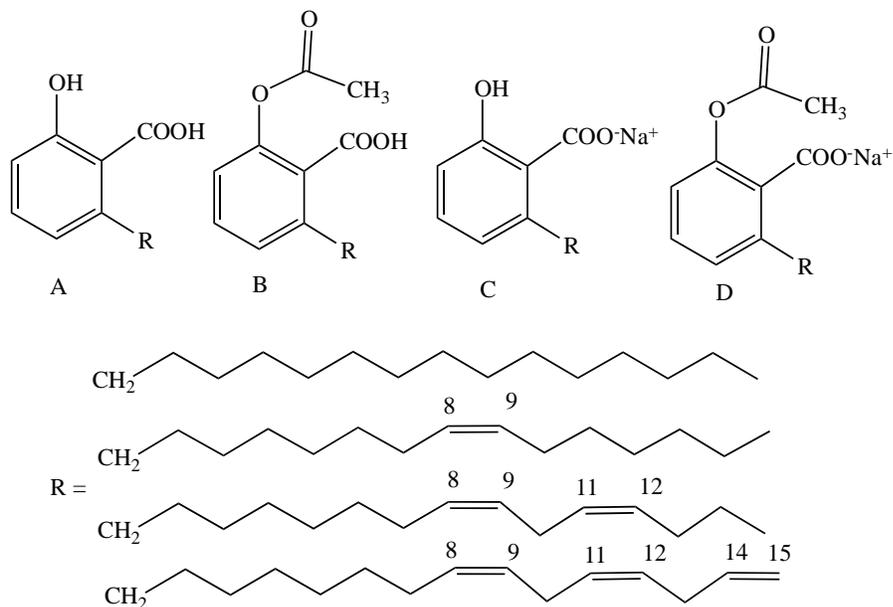


Figure 1. Representation of chemical structures of A: anacardic acid; B: *O*-acetyl-anacardic acid; C: sodium anacardate and D: sodium *O*-acetyl-anacardate.

The brine shrimp lethality test has been widely used in the medicinal plant research to evaluate its potential pharmacological activity and several studies have shown that these tests are effective in the search for antileishmanial agents (Barbosa et al., 2009). A compound is considered to have potential activity if LC₅₀ against *Artemia* spp. is below of 1,000 µg/mL (Meyer et al., 1982). Anacardic acid and their synthetic derivatives were subjected to bioassay toxicity against *Artemia* spp. and were considered active since their LC₅₀ was below 1,000 µg/mL (table 2). The anacardic acid showed an LC₅₀ value of 19.86 µg/mL, similar to sodium anacardate (14.01 µg/mL), revealing that the carboxyl OH group is not the main group responsible for activity. Acetylation of anacardic acid (*O*-acetyl-anacardic acid) reduced its activity, raising the LC₅₀ value of 19.86 µg/mL to 90.42 µg/mL. A similar result was obtained when sodium anacardate (LC₅₀ 14.01) was compared with sodium acetyl-anacardate (LC₅₀

75.48 $\mu\text{g/mL}$). Therefore, it can be seen that the phenolic OH group is more important for the toxic activity against *Artemia spp.*

According to Rath et al. (2003), one of the difficulties in the treatment of Leishmaniasis, is the high toxicity of current drugs. In this context, evaluating the toxicity of the studied compounds against murine RAW 264.7 cells, the medium inhibition EC_{50} values ranged from 73.94 to 78.33 $\mu\text{g/mL}$ (table 2), with no significant differences. Therefore, it can be seen that in RAW 264.7 cells, the acetylation or sodium salt formation did not change the toxicity of the compounds.

The results of the leishmanicidal activity of anacardic acid and its synthetic derivatives against *L. infantum chagasi*, are shown in table 3. In the test against promastigotes, the pentamidine was the standard drug used. The statistical analyses showed that all tested compounds presented similar activity to pentamidine with EC_{50} ranging from 53.84 to 76.84 $\mu\text{g/mL}$, except for sodium acetyl-anacardate, which showed EC_{50} values $> 100 \mu\text{g/mL}$. It can be concluded that both OH groups are involved in the activity on promastigote forms of *Leishmania*. Against the amastigotes, the results of the compounds tested were statistically similar to EC_{50} values between 61.22 and 74.83 $\mu\text{g/mL}$. These results were similar to those of amphotericin B, drug of first choice among non-antimony compounds. Therefore these results show that anacardic acid and derivatives are promising compounds for finding new antileishmanial drugs.

Table 2. Toxicity of anacardic acid and derivatives against mammalian cells and *Artemia* spp.

Compound	EC ₅₀ µg/mL (CI 95%)*	LC ₅₀ µg/mL (CI 95%)*
	cell RAW	<i>Artemia</i> spp.
Anacardic acid	76.70 (37.59 to 156.5) ^a	19.86 (12.77 to 30.96) ^a
<i>O</i> -acetyl-anacardic acid	73.94 (36.46 to 149.9) ^a	90.42 (52.39 to 157.16) ^b
Sodium anacardate	74.44 (39.28 to 141.1) ^a	14.01 (8.37 to 23.67) ^a
Sodium <i>O</i> -acetyl-anacardate	78.33 (38.63 to 158.8) ^a	75.48 (46.54 to 124.97) ^b

*Confidence interval 95%

^aSimilar letters means no statistical difference within the same column

Table 3. Antileishmanial activity and acetylcholinesterase inhibition of anacardic acid and derivatives

Compound	EC ₅₀ µg/mL <i>L. infantum chagasi</i>		AChE
	Promastigotes	Amastigotes	Inhibition
Anacardic acid	76.84 (59.58 to 99.10) ^a	72.76 (33.69 to 157.1) ^a	0.8 cm
<i>O</i> -acetyl-anacardic acid	69.95 (60.88 to 80.37) ^a	73.22 (40.10 to 133.7) ^a	0.7 cm
Sodium anacardate	53.84 (46.55 to 62.27) ^a	74.83 (29.38 to 190.60) ^a	0.8 cm
Sodium <i>O</i> -acetyl-anacardate	> 100*	61.22 (28.51 to 131.5) ^a	0.7 cm
Amphotericin B	-	32.23 (14.30 to 72.62) ^a	-
Pentamidine	23.71 (18.44 to 30.50) ^a	-	-
Physostigmine	-	-	0.9 cm

*Confidence interval 95%

(-) Not evaluated

^aSimilar letters means no statistical difference in the same column

*Not compared

The mechanisms of action of antileishmanial drugs are still poorly understood. However Rath et al. (2003) point out that one of the possible mechanisms of action of glucantime,

could be the inactivation of an enzyme present only in the amastigote form, a zinc-dependent metalprotease, essential for the development of *Leishmania*. According to Arthur and Bittiman (1998), the miltefosine, which is used in the treatment of leishmaniasis in India (*L. donovani*), probably act on the *Leishmania* with mechanisms of action similar to that on tumor cells, inducing apoptosis and altering cellular signaling pathways mediated by lipids. Moreover, Sung et al. (2008) reported that anacardic acid increased the apoptosis induced by chemotherapeutic drugs and cytokines in the neoplastic cells and genes that mediate inhibition of proliferation (cyclin D1 and cyclooxygenase-2), survival (Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, cIAP-1, and survivin), invasion (matrix metalloproteinase-9 and intercellular adhesion molecule-1) and angiogenesis (vascular endothelial growth factor) were also present.

The anacardic acid and derivatives were tested to verify their inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) by a colorimetric method on TLC plates (Rhee et al., 2001). Anacardic acid and sodium anacardate showed inhibition zones (0.8 cm) higher than correspondent acetylated compounds (0.7 cm), considering the inhibition zone control physostigmine (0.9 cm) as shown in table 3. The enzyme acetylcholinesterase inactivates acetylcholine by hydrolysis, resulting in acetyl group and choline. The role of AChE is to regulate the concentration of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) (Katzung, 2010). Phosphatidylcholine is the most abundant phospholipid in the plasma membrane and in the cytoplasm of *Leishmania*, and for the synthesis of this important lipid molecule, a choline precursor is necessary. The deficit of choline could affect the plasma membrane of the parasite (Zufferey and Mamoun, 2002). Vila-Nova et al. (2012) claim that the inhibition of acetylcholine indicates a possible mechanism of action for antileishmanial drugs. Anacardic acid and its synthetic derivatives showed inhibitory activity of AChE, and therefore the same hypothesis was assumed for their leishmanicidal activity.

4. Conclusions

Anacardic acid and its synthetic derivatives showed leishmanicidal activity against promastigote and amastigote forms of *L. infantum chagasi*. OH phenolic group is important for activity against promastigote forms and for amastogotes and it seems that overall molecule structure as a polar head and an apolar tail is more important. These positive results corroborate the hypothesis that antitumor drugs could be useful for visceral leishmaniasis. The inhibitory potential of these compounds against the enzyme acetylcholinesterase suggests a mechanism of action related to *Leishmania* membrane, which is dependent on choline. Therefore anacardic acid and prepared derivatives are potential compounds for the development of new antileishmanial drugs.

Acknowledgments

The authors thank the Federal University of Ceará, for spectroscopic analysis, and the agencies CNPq, FUNCAP and PPSUS for financial support.

References

- Arthur, G., Bittman, R., 1998. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. *Biochem. Biophys. Acta* 1390, 85-102.
- Barbosa, T.P., Junior, C.G.L., Silva, F.P.L., Lopes, H.M., Figueiredo, L.R.F., Sousa, S.C.O., Batista, G.N., Silva, T.G., Silva, T.M.S., Oliveira, M.R., Vasconcelos, M.L.A.A., 2009. Improved synthesis of seven aromatic Bayliss Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 1726–1730.

- Braga F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., Matos, M.O., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 111, 396-402.
- Dan, Z., XiaoWen, W. 2009. Anti-tumor effects of annonaceous acetogenins. *Journal of International Oncology*, 36, 649-652.
- Einhorn, L.H., 2002. Curing metastatic testicular cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 4592-95.
- Gil, E.S., Paula, J.R., Nascimento, F.R.F., Bezerra, J.C.B., 2008. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *J. Basic Appl. Pharmaceut. Sci.* 29, 223-230.
- Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smity, P.W.G., Tatchel, A.R., 1989. *Vogel's Text book of practical organic chemistry*, Longman Scientific & Technical, 1514p.
- Grazzini, R., Hesk, D., Heininger, E., Hildenbrandt, G., Reddy, C.C., Cox-Foster, D., Medford, J., Craig, R., Mumma, R.O., 1991. Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 775-780.
- Himejima, M., Kubo, I., 1991. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *J. Agric. Food Chem.* 39, 418-421.
- Katzung, B.G., 2007. *Farmacologia básica e clínica*. 10ª ed. Mc Graw-Hill, São Paulo.
- Kaur, S., Sachdeva, E., Dhuria, S., Sharma, M., Kaur, T., 2010. Antileishmanial effect of cisplatin against murine visceral leishmaniasis. *Parasitol. Intern.* 59, 62-69.
- Kubo, I., Kim, M., Naya, K., Komatzu, S., Yamagiwa, Y., Ohashi, K., Sakamoto, Y., Hirakawa, S., Kamikawa, T., 1987. Prostaglandin synthetase inhibitors from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. *Chem. Lett.* 16, 1101-1104.
- Kubo, I., Komatsu, S., Ochi, M., 1986. Mulluscocicides from the cashew (*Anacardium occidentale*) and their large-scale isolation. *J. Agric. Food Chem.* 34, 970-973.

