

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

MARINA PARISSI ACCIOLY

ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE FRAÇÕES DE *Spondias mombin* E *Musa paradisiaca* SOBRE *Leishmania chagasi*

**FORTALEZA-CE
2009**

MARINA PARISSI ACCIOLY

ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE FRAÇÕES DE *Spondias mombin* E *Musa paradisiaca* SOBRE *Leishmania chagasi*

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

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

Orientadora: Profa.Dra.: Claudia Maria Leal Bevilaqua

**FORTALEZA-CE
2009**

A171a Accioly, Marina Parissi
Atividade leishmanicida *in vitro* de frações de *Spondias mombin* e *Musa paradisiaca* sobre *Leishmania chagasi*/Marina Parissi Accioly.- Fortaleza,2009.
73p. ; il.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Claudia Maria Leal Bevilaqua.
Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) –
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.
1. Atividade leishmanicida. I. Universidade Estadual do
Ceará, Faculdade de veterinária.

CDD: 636.7

ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE FRAÇÕES DE *Spondias mombin* E *Musa paradisiaca* SOBRE *Leishmania chagasi*

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

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Claudia Maria Leal Bevilaqua
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Prof. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientadora

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr
Universidade de São Paulo
Examinador

DEDICATÓRIA

À minha família, Geraldo, Ana Rita e Ricardo Accioly e ao meu marido, Eduardo
Gentil, pelo carinho, exemplo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho em muito se deve a colaboração e apoio de diversas pessoas e instituições, as quais transmito meus sinceros agradecimentos:

À Universidade Estadual do Ceará e Universidade de São Paulo, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio cedido através da concessão da bolsa de mestrado.

À minha orientadora, professora Dra. Claudia Bevilaqua, por me receber em seu laboratório quando nem mesmo me conhecia, pela amizade, ensinamento, apoio e confiança depositados.

À minha co-orientadora, Dra. Selene Maia de Moraes, pela dedicação e tempo que me disponibilizou.

Ao professor Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, pela recepção admirável em seu laboratório, por disponibilizar com plena confiança os equipamentos e o material necessário ao trabalho e pelo incentivo enquanto estivemos trabalhando juntos. Foi um prazer enorme trabalhar com a sua equipe.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela contribuição no andamento deste trabalho.

À professora Dra. Nilce Viana Gramosa, do Centro de Ressonância Magnética Nuclear do Nordeste (CENAUREN/UFC), pela obtenção dos espectros de RMN C^{13} e H^1 .

Aos amigos que fazem parte do Laboratório de Doenças Parasitárias pela acolhida e coleguismo. Foi maravilhoso trabalhar com vocês durante esses dois anos.

Ao pessoal do Laboratório de Química de Produtos Naturais, em especial à aluna Lyeghyna Machado pela enorme ajuda e disposição para ensinar e aprender.

A todas as pessoas que fazem parte do Laboratório de Protozoologia da USP, pela calorosa recepção e apoio durante o experimento, em especial a Roselaine Cardoso, Luciana Ekman e Camila Carvalho.

Aos senhores Raimundo Menezes e Adalberto Carvalho, funcionários do horto da UECE e herbário da UFC, respectivamente, pela ajuda na coleta e identificação das plantas, parte muito importante deste trabalho.

Aos grandes e fiéis amigos que tive o imenso prazer de conhecer e conviver, Vitor Luz e Fernanda Rondon, pelos momentos de alegria, força, estímulo, paciência e palavras de carinho.

Aos colegas de mestrado, Luciana Faustino, Marcela Moreira, Leonardo Pinto, Nadja Vilanova e Nathalie Ommundsen, pela companhia e apoio durante essa jornada.

Aos meus pais, Geraldo e Ana Rita, meus maiores amigos, companheiros, apoiadores e exemplo de vida, caráter e amor. Muito obrigada por terem sido sempre mais fortes que eu, mesmo sofrendo e querendo chorar comigo, pois assim cresci uma pessoa mais firme para seguir em frente. Essa vitória não é só minha, mas também de vocês.

Ao meu irmão amado, Ricardo Accioly, um grande amigo, pelo exemplo de determinação e trabalho e por poder contar sempre em qualquer momento.

Ao meu marido, que amo e admiro muito, Eduardo Gentil, pelo exemplo de dedicação e perseverança. Só nós dois sabemos o que passamos, sentimos e aprendemos durante esse período de distância e de tanta saudade. Obrigada pela paciência e carinho.

À família Gentil: Helena, Wanda, Ana Beatriz, Celina e Renata, pelo carinho e atenção.

Aos meus tios Antônio de Pádua Araújo e Wanda Araújo, pela acolhida quando precisei, conselhos e momentos maravilhosos.

Ao tio Ozir Tesser e às tias Rita Accioly e Ana Accioly, pela torcida, incentivo, amor e carinho.

Aos meus grandes e velhos amigos: Raquel Dantas, Marcia Vêras, Leonardo Hislei, Gabriele Gruska, Breno Costa, Ana Amélia Geleilate, Vanessa Rocha, Isabel Pinheiro, Camila Ramos, Lia Lima, Amíria Brasil, Pricila Nogueira, Patricia Feitosa e Samárah Albanéz, pela alegria e companheirismo.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O controle e o tratamento de cães com drogas sintéticas não têm apresentado redução da leishmaniose visceral canina. Na tentativa de encontrar novos agentes com ação leishmanicida, compostos de plantas têm sido investigados. O objetivo do trabalho foi determinar a atividade *in vitro* de frações de *Musa paradisiaca* (bananeira) e *Spondias mombin* (cajazeira) sobre *Leishmania chagasi*. As frações foram obtidas por coluna cromatográfica dos extratos metanólicos brutos das plantas. Os testes *in vitro* foram realizados sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* MHOM46/LC/HZ1 e incluíram o efeito citotóxico destas frações sobre células RAW 264.7. As cepas de *L. chagasi* foram cultivadas em meio M199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, 5% de urina humana estéril e gentamicina (40mg/ml) em estufa BOD a 23,6°C. As frações foram diluídas e adicionadas às promastigotas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25µg/ml *overnight*. Acrescentou-se MTT (brometo 3-(4,5-dimetiazol)-2,5-difeniltetrazolium). Posteriormente foi colocado SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% e 4N de HCl e a leitura foi realizada a 570nm em leitora de microplacas. O experimento teve como controle positivo a pentamidina (40 µg/ml) e como controle negativo meio sem tratamento. As amastigotas foram submetidas ao ELISA *in situ* e a leitura realizada a 492nm. Teve como controle positivo anfotericina B (40 µg/ml) e como controle negativo meio com células e promastigotas sem tratamento. As frações que obtiveram os melhores resultados sobre promastigotas foram: metanol 100% e acetato: metanol 80:20 de *S. mombin* com CI₅₀ (concentração inibitória de 50% dos parasitas) de 58,1µg/mL e 11,26 µg/mL, respectivamente. As frações de *S. mombin* acetato: metanol 70:30, acetato:metanol 80:20, acetato:clorofórmio 90:10 e a fração hexano: clorofórmio 50:50 de *M. paradisiaca*, tiveram melhor ação sobre amastigotas nas respectivas doses: 10,68µg/mL, 0,27µg/mL, 0,61µg/mL e 15,07µg/mL. Todos os resultados obtidos sobre as promastigotas foram similares estatisticamente ao controle positivo pentamidina cuja CI₅₀ variou de 0,01 a 497,3µg/mL. Todos os valores obtidos para CI₅₀ sobre amastigotas foram similares estatisticamente aos obtidos pela droga padrão anfotericina B que variou de 0,58 a 28,68µg/mL. Estas substâncias naturais não foram citotóxicas para as células RAW 264.7. Estes resultados permitem concluir que estes compostos possuem atividade inibitória *in vitro* sobre promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e sugerem futuros estudos para avaliação dos efeitos *in vivo*.