- Kubo, I., Masamitsu, O., Vieira, P.C., Sakai, K., 1993. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *J. agric. Food Chem.* 41, 1012-1015.
- Kubo, I., Masuoka, N., Hat, J., Tsujimoto, K., 2006. Antioxidant activity of anacardic acids. *Food. Chem.* 99, 555-562.
- Meyer, B.N., Ferrigini, N.R., Putnan, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Mclaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45, 31-34.
- Morais, T.C., Pinto, N.B., Carvalho, K.M., Rios, J.B., Ricardo, N.M., Trevisan, M.T., Rao, V.S., Santos, F.A., 2010. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chem. Biol. Interact.* 183, 264-269.
- Paramashivappa, R., Kumar, P.P., Vithayathil, P.J., Rao, A.S., 2001. Novel method for isolation of major phenolic components from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2548-2551.
- Rath, S., Trivelin, L.A., Imbrunito, T.R., Tomazela, D.M., Jesús, M.N., Marzal, P.C., Andrade Júnior, H.F., Tempone, A.G., 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado de arte. *Quím. Nova* 26, 550-555.
- Rhee, I.K., Meen, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R., 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatog.* 915, 217-223.
- Silva, J.G.D., Werneck, G.L., Cruz, M.S.P., Costa, C.H.N., Mendonça, I.L., 2007. Infecção Natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Terezina, Piauí, Brasil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 23, 1715-1720.

- Soares-Bezerra, R.J., Leon, L., Genestra, M., 2004. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Braz. J. Pharmaceut. Sci.* 40.
- Sung, B., Pandey, M.K., Ahn, K.S., Yi, T., Chaturvedi, M.M., Liu, M., Aggarwal, B.B., 2008. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 111, 4880-4891.
- Tavares, J., Quaiassi, M., Quaiassi, A., Cordeiro-da-Silva, A., 2007. Characterization of anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin: An anticancer drug. *Acta Trop.* 103, 133-141.
- Tempone, A.G., Andrade, H.F., Spencer, P.J., Lourenco, C.O., Rogero, J.R., Nascimento, N., 2001. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its l-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 280, 620-624.
- 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 alkaloid-producing families. *Phytomedic.* 12, 382-390.
- Toyomizu, M., Nakai, Y., Nakatsu, T., Akiba, A.Y., 2003. Inhibitory effect of dietary anacardic acid supplementation on cecal lesion formation following chicken coccidial infection. *Anim. Sci. J.* 74, 105-109.
- Tyman JHP, Johnson RA., Muir M, Rokhgar R 1989. The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). *J Am Oil Chem Soc* 66: 553-557.
- Vila-Nova, N.S., Morais, S.M., Falcão, M.J.C., Bevilaqua, C.M.L., Rondon, F.C.M., Wilson,

- M.E., Vieira, I.G.P., Andrade, H. F., 2012. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 1164-1168.
- Vila-Nova, N.S.; Morais, S.M.; Falcão, M.J.C.; Machado, L.K.A.; Beviláqua, C.M. L.; Costa, I.R.S.; Brasil, N.V.G.P.S.; Andrade Júnior, H.F., 2011. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 44, 567-571.
- WHO, 2010. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26.
- Zufferey R., Mamoun, C.B., 2002. Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125, 127-134.

7 **CAPÍTULO 2**

Atividade de triterpenos e esteróis isolados da casca do fruto da *Musa paradisiaca* contra *Leishmania infantum chagasi*

Activity of triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum chagasi*

RESUMO

Importância etnofarmacológica: O objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida de triterpenos e esteróis isolados da casca do fruto da *Musa paradisiaca*, banana prata, tradicionalmente utilizada para tratar de leishmaniose.

Material e métodos: Os compostos foram isolados a partir do extrato etanólico da casca do fruto de banana por cromatografia de coluna e a estrutura química foi determinada por análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear, principalmente de hidrogênio e carbono 13. Nos testes *in vitro* foram avaliadas a citotoxicidade em células RAW 264,7 e LLC-MK₂ e atividade leishmanicida contra *L. infantum chagasi*, utilizando o método colorimétrico de MTT para determinar a CE₅₀ em promastigotas e em células de mamíferos e o método de ELISA *in situ* foi utilizado no teste contra amastigotas.

Resultados: Foram caracterizados cinco compostos, sendo identificados três triterpenos: cicloeucalenona, 31-norciclolaudenona e 24-metileno-cicloartanol e uma mistura de dois esteróis: beta-sitosterol e estigmasterol. Com exceção da cicloeucalenona, todos os compostos apresentaram atividade estatisticamente semelhante à pentamidina contra promastigota. Enquanto que contra a amastigota, apenas a 31-norciclolaudenona apresentou atividade inferior à anfotericina B. Todos os compostos tiveram baixa citotoxicidade em células de mamíferos.

Conclusão: Este estudo justifica em parte o uso de *M. paradisiaca* na medicina popular no combate à leishmaniose. Trabalhos *in vivo* são necessários para comprovar a sua eficácia.

Palavras-chave: Esteróis. Triterpenos. *Leishmania infantum chagasi*.

Activity of triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum chagasi*

Antonio Adailson de Sousa Silva^a, Selene Maia de Moraes^{a,b}, Maria José Cajazeiras Falcão^b, Sayonara de Melo Viana^c, Maria Jania Teixeira^c, Francisco Stefânio Barreto^d, Camila Aparecida de Carvalho^e, Roselaine Pereira Alvim Cardoso^e, Heitor Franco de Andrade Junior^e.

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brazil

^bCurso de Química, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brazil

^cDepartamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brazil

^dDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brazil

^eInstituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

***Author for correspondence: E-mail:selenemaiademorais@gmail.com**

Abstract

Ethnopharmacological relevance: The aim of the study was to evaluate *in vitro* the antileishmanial activity of triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* (banana) fruit peel used traditionally to treat leishmaniasis.

Materials and methods: The compounds were isolated from the ethanolic extract of the peel of the banana fruit by column chromatography. The chemical structure of compounds was determined by ^1H and ^{13}C - nuclear magnetic resonance spectroscopy. The cytotoxicity was measured in RAW 264.7 cells and LLC-MK2. Leishmanicidal activity against *L. infantum chagasi* promastigotes was performed by the MTT colorimetric method and activity against amastigotes was assayed in mammalian cells using *in situ* ELISA method.

Results: Five compounds were identified, consisting of three triterpenes: cycloeucalenone, 31-norcyclolaudenone and 24-methylene-cicloartanol and a mixture of two sterols: beta-sitosterol and stigmasterol. With the exception of cycloeucalenone, all compounds showed activity against promastigote statistically similar to pentamidine. While, when acting against amastigotes, only 31-norcyclolaudenone showed activity lower than amphotericin B. All compounds showed low cytotoxicity in mammalian cells.

Conclusion: This study partially confirms the use of *Musa paradisiaca* in folk medicine against Leishmaniasis. Further *in vivo* studies are necessary to evaluate the efficacy.

Keyworld: Sterols. Triterpenes. *Leishmania infantum chagasi*.

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by at least 17 species of the protozoan of the genus *Leishmania*. Human leishmaniasis is distributed worldwide, however it is located mainly in tropical and subtropical areas, is endemic in more than 98 countries, with a prevalence of 12 million cases and an annual incidence of 0.5 million cases of visceral leishmaniasis (VL) and 1.5 million cases of cutaneous leishmaniasis (CL). Worldwide, there are an estimated 70, 000 deaths each year and 350 million people are at risk of infection (WHO, 2010). The most severe form of the disease is visceral leishmaniasis, which is caused in the Americas by *L. infantum chagasi* (Silva et al., 2007). In Northeastern Brazil there are many places where leishmaniasis is endemic with several lethal cases among humans and dogs. A change was observed in relation to the urbanization of this disease, which in the past occurred only in the countryside but nowadays affects large urban centers (Lindoso and Goto, 2006).

The available therapeutic arsenal for the treatment of leishmaniasis, as well as other tropical diseases, is quite precarious (Gil et al., 2008). The drugs of first choice for the treatment of all forms of leishmaniasis are based on pentavalent antimony (meglumine antimoniate and sodium stibogluconate). However its clinical use has several limitations. Such compounds must be administered parenterally, by means of intravenous or intramuscular injection, daily over a period of 20-40 days, which frequently leads to side effects (Frézard et al., 2005). Other therapeutic options are miltefosine, paromomycin (aminosidine) and pentamidine (WHO, 2010). However, all these drugs have side effects and are also unsatisfactory (García et al., 2012).

The use of medicinal plants and studies on the chemistry and pharmacology of natural products grew considerably in the second half of the 20th century (Albuquerque et al., 2007). Many compounds derived from natural sources have pharmacological activities and can be

used for the development of leishmanicidal drugs. Several compounds isolated from plants, such as terpenoids, sterols, flavonoids, alkaloids, phenolics and naphthoquinones have been studied to evaluate their effects on *Leishmania* spp. (Chan-Bacab and Peña-Rodríguez, 2001). Some of these substances can be found in the fruit peel of *Musa* spp. (Akihisa et al., 1997; Oliveira et al., 2008). Tannins rich fractions of ethanol extract from *M. paradisiaca* leaves were shown to display leishmanicidal activity but high cytotoxicity (Accioly et al. 2012). The use of *M. paradisiaca* fruit peel in folk medicine to combat leishmaniasis was reported by Weigel et al. (1994). Subsequently, in an attempt to validate this use, compounds isolated from the fruit peel of *M. paradisiaca* were tested against *L. infantum chagasi*.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

A bunch of unripe “silver” bananas (*M. paradisiaca*) was acquired in the local market in Fortaleza, Ceará, Brazil.

2.2 Preparation of ethanol extract of banana peel

The peel of unripe banana fruit was removed, minced and placed to dry at 40 °C for a period of one week. Subsequently, this material was ground and placed in commercial ethanol (70%) for one week. Then, the solution was filtered and the solvent ethanol was removed in a rotary evaporator, yielding the ethanol extract of banana peel (EEBP). Subsequently, the EEBP was subjected to a filtering column using solvents of increasing polarity level, hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol and water. The solvent of each organic phase was evaporated to obtain the extracts (Pizzolatti et al., 2003).

2.3 Isolation of the compounds by chromatographic methods

The EEBP was subjected to column chromatography on silica gel (δ 0,063 – 0,200 mm; 70-230 mesh). The columns had varying lengths and sizes in proportion to the sample and eluents of P.A. grade were used in order of increasing polarity: hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. Thin layer chromatography (TLC) was performed using GF 254 silica gel 60 on glass slides, forming the chromatographic plate. The development of the TLC plates was made by spraying with vanillin 2.5% solution of perchloric acid in ethanol (1:1) followed by heating in an oven at about 100 °C.

2.4 Structural determination of the isolated compounds

The chemical structures of the purified compounds were confirmed by spectroscopic analysis of the nuclear magnetic resonance spectra recorded on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer, in CDCl₃.

2.5 Cultivation of *L. infantum chagasi*

Promastigotes of *L. infantum chagasi* strain IOCL2272 (Department of Pathology/UFC) were grown in Schneider (Sigma[®]) medium supplemented with gentamicin 40 mg/mL, 5% human male sterile urine and 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab[®]). Cultures were maintained in a BOD incubator at 23.6 °C and transplanting was done every three to four days.

Amastigotes of *L. infantum chagasi* strain IOCL2272 were cultured with the murine monocyte cell line RAW 264.7 (Sigma–Aldrich[®]) in 96 well microplates. Cells were counted in a Neubauer chamber and plated at a density of 1×10^6 cells/well. Promastigotes were added at a ratio 10:1 parasites/cell. Cells were cultured in Dulbecco's medium (Cultilab[®]) with 5% FCS, sodium bicarbonate, and 40 mg/mL gentamicin. Bottles were left open and cultivated

under glass with 5% CO₂ at 37 °C. After 24 hours, the amastigotes inside the monocyte cells were observed under inverted microscope.

2.6 Assays on *L. infantum chagasi* promastigotes

The methodology used to evaluate the leishmanicidal activity of sterols from *M. paradisiaca* against promastigote and amastigote of *L. infantum chagasi* IOCL2272 was based on Tempone et al. (2005). The sterols and triterpenes were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted in Schneider medium (Sigma®). The final concentration of DMSO did not exceed 1%. *L. infantum chagasi* were placed in the Schneider (Sigma®) medium supplemented (gentamicin 40 mg/ml, 5% human male sterile urine and 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab®) and 10% PBS) with different concentrations of the drug and the parasite in the absence of the drug (control). The experiments were performed in 96-well plates with compounds at concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL. Promastigotes of *L. infantum chagasi* were used at 10⁶ parasites/well in logarithmic phase. The reference medicine used was pentamidina. Negative controls were performed with 10⁶ parasites in Schneider (Sigma®) medium supplemented without compounds. The promastigotes were incubated at 26 °C for 48 hours. Afterwards cell viability was examined based on the conversion of soluble tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5 diphenyltetrazolium bromide) (Sigma®) into insoluble formazan by mitochondrial enzymes. Twenty µL of MTT [5 mg/ml] per well were added to the culture, and then kept for 4 hours at 26 °C. Thereafter, 100 µL of a solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) 10%: isopropyl alcohol (1:1) was added. After 15 minutes stirring a reading was made of the optical density in a spectrophotometer at 570 nm. Assays were performed in triplicate.

2.7 Assays on *L. infantum chagasi* amastigotes

The medium was removed by aspiration, and the drugs were dissolved in DMSO, diluted in RPMI and were added at concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 and 1.56 $\mu\text{g/mL}$ in the microtiter plate containing confluent layer of cells with amastigotes. The in situ immunoassay to determine the EC_{50} ELISA was performed according to Piazza et al. (1994). Before starting the tests, the infected cells were stained and parasites observed under a microscope. When more than 50% of infected cells in a microscopic field were observed, the parasite load was considered appropriate to perform the test. Briefly, after 18 h incubation with the compounds, the microplate wells were incubated with 0.01% saponin (Sigma–Aldrich[®]) in 1 \times PBS plus 1% bovine serum albumin (Sigma–Aldrich[®]) for 30 min at 37 °C. The blocking reaction was made with 1 \times PBS plus 5% skimmed milk (Nestle[®]) for 30 min at 37 °C. The microplates were washed and dried three times, then the serum from immunized rabbits diluted 1:500 in 1 \times PBS was added, followed by 3% skimmed milk 0.05% in Tween 20 (PBSLT) plus 10% FCS, and the plates were kept at 37 °C overnight. The conjugated anti-rabbit IgG (Sigma–Aldrich[®]) was diluted 1:10,000 in PBSLT and after further washing, orthophenylenediamine chromogen (OPD) (Sigma–Aldrich[®]) was added. In order to stop the reaction 4N chloric acid (Novaquímica[®]) was added, and the reading was performed using a 570nm filter in a microplate reader. The positive control for this assay was 40 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B (Sigma–Aldrich[®]) and the negative control was the Dulbecco medium alone (Cultilab[®]). The rabbits were immunized against promastigotes of *L. infantum chagasi* and the serum was obtained after 30 days of immunization.

2.8 Cytotoxicity to mammalian cells

RAW 264.7 and LLC-MK₂ cell were cultured in 96-well plates at a concentration of 10⁶ cells per well in RPMI medium containing 10% of modified PBS at 37 °C and 5% CO₂. After

48 hours, the medium was changed and incubated with the extracts at different concentrations under the same conditions. After 24 hours, cell viability was determined by MTT assay. 20 μ l of MTT solution (5 mg/ml in PBS) was added to each well and incubated for 3 hours at 37 °C and 5% CO₂. Subsequently, the medium was aspirated and the culture was added 100 μ l of DMSO. The absorbance was determined with a spectrophotometer at a wavelength of 570 nm.

2.9 Statistical analysis

The EC₅₀ values, drug concentration able to inhibit 50% of parasites, with a confidence interval of 95% were calculated using a non-linear regression curve using the statistical software GraphPad Prism 5.0. The entire experiment was performed in triplicate.

3. Results and discussion

The peel, sap and fruit of *M. paradisiaca* are used in folk medicine in the treatment of leishmaniasis in an endemic area of leishmaniasis in northwestern Ecuador (Weigel et al., 1994). The main compounds present in *Musa* spp. are sterols and triterpenes (Oliveira et al. 2008), and similarly to cholesterol in mammals, they are essential in the formation and stabilization of cell membrane structure of the plant (Law, 2000). The steroids have numerous other functions in plants, as precursors of hormones and other secondary metabolites, as well as playing an important role in the control of metabolic processes associated with the membrane, such as regulating membrane permeability and fluidity, signal transduction events and membrane bound enzymes activity (Gül and Amar, 2006). In human health, phytosterols can significantly decrease serum cholesterol when used therapeutically, decreasing the risk of coronary diseases. However numerous other benefits have been attributed to the phytosterols, such as being anti-inflammatory, anti-carcinogenic, and protective of immune systems (Quilez et al., 2003).

The chemical composition of the lipophilic extracts of unripe pulp and peel of banana fruit 'Dwarf Cavendish' (*Musa acuminata*) was determined by gas chromatography - mass spectrometry. In banana peel, sterols represent about 49–71% of the lipophilic extract with two triterpene ketones (31-norcyclolaudenone and cycloeucalenone) as the major components (Oliveira et al, 2008). Previous studies reported the isolation of several triterpenes such as cyclomusalenol, cyclomusalenone, 24-methylenecycloartanol, stigmast-7-methylenecycloartanol, stigmast-7-en-3-ol, lanosterol and beta-amyrin. Cycloartane triterpenes such as 3-epicycloeucalenol, 3-epicyclomusalenol, 24-methylenepollinastanone, 28-norcyclomusalenone, 24-oxo-29-norcycloartanone have been also isolated from the fruit peel of *M. sapientum* (Imam and Akter, 2011).

Cycloartane-type triterpenes were isolated from the nonsaponifiable lipids obtained from the methanol extract of the fruit peel of *Musa sapientum* L. (banana). Their structures were found to be 3-epicycloeucalenol (1), 3-epicyclomusalenol (2), 24-methylenepollinastanone, 28-norcyclomusalenone and 24-oxo-29-norcycloartanone by spectroscopic and chemical methods (Akihisa et al, 1998).

It was performed a silica gel column chromatography of ethanol extract of the unripe banana peel. The solvents were used in mixtures of increasing polarity, starting with hexane then hexane/chloroform, chloroform, chloroform/ethyl acetate, ethyl acetate/methanol, methanol. The fractions (125 mL) were collected and solvents were eliminated in a rotary evaporator. TLC plates were used to compare dry fractions and then four main compounds were separated - from hexane fraction, a compound C1 was obtained, from fraction collected with hexane/chloroform compound C2, chloroform/ethyl acetate furnishes C3 and from ethyl acetate/methanol, fraction C4 was isolated. The structure of C1 and C2 present an important signal in ¹HNMR spectrum, a double doublet at 0.4 ppm and 0.6 ppm ($J = 3.75$ Hz) characteristic of a cyclopropene ring present in cycloartane triterpenes common compounds

isolated from banana peel and C=O absorptions in 213 ppm. C1 presents a double bond with absorption bands at 150.2 ppm (C-25) and 109.1 ppm (C-27). A double bond in 156.9 ppm (C-24) and 106.0 ppm (C-31) was defined for C2. The comparison of overall peaks of ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra with literature data (Ragasa et al., 2007) led us to identify C1 as 31-norcyclolaudenone and C2 as cycloeucalenone (Khuonghuu et al., 1975). C3 fraction showed two double bonds (140.98 ppm of C-5 and 121.94 ppm of C-6; 138.52 ppm and 129.54 ppm of C-20 and C-21, respectively) a carbinolic carbon C-3 at 72.06 ppm characteristics of stigmasterol (Chaturvedula and Prakash, 2012), nevertheless four methyl signals at 12.08, 12.20, 12.27 and 12.44 and many other doubled peaks indicates the presence of β -sitosterol, therefore C3 is a mixture of these two steroids, already mentioned in *Musa* species (Oliveira et al., 2008). In the ^1H NMR spectrum, compound C4 showed a cyclopropane ring, due to two broad singlets at 0.38 ppm and 0.56 ppm (C-19), a terminal double bond at 4.69 ppm and several singlets (0.81, 0.84, 0.87, 0.94, 1.0, 1.02), which characterize a cycloartane type triterpene. In the ^{13}C NMR spectrum, a carbinolic C-3 at 79.0 ppm, a double bond at 156 ppm (C-24) and 106 ppm (C-28) and several other peaks in the Csp³ region correspond to the triterpene 24-methylenecycloartanol, when compared with literature data (Ahmed et al., 2008). This compound is also common in banana peel. The representations of chemical structures of *M. paradisiaca* compounds are shown in figure 1.

C3 was determined to be a mixture of stigmasterol and beta-sitosterol, nevertheless this second steroid presents no relevant leishmanicidal activity (Accioly et al., 2012). Stigmasterol has antimicrobial activity (Rocha et al., 2008) and showed good antitumor activity in murine (Ghosh et al., 2011) and a possible mechanism of action for this activity may be the activation of protein phosphatase 2A ceramide causing apoptosis.