Palavras chave: Leishmaniose visceral. Metabólitos secundários. Bananeira. Cajazeira.

ABSTRACT

The control and treatment of dogs with synthetic drugs have not shown effectiveness in reducing canine visceral leishmaniasis. In an attempt to find new agents with leishmanicidal action, plant compounds have been investigated. The objective was to determine the *in vitro* activity of fractions of *Musa paradisiaca* (banana tree) and *Spondias mombin* (cajazeira) of *Leishmania chagasi*. The fractions were obtained by column chromatography of crude methanol extracts of plants. *In vitro* tests were performed on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi* MHOM46/LC/HZ1 and included the cytotoxic effect of these fractions in RAW 264.7 cells. The strains of *L. chagasi* were grown in medium M199 plus 10% fetal calf serum, 5% sterile human urine and gentamicin (40mg/ml) in a chamber at 23.6 ° C. The fractions were diluted and added to promastigotes at concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg / ml overnight. The viability of parasites was evaluated using the tetrazolium dye (MTT) colorimetric method. Subsequently SDS 10% and 4N HCl were added and read at 570nm using a microplate reader. The experiment had as positive control pentamidine (40µg/ml) and as negative control the medium without treatment. The amastigotes were subjected to *in situ* ELISA and the reading performed at 492nm. Had as positive control amphotericin B (40 g / ml) and as negative control medium with cells and promastigotes without treatment. The fractions that have the best results on promastigotes were *S.mombin* - 100% methanol and acetate: methanol (80:20) with IC₅₀ (inhibitory concentration 50% of parasites) of 58.1 µg / ml and 11.26 µg / ml, respectively. The fractions of *S. mombin* acetate: methanol (70:30), acetate: methanol (80:20), acetate, chloroform and the fraction (90:10) hexane: chloroform (50:50) from *M. paradisiaca*, had better action on amastigotes in the concentrations: 10.68 µg / ml, 0.2734 µg / ml, 0.6141 µg / ml and 15.07 µg / ml. All results obtained on the promastigotes were statistically similar to the positive control pentamidine whose IC₅₀ ranged from 0.01 to 497.3 mg / ml. All values obtained for IC₅₀ on amastigotes were statistically similar to those obtained by standard drug amphotericin B ranging from 0.58 to 28.68 µg / ml. These natural substances were not cytotoxic to RAW 264.7 cells. These results indicate that these compounds have inhibitory activity *in vitro* on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi* and suggest future studies to evaluate the effects *in vivo*.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Secondary metabolites. Banana tree. Cajazeira.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Lutzomya longipalpis</i> , flebótomo transmissor da LV	16
Figura2 – Forma promastigota de <i>L. chagasi</i>	17
Figura 3 – Forma amastigota de <i>L. chagasi</i> em células RAW 264.7 indicada pelas setas pretas	17
Figura 4 – Casos confirmados de LV no Brasil de 2000 a 2008	19
Figura 5 – Óbitos e índice de letalidade humana por LV de 2001 a 2008	20
Figura 6 – <i>Spondias mombin</i>	29
Figura 7 – Frutos de <i>Spondias mombin</i>	29
Figura 8 – Flores e folhas de <i>Spondias mombin</i>	29
Figura 9 – Taninos hidrolisáveis	31
Figura 10 – Taninos condensados	32
Figura 11 – <i>Musa paradisiaca</i>	36
Figura 12 - Haste pendulosa contendo penca de frutos de <i>M. paradisiaca</i> imaturos e brácteas avermelhadas envolvendo flores	36
Figura 13 – Forma estrutural do β -sitosterol	38
Figura 14 – Forma estrutural do estigmasterol	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IC ₅₀ das frações extraídas das folhas de <i>M. paradisiaca</i> e <i>S. mombin</i> .	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Microgramas
µM	Micromolar
ALF	Alquilifosfolipídeos
ATP	Trifosfato de adenosina
C13	Carbono 13
CE ₅₀	Concentração efetiva para se obter 50% da atividade desejada
CENAUREN	Centro Nordestino de Aplicação e uso da Ressonância magnética Nuclear
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% dos parasitas
cm	Centímetros
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
CO ₂	Gás carbônico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
H ¹	Hidrogênio 1
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₉₅	Concentração inibitória de 95% dos parasitas
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
kg	Kilogramas
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
mg	Miligramas

ml	Mililitros
mm	Milímetros
MTT	(brometo 3-(4,5-dimetiazol)-2,5-difeniltetrazolium)
N	Normal
nm	Nanomêtros
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
°C	Graus Celsius
OMS	Organização mundial da saúde
NO	Nitric Oxide
OPD	orto fenil diamina
PBS	Tampão salina-fosfato
PCR	Polimerase Chain Reaction
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ribonucleic acid
Sb ^{III}	Antimonial trivalente
Sb ^V	Antimonial pentavalente
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SESA	Secretaria da Saúde do Estado de Ceará
v/v	Volume/volume
VL	Visceral leishmaniasis
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL	16
2.1.1 Fármacos usados no tratamento da leishmaniose	20
2.2 PLANTAS MEDICINAIS	23
2.2.1 Plantas e metabólitos secundários com ação leishmanicida	24
2.3 FAMÍLIA ANACARDIACEAE	27
2.3.1 <i>Spondias mombin</i>	28
2.3.1.1 Taninos	30
2.4 FAMÍLIA MUSACEAE	34
2.4.1 <i>Musa paradisiaca</i>	35
2.4.1.1 Fitosteróis	37
3 JUSTIFICATIVA	40
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	41
5 OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo geral	42
5.2 Objetivos específicos	42
6 CAPÍTULO 1	43
7 CONCLUSÕES	56
8 PERSPECTIVAS	57
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma enfermidade infecciosa pertencente ao grupo de doenças tropicais negligenciadas. É causada por parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e tem como principal reservatório o cão, podendo acometer ungulados, roedores, raposas, marsupiais e o homem. O vetor responsável pela transmissão da leishmaniose visceral (LV) no Brasil é o díptero *Lutzomyia longipalpis* da família Psychodidae, que transmite o parasita através da picada de fêmeas destes (SACKS; KAMHAWI, 2001; LAINSON; RANGEL, 2005; GONTIJO e MELO, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 88 países são acometidos pela LV, englobando 12 milhões de pessoas infectadas e uma incidência crescente de 500 mil novos casos por ano, principalmente na Índia, Sudão, Brasil e Bangladesh (MISHRA et al., 2009). O nordeste brasileiro, até a década de 90 concentrava 90% dos casos de LV humana. No entanto, atualmente tem-se observado uma expansão territorial desta doença, pois o número de notificações nesta região tem diminuído enquanto que em outras regiões brasileiras aumentou (SESA, 2009). No que diz respeito à população canina um levantamento realizado na cidade de Fortaleza demonstrou prevalência de LVC de 26,2% (196/750) em cães domiciliados e de 21,4% (135/631) em cães de rua (RONDON et al., 2008).

As medidas de controle empregadas pelos órgãos de saúde preconizam como principal ação a eutanásia dos cães, pois no Brasil é proibido o tratamento dos animais soropositivos de acordo com a portaria interministerial 1426/2008 (BRASIL, 2008). Contudo essa medida não tem surtido o efeito esperado, demonstrando a necessidade de obter novas alternativas para auxiliar no controle da leishmaniose visceral canina (BANETH; SHAW, 2002). Além disso, o uso rotineiro de drogas utilizadas no homem para tratamento em cães induz a remissão temporária dos sinais clínicos, mas não previne a ocorrência de recidivas; tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos, leva ao risco de selecionar parasitas resistentes. Como os parasitas não são eliminados, os cães tornam-se assintomáticos, fonte de infecção e responsáveis por manterem o ciclo de transmissão (SCHETTINI et al., 2005; BIZZETI et al., 2006).

Dessa forma, essas medidas não têm apresentado efetividade na redução da incidência da doença, determinando assim a necessidade de reavaliação das ações propostas (MONTEIRO et al., 2005).

Assim, o uso de plantas para a obtenção de novos fármacos tem aumentado devido a necessidade de se combater microorganismos resistentes a drogas sintéticas atuais e maximizar o controle de doenças endêmicas como o caso da leishmaniose visceral (CROFT; COOMBS, 2003; SHARIEF et al., 2006). Os metabólitos secundários oriundos de plantas se mostraram eficazes em estudos *in vitro* sobre diferentes formas de *Leishmania* spp (CHEN et al., 1993; SCHINOR et al., 2007; SOARES et al., 2007) e podem ser viáveis para a obtenção de novos compostos para o combate desta enfermidade.

A difusão desse conhecimento no seio da população tem facilitado a aceitação popular de fitoterápicos e a aderência terapêutica e sua adoção constitui-se numa importante alternativa no combate às leishmanioses, ganhando notória expansão por parte da comunidade científica, buscando-se reduzir consideravelmente a incidência de uma zoonose, combatendo o agente etiológico estabelecido no reservatório canino (RATH et al., 2003). Uma das principais aplicações da química de produtos naturais está direcionada para a descoberta de novas substâncias medicamentosas, através do estudo de extratos de plantas ou por meio da síntese de moléculas análogas que possam ser, em ambos os casos, produzidos em escala industrial (MORAIS; BRAZ FILHO, 2007).

Baseado no exposto há a necessidade de desenvolver drogas eficazes para o tratamento da leishmaniose visceral canina que ofereça a qualidade de vida do animal e evite que este permaneça portador da doença. Através do aprofundamento de estudos fitoquímicos e farmacológicos, há a possibilidade de se pesquisar nas plantas, fontes de bioativos capazes de eliminar o parasita no hospedeiro vertebrado. As plantas *Musa paradisiaca* (bananeira) e *Spondias mombin* (cajazeira) são relatadas como possuidoras de atividades bioquímicas e farmacológicas *in vitro*, apresentando propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias por parte de compostos como fitoesteróis e taninos e promissoras para avaliação da atividade leishmanicida (OLIVO et al, 2007; NJOKU; AKUMEFALA., 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leishmaniose visceral*

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, amplamente distribuída em todo o mundo, que afeta o homem e os animais (RATH et al., 2003). É causada por pelo menos 17 espécies de protozoário do gênero *Leishmania*. Atualmente as leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países e aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil, atingindo principalmente populações pobres (CROFT; COOMBS, 2003). Como em outras doenças tropicais, estão relacionadas ao desenvolvimento econômico e a mudanças ambientais provocadas pelo homem que promovem a exposição de hospedeiros susceptíveis aos insetos vetores infectados. Embora as leishmanioses sejam consideradas doenças rurais, o recente aparecimento destas enfermidades em grandes centros urbanos e a re-emergência em várias cidades do mundo representa problema de saúde pública (MONTEIRO et al., 2005).

Os vetores da leishmaniose visceral são dípteros da família *Psychodida*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados (BORASHI; NUNES, 2007).



Figura 1. *Lutzomyia longipalpis*, flébotomo transmissor da LV

Fonte: <http://faculty.vetmed.ucdavis.edu/faculty/gclanzaro/lab/images/sandflybylanzaro.jpg>

Estes insetos contaminados picam o hospedeiro vertebrado inoculando a forma promastigota infectante através do repasto sanguíneo juntamente com a saliva. Após

inoculação, ocorre diferenciação para amastigotas, que se desenvolvem no interior dos macrófagos e multiplicam-se intensamente até seu rompimento, ocorrendo a liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo; ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, fechando o ciclo do parasita (GONTIJO; MELO, 2004).



Figura 2. Forma promastigota de *L. chagasi*
Fonte: www.fcfrp.usp.br

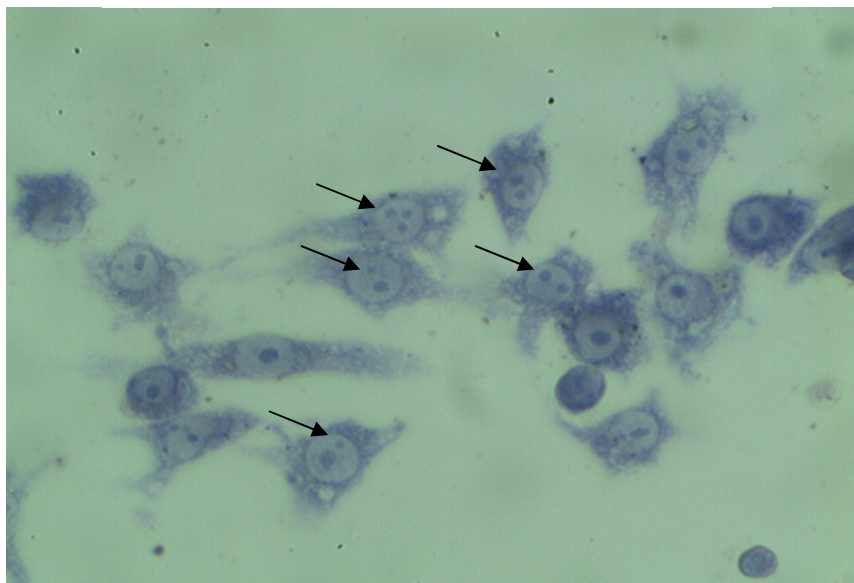


Figura 3. Forma amastigota de *L. chagasi* em células RAW 264.7 indicadas pelas setas pretas

A forma clínica da LV é causada pelas espécies *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* e *L. (L.) infatum* no Velho Mundo, atingindo partes do continente asiático, africano e europeu. No Novo Mundo, a *Leishmania (L.) chagasi* é o principal agente etiológico da LV (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Acredita-se que *L. chagasi* é sinônimo de *L. infantum*, que foi importada da Europa, durante a colonização espanhola (KILLICK-KENDRICK, 1985; RIOUX et al., 1990). Outros, no entanto, acreditam que *L. chagasi* teria estado presente nas Américas antes da colonização européia (LAINSON; RANGEL, 2005). No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* está relacionada com a transmissão de *L. chagasi* (ALVAR et al., 2004).