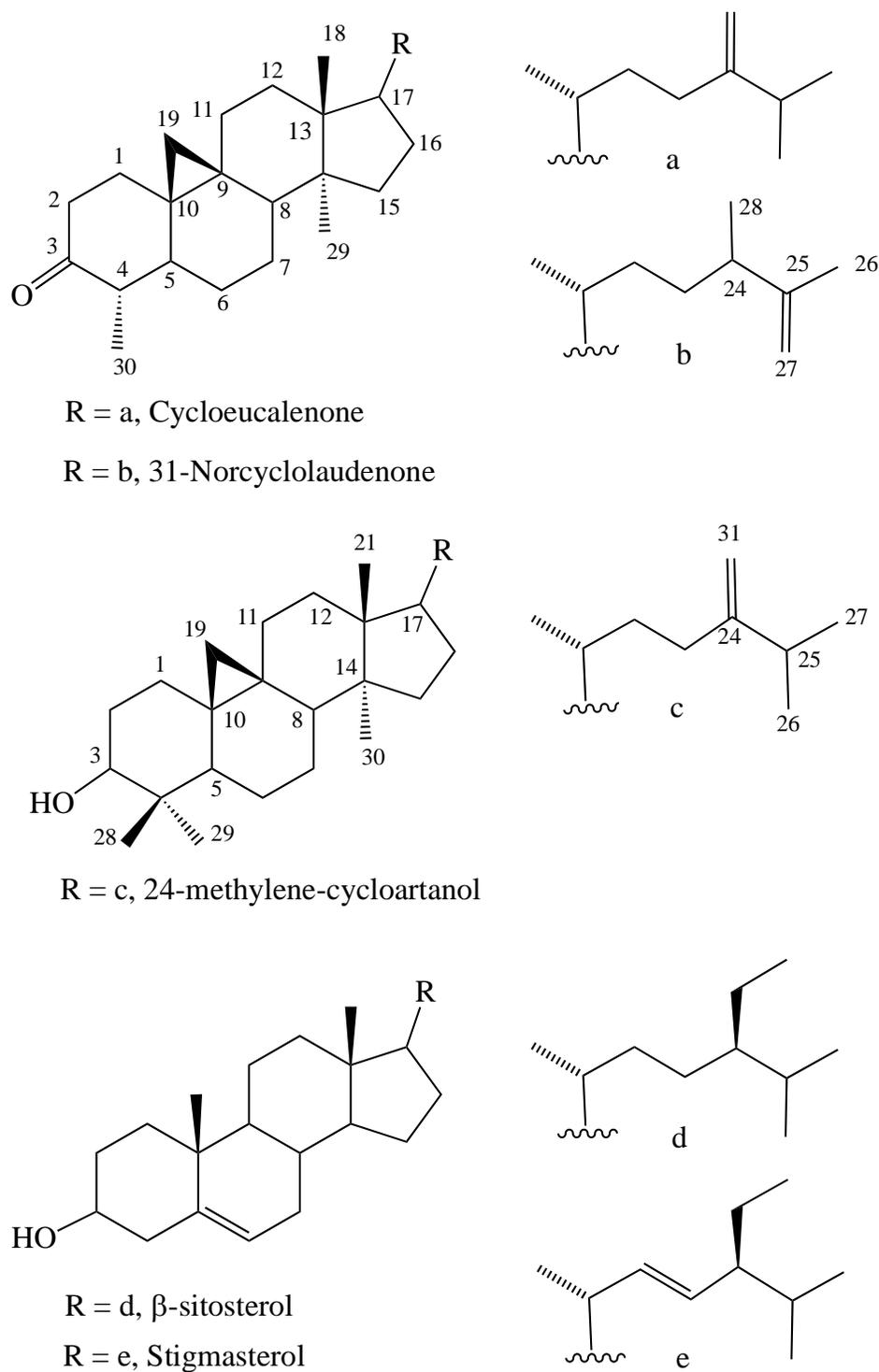


Figure 1. Representation of the chemical structures of triterpenes and steroids from *M. paradisiaca* evaluated for leishmanicidal activity against *L. infantum chagasi*: C1 (31-norcyclolaudenone); C2 (cycloeucalenone); C3 (stigmasterol and beta-sitosterol) and C4: (24-methylene-cycloartanol).

Cycloeucalenone showed no activity against the promastigote form of *L. infantum chagasi*, whereas 31-norcyclolaudenone, the mixture Stigmasterol + β -sitosterol and 24-methylene-cycloartanol presented leishmanicidal activities with EC₅₀ values of 39.29 μ g/mL, 14.35 and 16.55 μ g/mL, respectively (Table 1). These activities were similar to the control pentamidine with EC₅₀ value of 23.71 μ g/mL. In relation to amastigote assay all compounds showed statistically similar activities. The mixture Stigmasterol + β -sitosterol, 24-methylene-cycloartanol and cycloeucalenone had statistical similarities to the standard drug Anfotericin B.

Table 1 - Leishmanicidal activity of triterpenes and sterols isolated from the fruit peel of *M. paradisiaca*

Compounds	EC ₅₀ (μ g/mL)	
	Promastigote	Amastigote
31-norcyclolaudenone (C1)	39.29 (34.44 to 44.82) ^a	200.7 (75.63 to 532.8) ^a
Cycloeucalenone (C2)	>100 [*]	185.0 (78.49 to 436.2) ^{a,b}
Stigmasterol + β -sitosterol (C3)	14.35 (10.38 to 19.84) ^a	126.5(64.97 to 246.2) ^{a,b}
24-methylene-cycloartanol (C4)	16.55 (11.13 to 24.60) ^a	98.75 (47.34 to 206.0) ^{a,b}
Pentamidine	23.71 (18.44 to 30.50) ^a	-
Anfotericin B	-	32.23 (14.30 to 72.62) ^b

(-) Not evaluated

^aSimilar letters means no statistical difference

^{*}Not compared

A major obstacle in the treatment of leishmaniasis are the side effects caused by the drugs currently available that have high toxicity (Rath et al., 2003), including nephrotoxic potential of amphotericin B, second choice drug in Brazil (WHO, 2010). The sterols and triterpenes isolated from *M. paradisiaca* were tested against RAW 264.7 cells and LLC-MK2 (Table 2). Singh et al. (2008) considered compounds with EC₅₀ values of mammalian cells

above 250 µg/mL to be safe, so triterpenes and sterols from *M. paradisiaca* are safe compounds against tested cells.

Table 2 – Cytotoxicity in mammalian cell of sterols isolated from the fruit peel of *Musa paradisiaca*

Drug	IC ₅₀ (µg/mL) Cell mamalian	
	Cell RAW	Cell LLC-MK ₂
31-norciclolaudenone	197.7 (111.1 to 337.8) ^a	697.5 (359.0 to 1,355.0) ^a
Cycloeucalenone	241.8 (170.7 to 342.6) ^a	610.5 (344.1 to 1,083) ^a
Stigmasterol + β-sitosterol	124.5 (77.76 to 199.4) ^a	377.3 (199.9 to 712.1) ^a
24-methylene-cycloartanol	505.6 (155.0 to 1,649) ^a	2,758 (249.1 to 30,533) ^a

^aSimilar letters means no statistical difference

Banana peels are used in many recipes to prepare cakes, biscuits and in addition charge of banana sweets, then the population already uses it without disapproving in relation to toxicity (Oliveira et al, 2009). The banana peel due to its leishmanicidal constituents could be a useful source for the development of a product to be used in Leishmaniasis treatment.

4. Conclusion

The triterpenes and the steroid stigmasterol display leishmanicidal action against *L. infantum chagasi* strain and low toxicity to RAW 264.7 and LLC-MK₂ cells. The presence of leishmanicidal compounds in banana peel partially supports its ethnopharmacological use.

Acknowledgements

The authors thank the Foundation for Research Support of Ceará (FUNCAP) for funding this project.

References

- Accioly, M.P., Bevilaqua, C.M.L., Rondon, F.C., Morais, S.M., Machado, L.K., Almeida, C.A., Andrade Jr, H.F., Cardoso, R.P., 2012. Leishmanicidal activity in vitro of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. *Veterinary Parasitology* 187, 79-84.
- Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T., 1998. Cycloartane triterpenes from the fruit peel of *Musa sapientum*. *Phytochemistry* 47, 1107-1110.
- Akihisa, T., Kimura, Y., Kokke, W.C.M.C., Takase, S., Yasukawa, K., Jin-nai, A., Tamura, T., 1997. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 45, 744.
- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Lins Neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 325–354.
- Cham-Bacab, M.J., Peña-Rodríguez, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports* 18, 674-688.
- Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I., 2012. Isolation of stigmasterol and β -sistoterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* 1, 239-242.
- Frézard, F., Schettini, D.S., Rocha, O.G.F., Demicheli, C., 2005. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quimica Nova* 28, 511-518.
- García, M., Monzote, M., Scull, R., Herrera, P., 2012. Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. *Pharmacology* 10.

- Gil, E.S., Paula, J.R., Nascimento, F.R.F., Bezerra, J.C.B., 2008. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 29, 223-230.
- Ghosh, T., Maity, T.K., Singh, J., 2011. Evaluation of antitumor activity of stigmasterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 11, 41-49.
- Gül, M.K., Amar, S., 2006. Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Cell and Molecular Biology* 5, 71-79.
- Imam, M.Z. Akter S., 2011 *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1, 14-20.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F., Laatsch, H., Croft, S.L., 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 77, 307-314.
- Khuonghuu, F., Sangare, M., Chari Vm., Bekaert, A., Devys, M., Barbier, M., Lukacs, G., 1975. C-13 Nuclear Magnetic-Resonance Spectral Analysis of Cycloartanol and Related Compounds. *Tetrahedron Letters* 22, 1787-1790.
- Law, M. 2000. Plant sterol and stanol margarines and health. *British Medical Journal* 30, 861-864.
- Lindoso, J.A.L., Goto, H., 2006. Visceral leishmaniasis: current situation and future perspectives. *Boletim Epidemiológico Paulista* 3, 26.
- Oliveira, L., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Cordeiro, N., 2008. Lipophilic extract from banana fruit residues: a source of valuable phytosterols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9520-9524.
- Oliveira, L. F. Borges, S. V. Nascimento, J., Cunha, A. C. Jesus, T. B. Pereira, P. A. P. Pereira, A. G. T Figueiredo, L. P. Valente, W. A. *Utilização de casca de banana na fabricação de doces de banana em massa – avaliação da qualidade – The use of banana preserves – evaluation of quality.* *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 20, N. 4, p. 581-589, 2009.

- Pizzolatti, M.G., Cunha Júnior, A., Szpoganicz, B., Sousa, E., Braz-Filho, R., Schripsema, J., 2003. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova* 26, 466-469.
- Quílez, J., García-Lorda, P., Salas-Salvado, J., 2003. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition* 22, 343-351.
- Ragasi, C.Y., Martinez, A.T., Chua, J.E.Y., Rideout, J.A., 2007. A Triterpene from *Musa errans*. *Philippine Journal of Science* 136, 167-171.
- Rocha, F.F., Neves, E.M.N., Costa, E.A., Matos, L.G., Müller, A.H., Guilhon, G.M.S.P., Cortes, W.S., Vanferlinde, F.A., 2008. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18, 344-349.
- Silva, J.G.D., Werneck, G.L., Cruz, M.S.P., Costa, C.H.N., Mendonça, I. L., 2007. Infecção Natural de *Lutzomyia longipalpis* por leishmania sp. em Terezina, Piauí, Brasil. *Caderno Saúde Pública* 23, 1715-1720.
- Singh, N., Kumarn, R., Gupta, S., Dube, A., Lakshmi, V., 2008. Antileishmanial activity in vitro and in vivo of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. *Parasitology Research* 103, 351–354.
- 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 alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 12, 382–390.
- Weigel, M.M., Armijos, R.X., Racines, R.J., Zurita, C., Izurieta, R., Herrera, R., Hinojsa, E., 1994. Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Ecuador: Popular Perceptions, Knowledge, and Treatment. *Bulletin of PAHO* 28.