Os mamíferos portadores de LV no ambiente rural são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores e raposas sendo que grande parte das lesões nestes animais não é aparente (FUNASA, 2000). Em virtude da constante expansão dos aglomerados urbanos, o cão vem sendo apontado como o principal reservatório urbano representando assim, uma fonte de infecção para os vetores biológicos. Ademais, estes animais têm sido encontrados em focos da doença humana, sendo considerados o principal elo na cadeia de transmissão da LV (MOLANO et al., 2003).

A leishmaniose visceral é caracterizada por hepatoesplenomegalia, caquexia, pancitopenia e febre, podendo levar a morte. Porém, dependendo da fase da doença e da imunidade do animal, este pode apresentar-se assintomático (SIMÕES-MATTOS et al., 2002). 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 flebotômíneos (GONTIJO; MELO, 2004).

O diagnóstico da leishmaniose visceral baseia-se nos aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Biópsia ou punção aspirativa de material de medula, baço, fígado e linfonodos permitem o diagnóstico parasitológico, através de visualização de esfregaço em lâminas, isolamento em meios de cultura e inoculação em animais de laboratório. A especificidade destes métodos é de 100%, porém a sensibilidade varia dependendo do tecido analisado (MARZOCHI et al, 1993). Para o diagnóstico sorológico, no Brasil, são realizados com maior frequência o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Sendo o ELISA mais sensível e menos específico que a RIFI (GONTIJO; MELO, 2004). E há

ainda métodos moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que apresenta alta sensibilidade (MANNA et al, 2008).

No Brasil, historicamente a maior parte dos casos humanos ocorre no Nordeste. Nos últimos anos as regiões Sudeste e Norte assumem uma proporção significativa desses casos. Na década de 90 mais de 85% das notificações ocorriam no Nordeste, mas a partir de 2007 esse percentual permanece inferior a 50% dos casos (figura 4) (SESA, 2009).

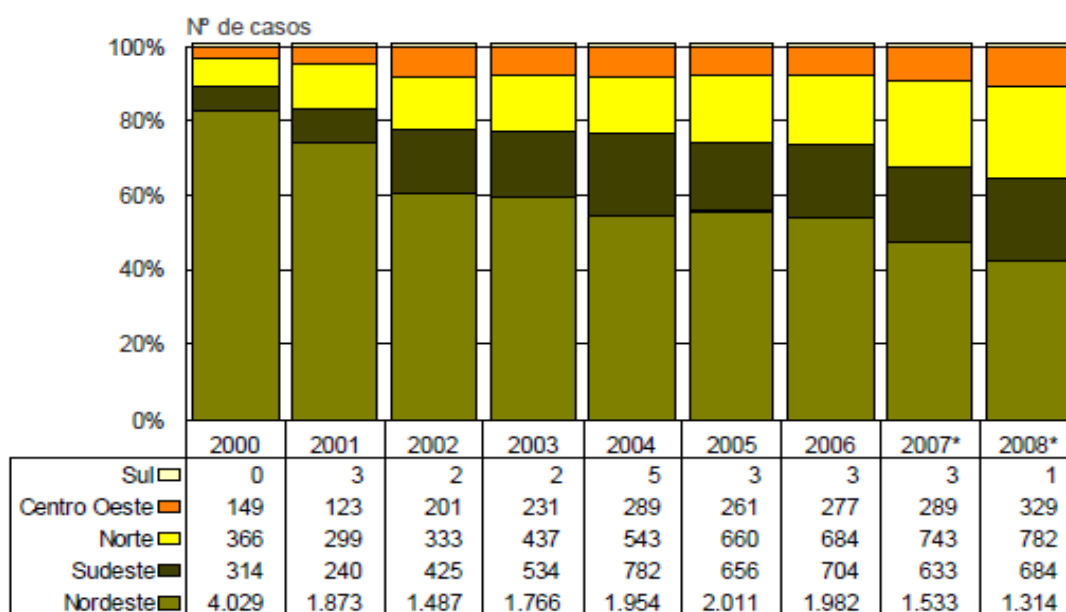


Figura 4. Casos confirmados de LV no Brasil por região de 2000 a 2008.
Fonte: Secretária da saúde do Estado do Ceará/SESA, 2009.

No Ceará, no período de 2001 a 2008 foram confirmados 2.796 casos de LV humana. A letalidade média no período foi de 4,7%, variando entre 3,2% em 2007 e 6,7% em 2006 (figura 5). Em 2008 foram notificados 814 casos, sendo 576 confirmados em 97 municípios. Destes, foram confirmados 33 óbitos, sendo 15 em Fortaleza. Em 2009 foram notificados 180 casos, sendo 79 confirmados e quatro óbitos (SESA, 2009).

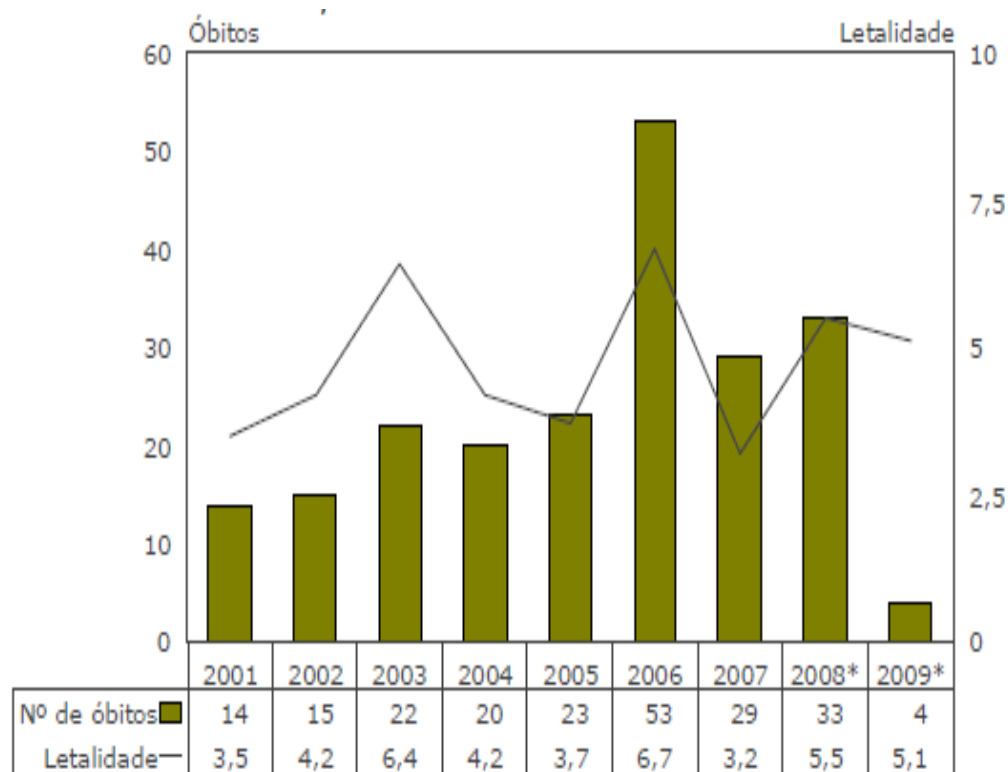


Figura 5. Óbitos e letalidade humana por LV no Ceará de 2001 a 2008.

Fonte: Secretária da saúde do Estado do Ceará/SESA, 2009.

2.1.1 Fármacos usados no tratamento da leishmaniose

Desde a primeira metade do século 20, o tratamento contra a leishmaniose visceral tem sido realizado utilizando drogas como o antimoniato de meglumina, alopurinol, anfotericina B, aminosidina, miltefosina, entre outros que são amplamente utilizados na Europa e em outras partes do mundo (ALVAR et al., 2004; NIETO et al., 2005).

Os antimônios, desde tempos remotos, são usados na medicina para diversos fins terapêuticos, mas apenas em 1912 Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético, um antimonial trivalente (Sb^{III}), tinha efeito terapêutico nos casos de leishmaniose tegumentar americana e em 1915 foi demonstrado a sua eficácia no tratamento da leishmaniose visceral (RATH et al., 2003). No entanto, devido aos graves efeitos tóxicos e colaterais do Sb^{III} sobre os indivíduos, foi substituído pelos antimoniais pentavalentes (Sb^V), tais como o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) que são os fármacos de primeira escolha para o tratamento humano (BERMAN, 1997) e canino (ALVAR et al., 2004). Estas

drogas são 10 vezes menos tóxicas que os antimoniais trivalentes (ROBERTS et al., 1995).

Apesar de ser utilizado desde a década de 50, ainda hoje, se desconhece o mecanismo de ação e a toxicidade seletiva do antimoniato de meglumina. Contudo existem várias hipóteses que tentam explicar a ação deste fármaco, como a formação de complexos de carboidratos e antimônio, N-metil-D-glucamina e antimônio, solúveis em água que facilitariam a distribuição da droga nos macrófagos do hospedeiro. Suspeita-se que o antimoniato de meglumina seja uma pró-droga, sendo assim no interior do macrófago seria convertido em Sb^{III} e tóxico para as formas amastigotas de *Leishmania* spp (ROBERTS et al., 1995), interferindo no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e na glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BALAÑA-FOUCE et al., 1998). Além disso, existe na forma amastigota uma metaloprotease zinco dependente, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima que é essencial para o desenvolvimento do parasita (BANGS et al., 2001). Outro estudo no homem portador de leishmaniose demonstrou que após administração intramuscular do antimoniato de N-metilglucamina, ocorreu conversão do composto orgânico para as formas iônicas Sb^{III} e Sb^V , sendo também observado a ocorrência da bio-redução do Sb^V para a sua forma trivalente, reforçando a formação *in vivo* do Sb^{III} que é responsável pela toxicidade da droga e da atividade terapêutica (MIEKELEY et al., 2002).

O alopurinol é um quimioterápico muito utilizado no protocolo terapêutico, normalmente associado ao antimoniato de meglumina, devido a sua atividade inibitória do crescimento de *Leishmania* spp., baixa toxicidade quando comparada aos antimônios e fácil administração por via oral. Porém, os resultados obtidos na terapia com o uso isolado do alopurinol ou mesmo em associação não tem se mostrado eficaz (DENEROLLE; BOURDOISEAU, 1999). Estudos têm demonstrado que a terapia do antimoniato de meglumina sozinho ou associado com alopurinol no protocolo terapêutico de cães naturalmente ou experimentalmente infectados por *Leishmania* spp. foi capaz de induzir parcial ou completamente a redução dos sinais clínicos, contudo após o tratamento os animais permaneceram positivos de acordo com diagnóstico parasitológico e molecular (RIERA et al., 1999; STEUBER et al., 1999; MORITZ et al., 1999). Estes achados sugerem que a recidiva da doença é esperada nestes animais, tornando-os fonte de infecção de *Leishmania* spp.

A anfotericina B é primariamente uma droga fungicida, que possui atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp, sendo considerado fármaco de segunda linha para o tratamento (LEMKE et al., 2005). Tem como mecanismo de ação a ligação da droga ao ergosterol da membrana celular da leishmânia. A ligação ao ergosterol provoca uma desorganização estrutural na membrana, formando poros que alteram sua permeabilidade ao potássio intracelular, acarretando em morte do parasito por lise osmótica. Nos mamíferos, a anfotericina B se liga ao colesterol da membrana celular, o que parece estar relacionado aos efeitos adversos deste fármaco, como tremores, febre, náuseas, vômitos, anorexia, mialgias, artralgias e perda de peso, sendo a nefrotoxicidade a principal expressão tóxica (NIETO et al., 2005).

A aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo que tem atividade leishmanicida testada em modelos experimentais animais e contra várias espécies de leishmânia *in vitro* (POLI et al., 1997). O seu mecanismo de ação é baseado no bloqueio da ligação do RNA, a unidade 30S dos ribossomas, provocando alteração na síntese protéica do parasita (NOLI; AUXILIA, 2005). Embora a droga apresente eficácia para a melhora no quadro clínico, os animais tratados podem ainda funcionar como reservatório para a infecção humana (VENEXAT et al, 1998). Esta droga pode provocar efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e surdez por lesão do VIII nervo craniano (RIBEIRO, 2001).

A miltefosina é a mais recente arma no combate às leishmanioses. Este quimioterápico foi sintetizado a partir de um análogo dos alquilisofosfolipídeos (ALF) que demonstrou efeito citotóxico e originalmente foi investigado para o tratamento contra o câncer (RATH et al., 2003). Em estudos contra microorganismos, esta droga demonstrou ser ativa contra uma variedade de fungos patógenos de humanos e contra o protozoário *Tetrahymena pyriformis*, além disso, foi capaz de ativar macrófagos de camundongos infectados e inibiram a síntese de lipídeos do protozoário *Leishmania* spp. (SINDERMANN et al., 2004). O mecanismo de ação ainda é controverso. O fármaco pode provocar vômitos e diarreia, elevar a uremia e os níveis sanguíneos de transaminases (FISHER et al., 2001).