WHO, 2010. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March, 2010.

8 CONCLUSÕES

O reino vegetal é uma fonte inesgotável de recursos com potencial biológico para investigação científica de novas drogas que possam vir a ser utilizadas no tratamento de diversas doenças que afetam o homem e os animais. As espécies vegetais possuem grande diversidade molecular que é essencial para a produção de novos fármacos.

Na busca contínua por novos compostos com atividade leishmanicida foram testados oito compostos de origem vegetal, sendo dois esteróis e dois triterpenos da *Musa paradisiaca* e quatro compostos fenólicos (um natural e três semissintéticos) derivados do LCC contra *Leishmania infantum chagasi*.

Todos os compostos apresentaram atividade leishmanicida. Destes, três foram testados e apresentaram inibição da acetilcolinesterase, evidenciando a necessidade de estudos mais detalhados para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação.

9 PERSPECTIVAS

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada que causa sérios problemas de saúde pública, afetando diversas regiões Brasil. Os fármacos atuais não são eficazes e apresentam alta toxicidade para o paciente.

Apesar dos avanços no campo da parasitologia, imunologia e bioquímica da doença, a cura é ainda incerta.

Estudos mais detalhados para desvendar os mecanismos de ação de triterpenos e do ácido anacárdico e seus derivados, assim como sua toxicidade são essências para que se estabeleçam parâmetros mais seguros para o estudo destes compostos *in vivo*, que se apresentaram promissores neste trabalho com estudos *in vitro*.

10 REFERÊNCIAS

ACCIOLY, M. P. Atividade Leishmanicida *in vitro* de Frações de *Spondias mombin* e *Musa paradisiaca* sobre *Leishmania chagasi*. 2009. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

ACCIOLY, M. P.; BEVILAQUA, C. M. L.; RONDON, F. C. M. MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A.; ALMEIDA, C. A.; ANDRADE JÚNIOR, H. F.; CARDOSO, R. P.A. Leishmanicidal activity *in vitro* of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. *Veterinary Parasitology*, v. 187, p. 79-84, 2012.

AGOSTINI-COSTA T. S.; JALES; K. A.; GARRUTI, D. S.; PADILHA, V. A.; LIMA, J. B.; AGUIAR, M. J.; PAIVA, J. R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale* var. *nanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, p. 1075-1080, jul-ago, 2004.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, p. 114-140, Jan./Mar. 2007.

AKIHISA, T.; KIMURA, Y.; TAMURA, T. Cycloartane triterpenes from the fruit peel of *musa sapientum*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 1107-1110, 1998.

ALBERNAZ, L. C.; PAULA, J. E.; ROMERO, A. R. S.; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, p. 116-121, 2010.

ALMEIDA, M. F. O.; MELO, A. C. R.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova*, v. 34, p. 1182-1187, 2011.

ALVES, G. M. C.; ROLIM, L. A.; ROLIM NETO, P. J.; LEITE, A. C. L.; BRONDANI, D. J. Purificação e caracterização da β -lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. *Química Nova*, v. 31, p. 413-416, 2008.

ANISZEWSKI, T. *Alkaloids – Secrets of Life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*, 2007.

ARAÚJO, M. E. M. *Química de produtos naturais. Terpenóides: sesquiterpenos, esteroides e triterpenóides e carotenos*. DQB 2009 - 10. Disponível em <www.dqb.fc.ul.pt>. Acesso em 14 de outubro de 2010.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n° 3. São Paulo, set., 2004.

BECEL. Becel pró-active®. 2009. Disponível em: <http://www.qualeoseunumero.com.br/?utm_source=kylie_becel_site&utm_medium=dhtml&utm_content=kylie_produtos&utm_campaign=kylie#/entenda>. Acesso em: sete de out. 2011.

BERO, J.; HANNAERT, V.; CHATAIGNÉ, G.; HÉRENT, M. F.; QUETIN-LECLERCQ, J. In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137. p. 998-1002, 2011.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16. p. 631-637, dez., 2006.

BILLO, M.; FOURNET, A.; CABALION, P.; WAIKEDRE, J.; BORIES, C.; LOISEAU, P.; PRINA, E.; ROJAS DE ARIAS, A.; YALUFF, G.; FOURNEAU, C.; HOCQUEMILLER, R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 569-575, 2005.

BORBOREMA, S. E. T. *In vitro* Antileishmanial properties of Nêutron-Irradiated Mejlumine Antimoniate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 63-67, October, 2005.

BOSCOLO, O. H.; SENNA-VALLE, L. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Sér. Bot.*, Porto Alegre, v. 63, p. 263-277, jul./dez. 2008.

BRAGA F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana- Brasília: *Ministério da Saúde*, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral. Brasília: *Ministério da Saúde*, 2006.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e calazar. *Ciências Cul*, v. 55. nº 1, São Paulo. Jan/mar, 2003.

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.

CÉLINE, V.; PABON, A.; DEHARO, E.; ALBÁN-CASTILLO, J.; ESTEVEZ, Y.; LORES, F. A.; ROJAS, R.; GAMBOA, D.; SAUVAIN, M.; CASTILLO, D.; BOURDY, G. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 123. p. 413-422. 2009.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. [Natural Product Reports](#), v. 18, p. 674-688, 2001.

CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A. A.; COSTA, A. F.; BRITO JÚNIOR, F. E. M. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, p. 106-112, Jan./Mar. 2010.

COSTA, M.; ANTONIO, M. A.; BRITO, A.R.M.S. Effects of prolonged administration of *Musa paradisiaca* L (banana), an antiulcerogenic substance, in rats. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 28-31. 1997.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmanis chagasi* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, p. 117-118, February, 2006.

DELGADO-MÉNDEZ, P.; HERRERA, N.; CHÁVEZ, H.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 1425-1430, 2008.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos À base de antimônio usados no tratamento de Leishmaniose e esquistossomose. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 2005.

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.

DIOGENES, M. J. N.; MARAIS, S. M.; CARVALHO, F. F. Contact dermatitis among cashew nut workers. *Contact Dermatitis*, v. 35, p. 114-115, 1996.

DUA, V. K.; VERMA, G.; AGARWAL, D. D.; KAISER, M.; BRUN, R. Antiprotozoal activities of traditional medicinal plants from the Garhwal region of North West Himalaya, India. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 123-128, 2011.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 429-435, Abr./Jun., 2009.

ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; PISANGO, M. T.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ALBAN, J.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; SAUVAIN, M. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 254-259, 2007.

FEITOSA, M. A. C.; CASTELLÓN, E. G. Fauna de flebotomíneos (Díptera: psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. In: *II. Estratificação horizontal*, 2003.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. S.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v. 28, p. 511-518, 2005.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 178-182, Abr./Jun. 2005.

GALLEGO, M. Zoonosis emergentes por patógenos parasitas: las leishmaniosis. *Rev. Sci. Tec. Off. Int. Epi.*, v. 23, p. 661-676, 2004.

GEDAM, P.H.; SAMPATHKUMARAN, P. S. Cashew nut shell liquid: extraction, chemistry and applications. *Progress in Organic Coatings*, v. 14, p. 115-157. 1986.

GIL, E. S.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; BEZERRA, J. C. B.; AGUIAR, F. A. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. *Vita et Sanitas*, Trindade/Go, v. 1, n. 01, 2007.

GOMES, E. C. S.; BARBOSA, J.; VILAR, F. C. R.; PEREZ, J. O.; RAMALHO, R. C. Plantas da Caatinga de uso terapêutico: Levatamento etnobotânico. *II Congresso de Pesquisa e inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica*, João Pessoa, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira Epidemiologia*, v. 7, n° 3, 2004.

GRANDIC, S. R.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from *Annonaceae*. *Biomed Pharmacother*, v. 58. p. 388-92, 2004.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The lancet infectious diseases*, v. 2, august, 2002.

HAZRA, B.; SAHA, A. K.; RAY, R.; ROY, D. K.; SUR, P.; BANERJEE, A. Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmani donovani*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, v. 81, p. 738-41, 1987.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 418-421, 1991.

IBRAHIM, T.; CUNHA, J. M. T.; MADI, K.; FONSECA, L. M. B.; COSTA, S.S.; KOATZ, V. L. G. Immunomodulatory and antiinflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *Int Immunopharmacol*, p. 875-883, 2002.

IMAM, M. Z.; AKTER, S. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 01, p. 14-20. 2011.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. Dicionário terapêutico. *Guanabara*, ed. 2004/2005, Rio de Janeiro. *Editora Guanabara Koogan*, 2004.

KRAMP, K. L.; DEWITT, K.; FLORA, J. W.; MUDDIMAN, D. C.; SLUNT, K. M.; HOUSTON, T. A.; Derivatives of pentamidine designed target the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 695-698, 2005.

KUBO, I.; MASAMITSU, O.; VIEIRA, P.C.; SAKAI, K. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, p. 1012-1015. 1993.

JINDAL, A.; KUMAR, P. Extraction and quantification of sterols from *Tribulus terrestris* L., *Sida acuta* burm F. and *Tridax procumbens* L. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, v. 5, p. 95-97, 2013.

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.

LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A. G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, 2007.

LIMA, G. S.; MOURA, F. S.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Triterpenos de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, p. 284-289, Jan./Mar. 2009.

LUZ, L.M. Esteroides In: InfoEscola navegando e aprendendo. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/quimica/esteroides/>>. Acesso em 16 de julho de 2013.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genetic diversity in the *Leishmania donvani* complex. *Parasitology*, v. 119, p. 237-246, 1999.

MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. *Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC*, v. 74, n°4: Educação médica confirmada, 2007.

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

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORRIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 783-787, 2005.

MOTHÉ, C. G.; MILFONT JR, W. N. Aplicações do LCC (Líquido da Casca da Castanha de Caju). *Revista de Química Industrial*, v. 695, p. 15-19, 1994.

MORAIS, S. M. DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 169-177, Abr./Jun. 2005.

MOREIRA, T. M. S.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 3 Curitiba-PR, Junho/Julho, 2010.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, O. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 16, p. 61-66, 2006.

NGO, P.; DVORKIN, L.; WHELAN, J. *Musa paradisiaca*. Herbal Index, Boston healing and landscape project. Disponível em: <http://www.bu.edu/bhlp/Clinical/cross-cultural/herbal_index/herbs/Musa%20Paradisiaca.html> Acesso em: 12 ago. 2012.

OLIVEIRA, A. B. *Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de Musa paradisiaca L., Musaceae*. 2007. 112f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-Paraná, 2007.

OLIVEIRA, C. J.; ARAÚJO, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v. 09, p. 9 -105, 2007.

OLIVEIRA, L.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; CORDEIRO, N. Lipophilic extract from banana fruit residues: a source of valuable phytoosterols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 9520-9524, 2008.

OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. A. The metabolic repertoire of *Leishmania* and implications for drug discovery. Disponível em <<http://www.>>. Acesso em 16 de novembro de 2011.

ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M. A.; TORRADO, J. J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; ALUNDA, J. *In vitro* effect of new formulation of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int. Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 325-329, 2007.

PAZ, G. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MAGALHÃES, D. F.; SATHLER, K. P.B.; MORAIS, M. H. F. FIÚZA, V. O. P.; BRANDÃO, S. T.; WERNECK, G. L.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 97, p. 131-133, 2010.

PAIVA, S. R.; LIMA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, A. C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scadens* L. obtained by different extraction techniques. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, p. 499-504, 2004.

PATRÍCIO, F. J.; COSTA, G. C.; PEREIRA, P. V. S.; ARAGÃO-FILHO, W. C.; SOUSA, S. M.; FRAZÃO, J. B.; PEREIRA, W. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. N.; REBÊLO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 115, p. 313-319, 2008.

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 leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 365-371, 2003.

PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; CEN-PACHECO, F.; NOH-CHIMAL, A.; MAY-PAT, F.; SIMÁ-POLANCO, P.; DUMONTEIL, E.; GARCÍA-MISS, M. R.; MUT-MARTÍN, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan península. *Fitoterapia*, v. 78, p. 315-318, 2007.

PEREIRA, A. V.; SILVA, J. G.; PEREIRA, J. V.; SILVA, M. A. R.; PEREIRA, M. S. V.; TREVISAN, L. F. A. Efeitos antimicrobiano e genéticos de extratos vegetais sobre plasmídios de resistência a antibióticos em microorganismos de origem bovina. *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 4, p. 1983-4209, 2010.

QUEIROZ, M. J. A.; ELANGO, V.; OLIVEIRA, C. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *Jornal de Pediatria: Sociedade Brasileira de Pediatria*, v. 80, nº 2, 2004.

RAGHU, P. S.; ELANGO V.; OLIVER, C. Antioxidant and antiulcer activity of *Musa paradisiacal* in rats. *International Journal of Pharmacy & Industrial Research*, v. 2, Jan-Mar, 2012.

RAY, S.; HAZRA, S.; MITTRA, B.; DAS, A.; MAJUMDER, H. K. Diospyrin, a bisnaphthoquinone: a novel inhibitor of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Molecular Pharmacology*, 1998.

RAYCHAUDHURY, B.; BANERJEE, S.; GUPTA, S.; SINGH, R. V.; DATTA, S.C. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. *Acta Tropica*, v. 95, p. 1-8, 2005.

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

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; ALMEIDA, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, p. 185-191, Jaboticabal, jul.-set., 2012.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; MACHADO, L. K. A.; CARDOSO, R. P. A.; ALMEIDA, C. A.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; RODRIGUES, A. C. M. *In vitro* effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. *Veterinary Parasitology*, v. 178, p. 235-240, 2011.

RONDON, F. C. M. Desenvolvimento de fitoterápicos para o tratamento da leishmaníase visceral. 2011. 137f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

SALEM, M. M.; CAPERS, J.; RITO, S.; WERBOVETZ, K. A. *Phytotherapy Research*, v. 25, p. 1246, 2011.

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A.B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofuranica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). *Química Nova*, v. 17, p. 387-391, 1994.

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, G. C. Utilisation of Cashew Nut Shell Liquid from *Anacardium occidentale* as Starting Material for Organic Synthesis: A Novel Route to Lasiodiplodin from Cardols. *Journal Braz. Chemical Society*, v. 10, p. 13-20. 1999.

SANTOS, R. L. Alcalóides. *Infoescola: ensinando e aprendendo*. 2011. Disponível em <<http://www.infoescola.com/compostos-quimicos/alcaloides/>>. Acessado em 28 de abril de 2013.

SARASWATHI, N. T.; GNANAM, F. D. Effect of medicinal plants on the crystallization of cholesterol. *Journal of Crystal Growth*, v. 179, p. 611-617. 1997.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, v.25 n.3, São Paulo, 2002.

SILVA, J. G. D.; WERNECK, G. L.; CRUZ, M. S. P.; COSTA, C. H. N.; MENDONÇA, I. L. Infecção Natural de *Lutzomyia longipalpis* por leishmania sp. em Terezina, Piauí, Brasil. *Caderno Saúde Pública*, v. 23, p. 1715-1720, Rio de Janeiro, jul, 2007.

SOUSA, A. E. F.; RIBEIRO. V. V. Perfil dos raizeiros e estudos de suas indicações acerca das plantas medicinais utilizadas no tratamento das doenças do trato respiratório. *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 03, 2008.

TARIKU, Y.; HYMETE, A.; HAILU, A.; ROHLOFF, J. *Chemistry & Biodiversity*, v. 8, p. 614, 2011.

TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. A. E.; FACUNDO, J. P. Z.; STÁBELI, R. G.; SILVA-JARDIM, I. Activity of the lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotas. *Journal Braz. Chemical Society*, v. 22, p. 936-942, 2011.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE JUNIOR, 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 alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, v. 12, p. 382-390. 2005.

TYCHOPOULOS, V.; TYMAN, J. H. P. Long chain phenols-the thermal and oxidative deterioration of phenolic lipids from the cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell. *Journal Science and Food Agricultural*, v. 52, p. 71-83. 1990.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2 São Paulo Abril/Junho. 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Quimica Nova*, v. 28. n. 3, São Paulo Maio/Junho. 2005.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; ALCANTARA, T. T. N.; FERREIRA, P. A. T.; CAVALCANTI, E. S. B.; VIEIRA, I. G. P.; CAMPELLO, C. C.; WILSON, M. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Experimental Parasitology*, v. 133, p. 334–338, 2013.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; MACHADO, L. K. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; COSTA, I. R. S.; BRASIL, N. V. G. P. S.; ANDRADE JUNIOR, H. F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 567-571, set-out, 2011.

WENINGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombia plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.78, p.193-200, 2001.

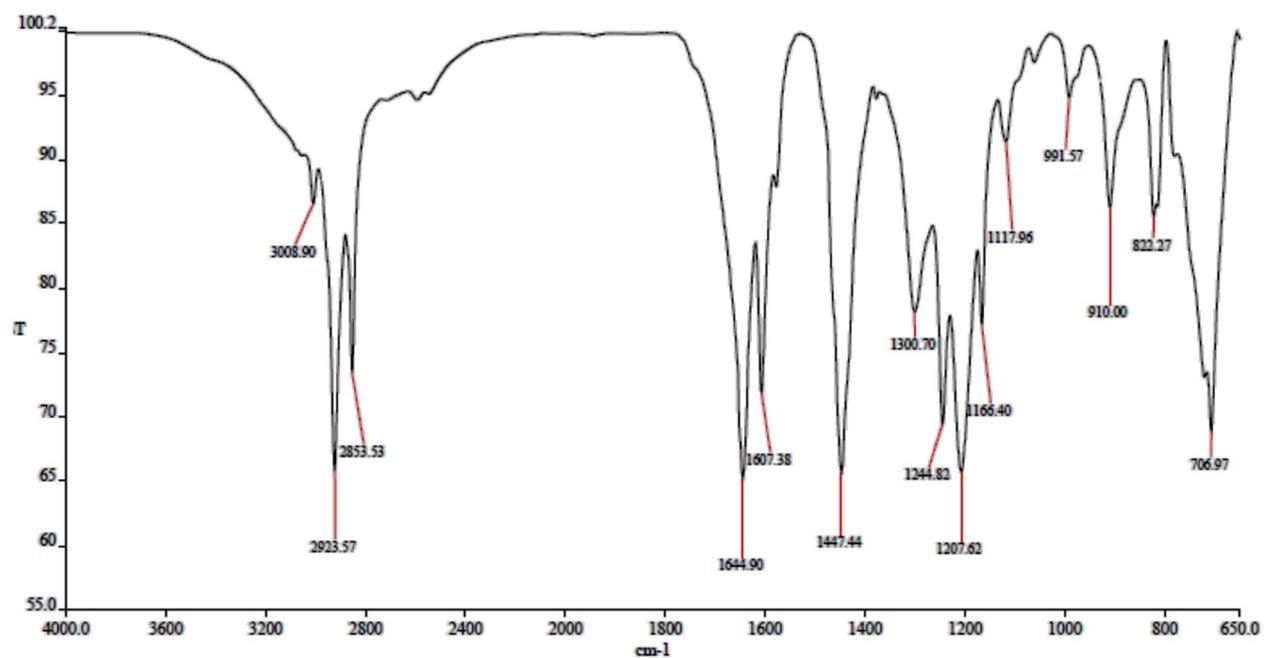
WEREMFO, A.; ADINORTEY, M. B.; PAPPOE, A. N. M. Haemostatic Effect of the Stem Juice of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) in Guinea Pigs. *Advances in Biological Research*, v. 5, p. 190-192, 2011.

WHO. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March, 2010.