Na sua maioria, as desvantagens dessas medicações são a toxicidade podendo causar diversos efeitos colaterais, custo bastante elevado, acesso restrito, difícil administração por exigirem a via parenteral e mão-de-obra qualificada para aplicação

(TEMPONE et al., 2005). Além disso, leva ao risco de selecionar parasitas resistentes, não sendo os cães capazes de eliminar todos os parasitas, tornando-se assim fonte de infecção e responsáveis por manterem o ciclo de transmissão. Portanto, o tratamento canino não tem apresentado eficácia e nem diminuído sua importância como reservatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006a). Vale ressaltar, que o tratamento contra a LV de cães com medicamentos utilizados no tratamento humano é proibido no Brasil de acordo com a portaria interministerial 1.426/2008 (BRASIL, 2008). Fato este reforçado por diversos estudos que demonstram a ineficácia destes fármacos no tratamento canino promovendo apenas a melhora clínico-imunológica temporária do animal (VALLADARES et al., 1998; BANETH, 2002).

As estratégias de controle até então utilizadas estão centradas e dirigidas para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia de cães sororreagentes), bem como para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos registrados, como preconiza a Organização Mundial de Saúde (MELO et al., 2004). Porém, tem-se questionado sobre a eficácia dessas medidas, pois não causam redução do número de casos em humanos, demonstrando a necessidade de encontrar novas alternativas de controle mais efetivas para o homem e o cão (RIBEIRO et al., 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Considerando as dificuldades terapêuticas, há urgência na busca de novas drogas, dentre as quais se incluem promissora os fitoterápicos como uma alternativa no tratamento da leishmaniose visceral canina, devido à inexistência de drogas sintéticas capazes de promover não só a cura clínica como também a total eliminação do parasita em cães (NAKAMURA et al., 2006). Através do aprofundamento de estudos fitoquímicos e farmacológicos, há a possibilidade de se verificar nas plantas fontes de compostos bioativos capazes de eliminar o parasita no hospedeiro vertebrado.

2.2 Plantas medicinais

Planta medicinal é todo vegetal que contém, em um ou vários de seus órgãos, substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos ou precursores de substâncias utilizadas para tais fins, sendo amplamente utilizada pela medicina alternativa (AMOROZO, 2002).

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

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica de enfermidades (CECHIEL FILHO; YUNES, 1998).

Como parte da pesquisa por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade, o Programa de Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde (OMS) vem considerando a investigação sobre o uso plantas no tratamento de leishmaniose essencial e de alta prioridade (WHO, 2008).

2.2.1 Plantas e metabólitos secundários com ação leishmanicida

Os metabólitos secundários são freqüentemente armazenados pelas plantas em quantidades menores que os metabólitos primários, sendo às vezes sintetizados em estágios de desenvolvimento distinto da planta. Desta forma, muitos metabólitos secundários podem ser considerados como materiais especiais ou químicos refinados e são mais valorizados no mercado. Eles são usados comercialmente como compostos ativos biologicamente, conferindo sabor ou aroma e como pesticidas. Muitos destes produtos naturais secundários freqüentemente têm estruturas altamente complexas, que determinam sua atividade biológica. Um bom exemplo é a azadirachtina extraída do *Neem*, com estrutura bastante complexa e que é utilizada como inseticida. Uma vantagem econômica tanto dos metabólitos primários como secundários é a facilidade

de obtenção através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (CHAGAS, 2004).

Em sua maioria, os metabólitos secundários funcionam como defesa (contra herbívoros, micróbios e vírus) e como compostos sinalizadores para atrair polinizadores e dispersando sementes. São, portanto, importantes para a sobrevivência da planta e aptidão reprodutiva. Estão presentes em todas as plantas superiores, geralmente em uma alta diversidade estrutural. Alguns compostos importantes são freqüentemente acompanhados por componentes derivados e menores. Ao todo, o padrão do metabólito secundário em uma determinada planta é complexo, muda em um tecido e órgão de maneira específica e diferenças podem ser vistas entre os diferentes estágios de desenvolvimento (por exemplo, órgãos importantes para a sobrevivência e reprodução têm maior quantidade), entre indivíduos e populações (WINK, 2003).

Várias pesquisas têm evidenciado como foco de estudo a atividade leishmanicida de metabólitos secundários através de ensaios *in vitro* e *in vivo* sobre formas promastigotas e/ou amastigota de *Leishmania* spp. No Rio de Janeiro, uma fração alcalóide rica em voacangina e coronaridina da planta *Tabernaemontana catharinensis* demonstrou excelente efeito leishmanicida sobre as formas amastigotas da *L. amazonensis* independente da produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados (SOARES et al., 2007). Outro alcalóide é a piperina das espécies de *Piper* spp. que demonstrou atividade sobre promastigotas de *L. donovani* comparada a ação da pentamidina, medicamento padrão das leishmanioses (KAPIL, 1993).

Um estudo realizado na Suíça isolou de *Scrophularia lepidota* (Scrophulariaceae) os seguintes compostos: catalpol, 6-*O*-metil-catalpol, aucubina, sinuatol, ajugol, ajugosida, angorosida, aglicona, 3,4-Dihidro-metilcatalpol e escrolepidosídeo, sendo os dois últimos inéditos na literatura. Todos estes compostos foram estudados sobre formas promastigotas de *L. donovani* e 9 das 11 estruturas químicas obtiveram bons resultados com CI_{50} variando de 6,1 a 26 $\mu\text{g/mL}$ (TASDEMIR et al., 2005).

Em um trabalho com a espécie *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae) planta usada tradicionalmente pelos habitantes da região amazônica do Peru para o tratamento de herpes foi testada sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* obtendo CI_{50} de 20 e 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A partir destes resultados foram isolados dois iridóides espirolactonas do extrato etanólico desta planta, demonstrando

que estas duas estruturas químicas podem ser as responsáveis pela atividade terapêutica do extrato (CASTILLO et al., 2007).

Os taninos são compostos fenólicos que também foram analisados quanto sua atividade leishmanicida e seus efeitos imunomoduladores em células macrofágicas infectadas. Um total de 67 taninos foram avaliados sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp. não demonstrando ação efetiva ($CE_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$), porém sobre as formas amastigotas em células macrofágicas foram evidenciadas atividades leishmanicidas com CE_{50} variando de 1 a 250 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, estes compostos foram para os macrófagos estimuladores de ON, citocinas, interleucinas (IL1, IL10, IL12, IL18, IL19, interferon gama e fator de necrose tumoral alfa, substâncias estas essenciais para a ocorrência de uma resposta imunológica mais efetiva contra o protozoário parasita intracelular obrigatório (KOLODZIEJ; KINDERLEN, 2005).