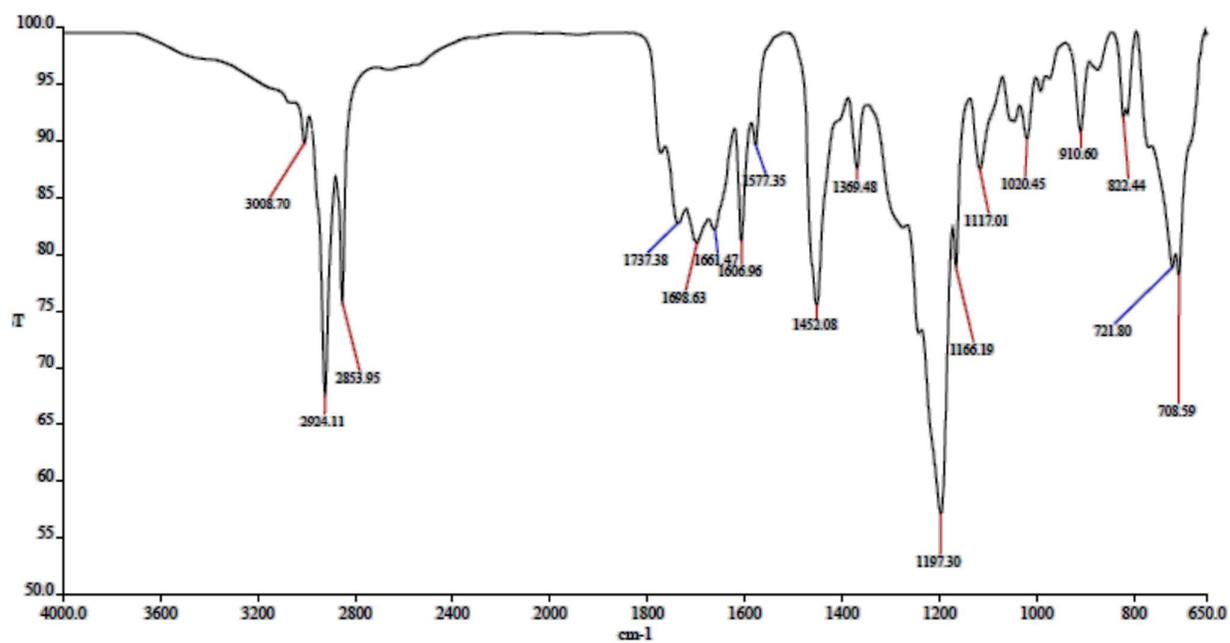
APÊNDICES

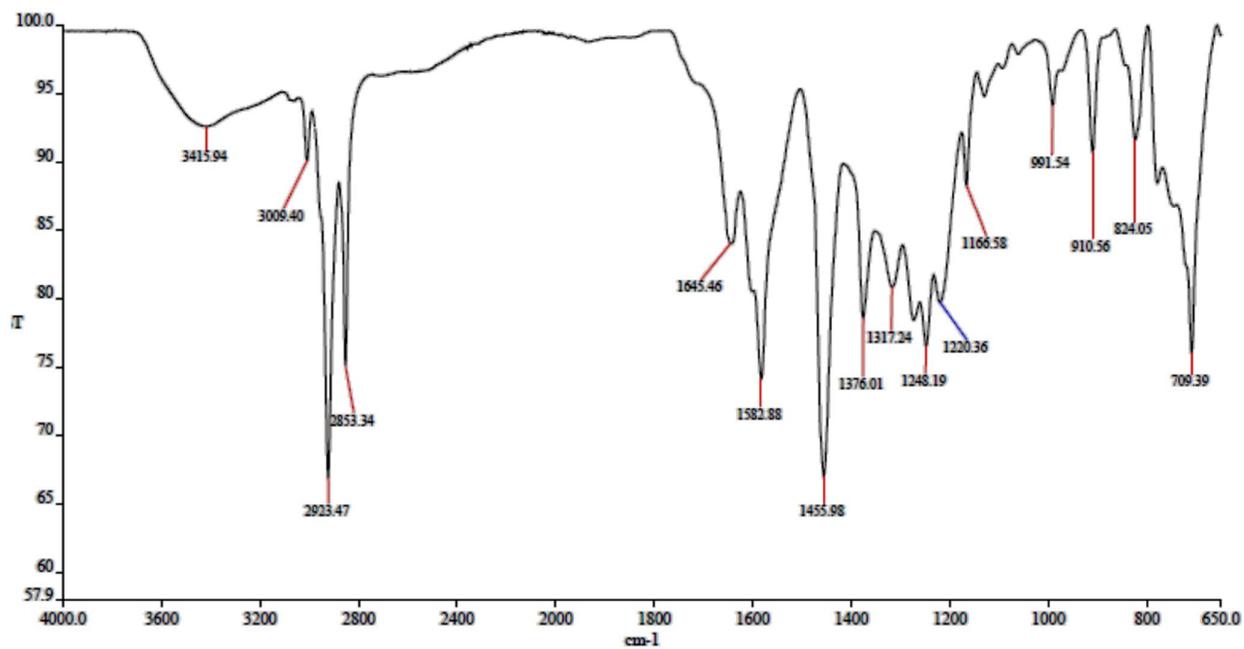
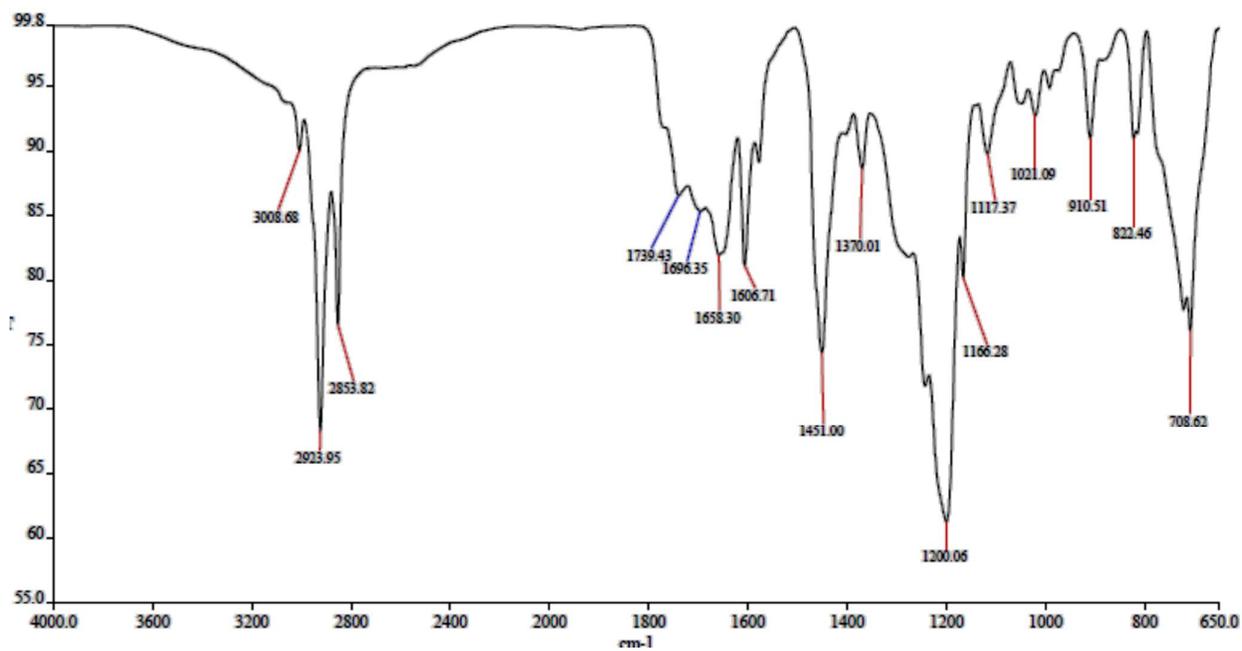
APÊNDICE 1 – Espectros no Infravermelho:

A: Ácido anacárdico



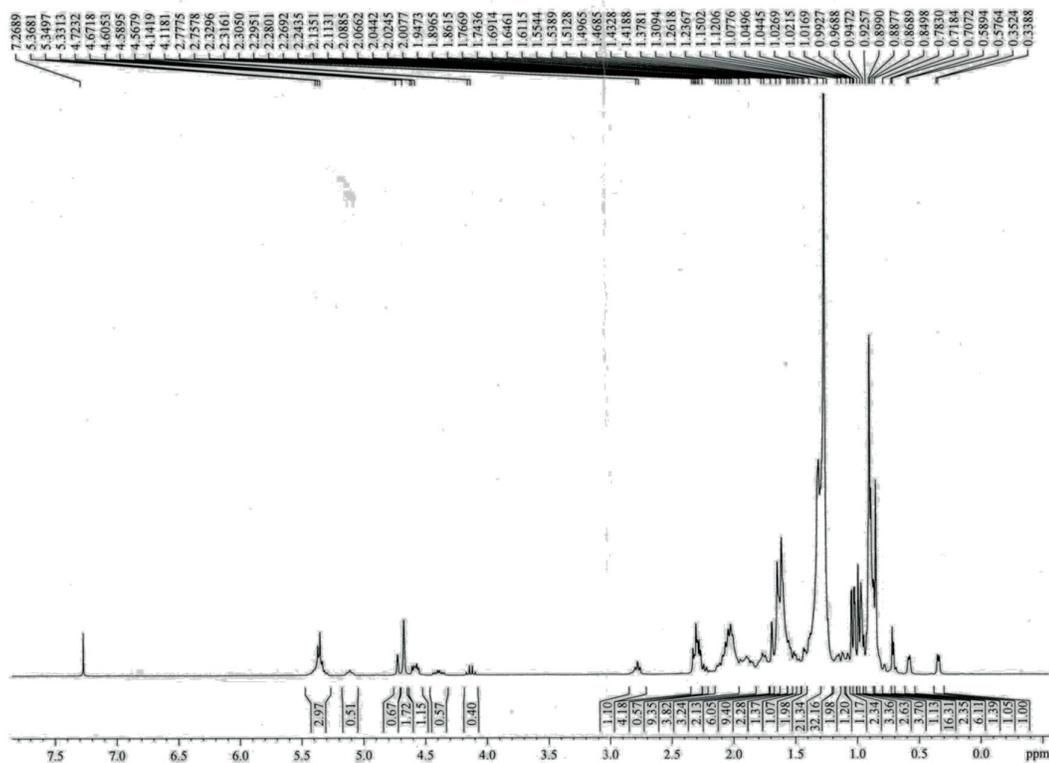
B: Ácido Anacárdico Acetilado



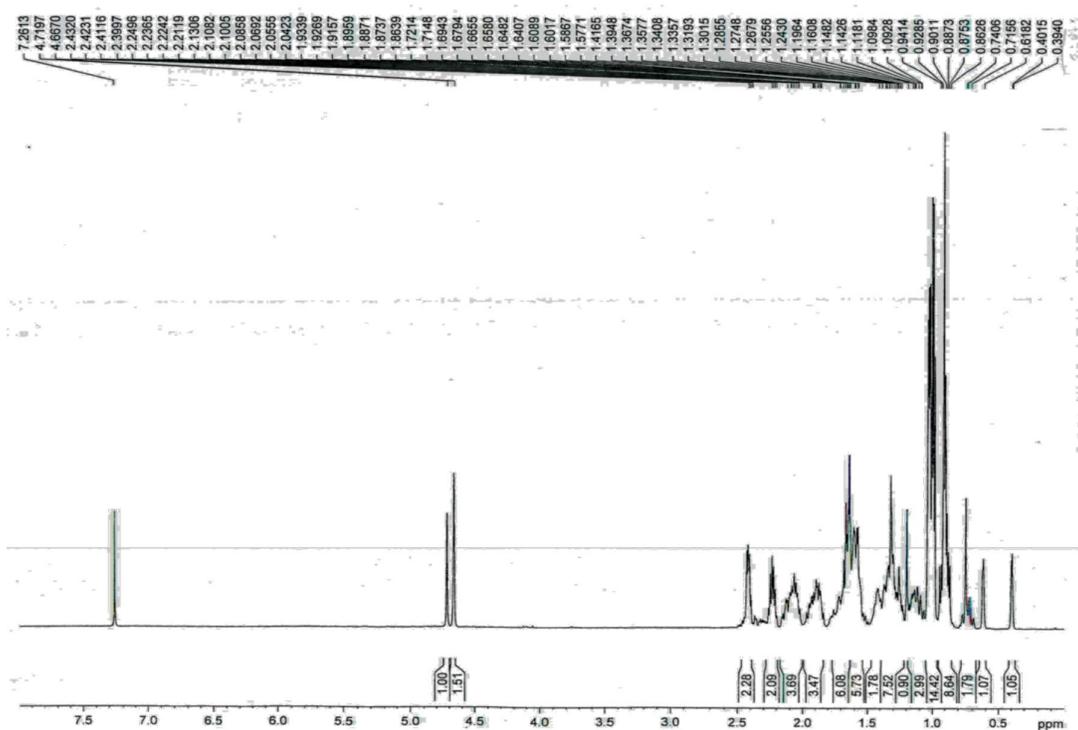
C: Anacardato de Sódio**D: Anacardato de Sódio Acetilado**

APÊNDICE 2: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear:

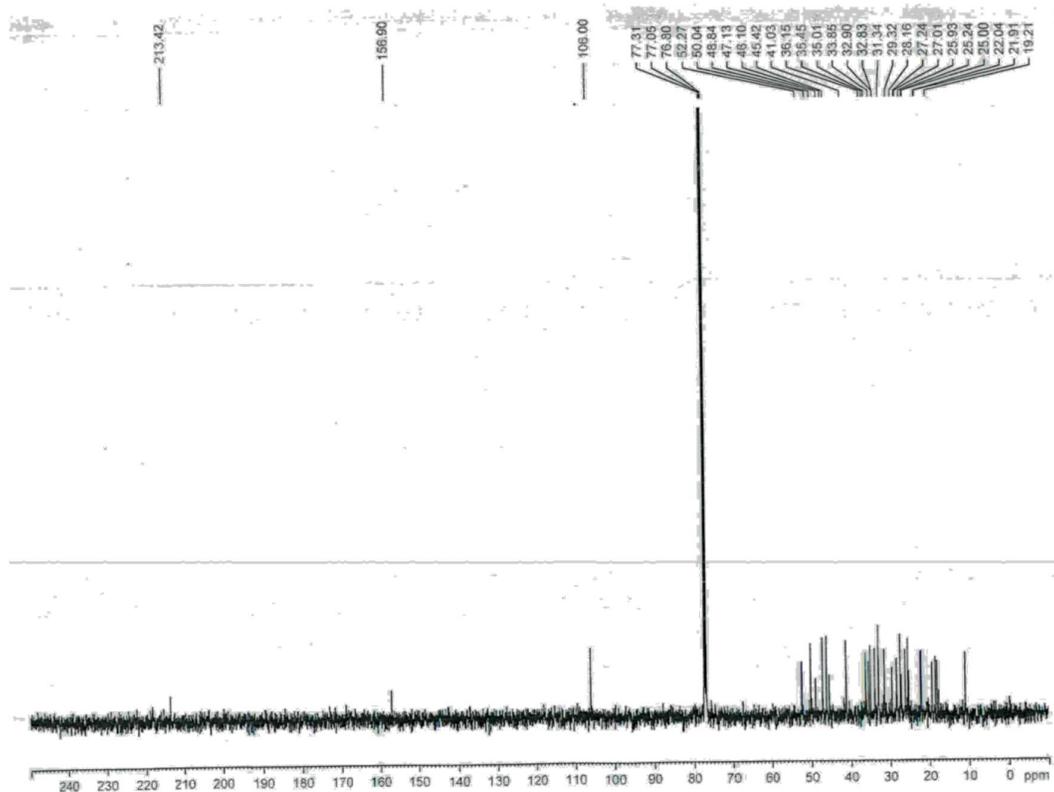
A: RMN ^1H – C1: 31-Norciclolaudena



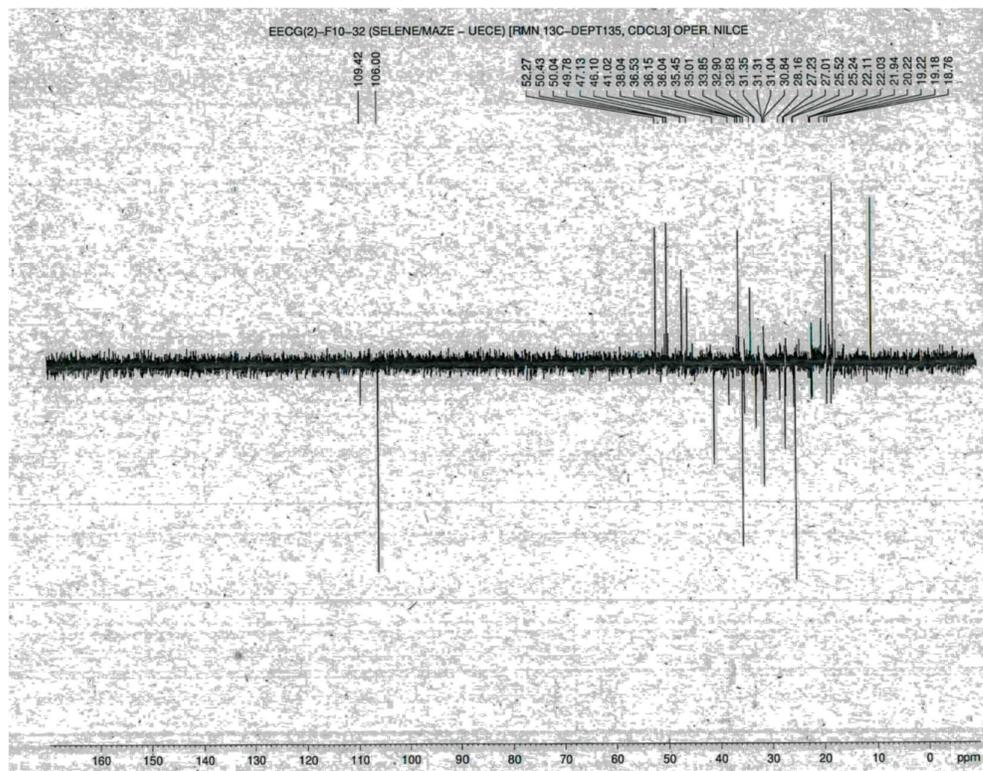
B: RMN ^1H – C2: Cicloeucalena

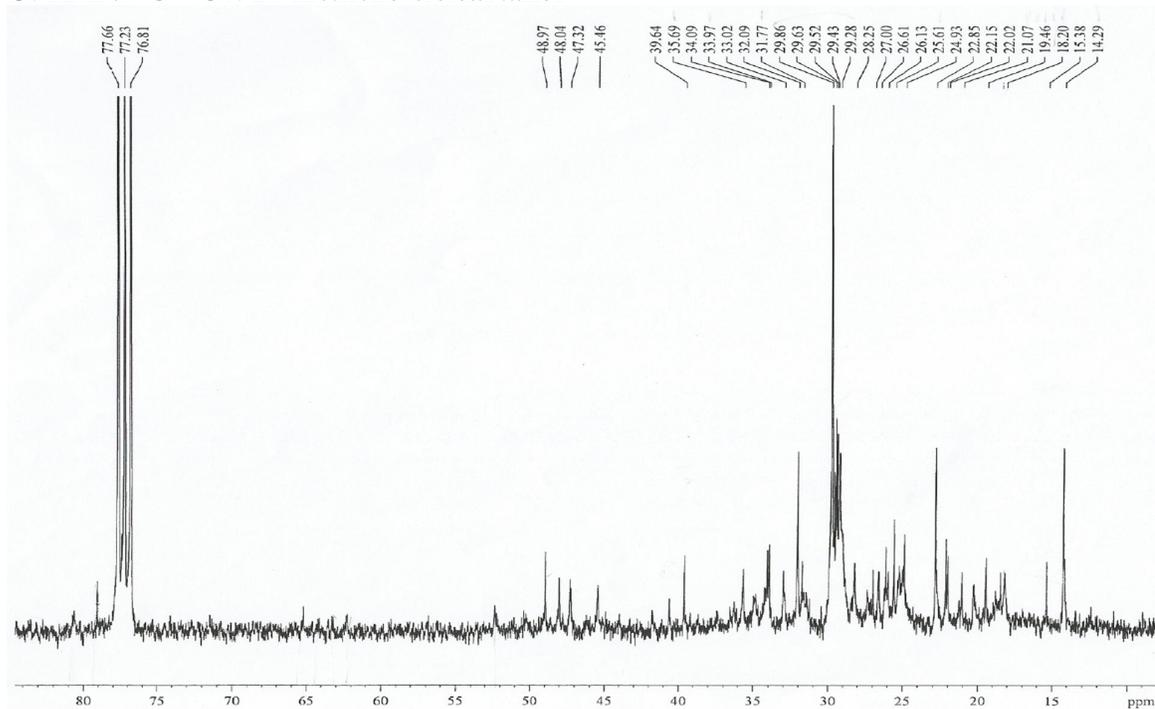
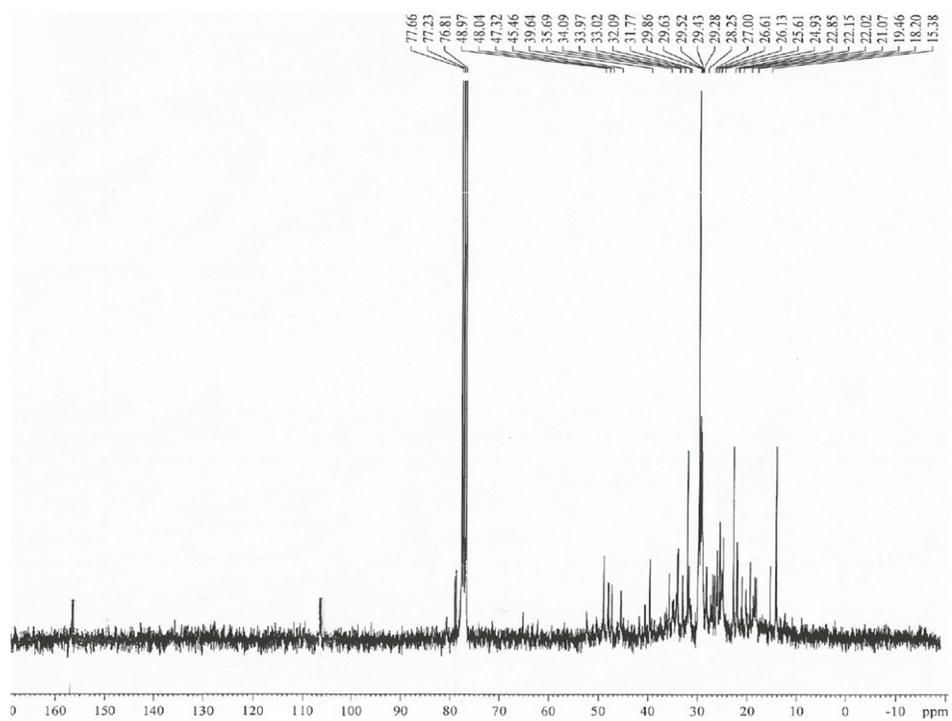


C: RMN ^{13}C – C2: Cicloeucaleanona



D: RMN ^{13}C -DEPT135 – C2: Cicloeucaleanona



G: RMN ^{13}C – C4: 24-metileno-cicloartanol**H: RMN ^{13}C – C4: 24-metileno-cicloartanol**

I: RMN ^1H – C4: 24-metileno-cicloartanol