Algumas acetogeninas como senegalena, squamocina, asimicina e molvizarina, isoladas das sementes de *Annona senegalensis* (Annonaceae), mostraram uma atividade contra promastigotas de *L. major* e *L. donovani* em várias concentrações variando de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Outra acetogenina que apresentou ação contra promastigotas de *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. amazonensis* foi Rolliniastatina-1 obtida da casca do tronco de *Rollinia emarginata* (Annonaceae). Anonacina A e goniotalmicina obtidos das sementes de *Annona glauca* (Annonaceae) também mostraram efeitos semelhantes (WAECHTER et al, 1998; CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Em São Luís do Maranhão foram avaliadas 10 espécies de plantas e suas frações hidroalcoólicas sobre promastigotas de *L. amazonensis*. As espécies *Julocroton triqueter* (Euphorbiaceae), *Dichorisandra* sp. (Commelinaceae) e *Tephrosia cinerea* (Fabaceae) foram eficazes obtendo CI_{50} de 29,5; 32,9 e 43,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (BEZERRA et al., 2006). Também no Maranhão outro trabalho avaliou o efeito leishmanicida da fração hidroalcoólica de *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae), planta usada popularmente no tratamento de lesões cutâneas causadas por *Leishmania* spp sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* ($CI_{50} = 73,7 \mu\text{g/mL}$) e *L. amazonensis* ($CI_{50} = 382,5 \mu\text{g/mL}$) (MOREIRA et al., 2007).

Os estudos sobre a atividade leishmanicida de plantas *in vivo* não têm obtido resultados semelhantes *in vitro*. As frações diclorometano e éter de petróleo de *Peperomia galioides* (Canela branca) e seus constituintes ativos difenólicos exibiram propriedades *in vitro*. No entanto, esta atividade não foi observada no estudo *in vivo*

utilizando camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* (Fournet et al., 1996). O extrato etanólico e as frações de *Dysoxylum binectariferum* não demonstraram efetividade no tratamento da infecção por *L. donovani* em hamsters onde a inibição variou de 29,1 a 67,7%, 7 dias pós-tratamento e 38 a 69%, 30 dias, respectivamente (LAKSHMI et al., 2007).

Dutta et al. (2008) demonstraram que o extrato da folha de *Aloe vera* (babosa) administrado por via oral em camundongos Balb/c reduziu a parasitemia com efeito dose-dependente, pois a dose de 5mg/kg foi capaz de reduzir em 47,1% e 54,3% no fígado e medula óssea, respectivamente, e 88% no baço; a dose de 15mg/kg reduziu em 95% a parasitemia no fígado e baço e em 86,8% na medula óssea e na dose de 45 mg/kg o percentual de redução foi de 97% em todos os tecidos.

Outro estudo com a planta *Zanthoxylum chiloperone* demonstrou que o alcalóide isolado canthin-6-ona reduziu em 70% as lesões de camundongos Balb/c infectados experimentalmente por *L. amazonensis* (FERREIRA et al., 2002). A eficácia do tratamento com *Chenopodium ambrosioides* (Erva-de-Santa-Maria) em camundongos infectados por *L. amazonensis* demonstrou que o extrato hidrolcoólico desta planta diminuiu o tamanho das lesões, no entanto foi observado presença significativa de parasitos nas lesões, linfonodos e baço dos animais infectados (PATRÍCIO et al., 2008).

Partindo da premissa que os efeitos adversos da terapia convencional da leishmaniose visceral, levam à busca de novos produtos mais efetivos e com maior índice terapêutico podendo este efeito ser encontrado nos metabólitos secundários de plantas, dentre eles taninos e fitosteróis, por possuírem numerosas atividades bioquímicas e biológicas *in vitro*.

2.3 Família Anacardiaceae

Anacardiaceae é uma família constituída por cerca de 76 gêneros e 600 espécies. Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos (Anacardieae, Dobineae, Rhoeae, Semecarpeae e Spondiadeae). Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. Espécies da família Anacardiaceae têm se mostrado bastante promissoras na busca de substâncias bioativas. Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus*, *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. Destacam-se pelo número de investigações relativas à

composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a presença de flavonóides, terpenos, esteróides, xantonas e lipídios fenólicos e derivados (CORREIA et al., 2006).

2.3.1 *Spondias mombin*

A cajazeira, *Spondias mombin* L., pertence à família Anacardiaceae originária da região tropical do continente americano. Esta espécie encontra-se dispersa nas regiões tropicais da América, África e Ásia, sendo no Brasil encontrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste (SACRAMENTO; SOUZA, 2000). O centro de diversidade da espécie é a Amazônia Ocidental e a Mata Atlântica (MITCHELL; DALY, 1995).

A planta é uma árvore frutífera perene, de porte alto, lenhoso, de folhas caducas, tronco revestido por casca grossa e rugosa (LORENZI, 1992), que esgalha e ramifica na parte terminal. A copa é ampla, vistosa e imponente quando em fase de floração e frutificação. Um grande inconveniente dessa espécie é a altura da planta, que pode atingir 30 m de altura (ALVES et al., 2000).

Possui folhas imparipinadas, com 5 a 11 folíolos de 9-11 cm, possui inflorescência branca, muito pequena em cachos na extremidade dos ramos. Seu fruto é amarelado de forma ovóide com aproximadamente 2 – 4 cm de extensão, perfumado com mesocarpo carnoso, amarelo, de sabor agridoce, contendo carotenóides, açúcares, vitaminas A e C e com uma única semente (BARROSO et al., 1999). O fruto é também chamado de cajá-mirim ou taperebá no Brasil; *hogplum* ou *yellow mombin* na América do Norte (LEON; SHAW, 1990). A germinação das sementes é considerada boa, apesar de um pouco demorada. São árvores de médio a grande porte, consideradas de grande importância na recuperação de vegetação degradada, pela sua rusticidade, rapidez de crescimento e disseminação. Os frutos da cajazeira são muito apreciados pelo excelente sabor de sua polpa (FEITOSA, 2007).



Figura 6: *Spondias mombin* (cajazeira)



Figura 7: Frutos de *S. mombin*

Fonte: <http://www.oroverde.cz/data/bylinky/143.jpg>



Figura 8: Flores e folhas de *S. mombin*

Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/cajamirim/index.htm>

A madeira de *S. mombin* pode ser utilizada em marcenarias, enquanto a casca, os ramos e as folhas possuem propriedades medicinais (SACRAMENTO; SOUZA, 2000). A casca possui propriedades antidiarréica e antidesintérica. As folhas são usadas contra as dores de estômago, complicações do parto e enfermidades dos olhos e laringe. Compostos com propriedade antiviral foram identificados nas folhas, a partir do que o extrato passou a ser recomendado principalmente para combate a herpes (ALVES et al, 2000).

Os extratos da folha de *S. mombin* exibiram amplo espectro antibacteriano, efeitos comparáveis aos da ampicilina e gentamicina (ABO et al., 1999). A ação cicatrizante e antimicrobiana é atribuída ao teor elevado de taninos identificados nas folhas do cajá (NJOKU; AKUMEFALA, 2007).

Estudos desta planta com ação leishmanicida ainda não foram relatados, porém existem trabalhos realizados com plantas da mesma família. Treze extratos lipofílicos preparados com n-hexano de várias partes da planta *Pistacia vera* L. (Anacardiaceae) foram testados *in vitro* contra *L. donovani*. Na concentração de 4,8 mg/mL o extrato do galho da *Pistacia vera* inibiu significativamente o crescimento (77,3%) de *L. donovani* com CI_{50} de 2,3mg/mL (ORHAN et al., 2006).

Ayoka et al. (2006), através da análise fitoquímica do extrato bruto de *S. mombin* verificaram a presença de taninos, antraquinonas, flavonóides, glicosídeos e saponinas em extratos aquosos e metanólicos. Dentre as diversas atividades biológicas dos taninos que estão sendo pesquisadas, destaca-se a atividade leishmanicida *in vitro* sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* spp.

2.3.1.1 Taninos

Os taninos pertencem a um grupo de compostos polifenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (DESPHANDE et al, 1986). São derivados do metabolismo secundário das plantas e ocorrem em uma ampla variedade de vegetais. Apresentam alto peso molecular e contém grupos hidroxila- fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas com proteínas (HASLAM, 1966). A maioria dos vegetais é portador de taninos e podem ser encontrados nas raízes, lenho, cascas, folhas, frutos, sementes e seivas.

A quantidade e o tipo de taninos sintetizados pelas plantas variam consideravelmente, dependendo entre outras coisas da espécie, do cultivo e de

condições ambientais. Geralmente a concentração é maior em espécies que prosperam em solos agrícolas pobres ou de baixa calagem, tal como ocorre nas regiões tropicais e subtropicais (OTERO; HIDALGO, 2004). Tais metabólitos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (LI; MAPLESDEN, 1998).

Os taninos hidrolisáveis são constituídos de misturas de fenóis simples, unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (HAGERMAN; BUTLER, 1981). A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo hexadihidroxifênico (elagitaninos). Essa classe de metabólitos está presente em folhas, galhos, cascas e madeiras de várias árvores (SANTOS, 2000) e é encontrada em abundância em frutas e vagens de dicotiledôneas, mas não tem sido detectada em monocotiledôneas (LEWIS; YAMAMOTO, 1989). Os taninos condensados ou proantocianidinas são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol (catequina) e flavan-3,4-diol (leucoantocianidina), possuem estruturação complexa, são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura. Esses compostos estão presentes em gimnospermas e angiospermas, principalmente em plantas lenhosas e em outras classes de vegetais amplamente utilizados para a alimentação humana e animal (SALUNKHE et al., 1990).

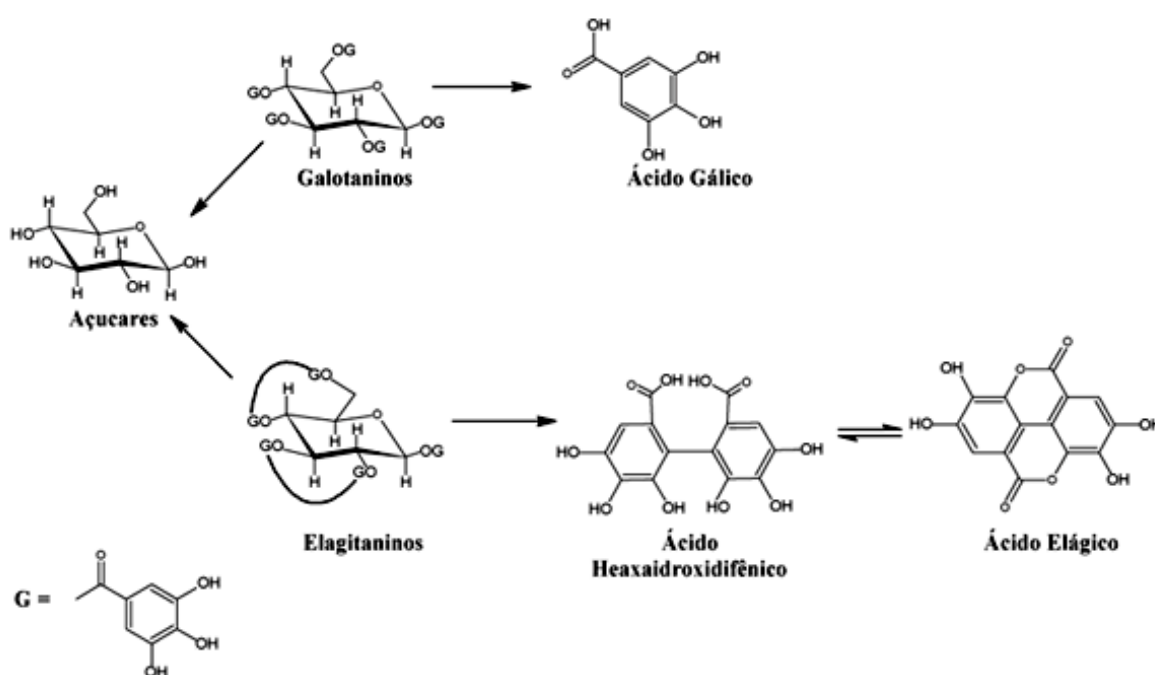


Figura 9: Taninos hidrolisáveis
Fonte: QUEIROZ et al. (2002)

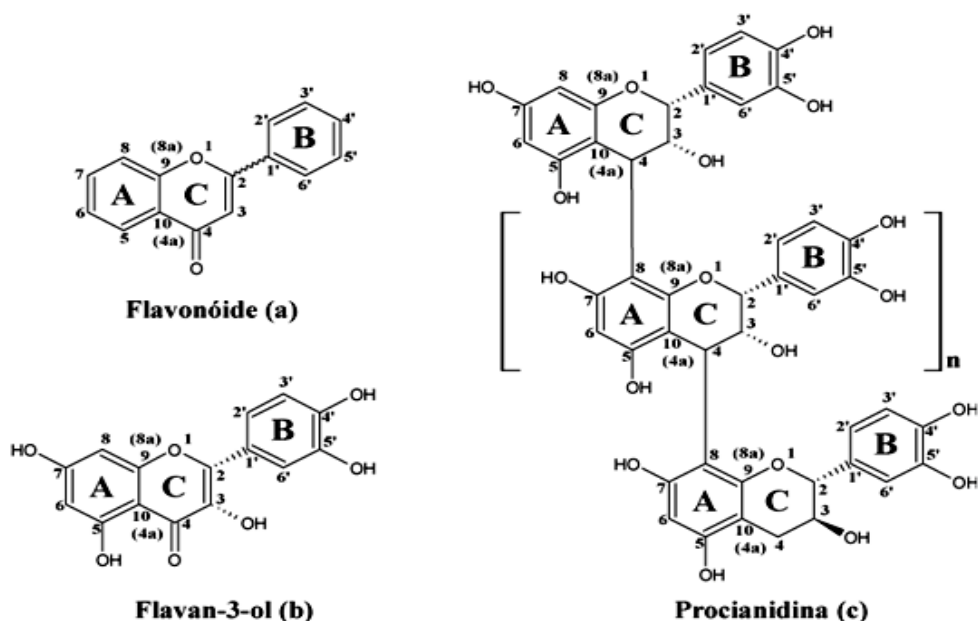


Figura 10: Fórmulas estruturais (a) flavonóide genérico; (b) Flavan-3-ol; (c) Procianidina (Tanino condensado)

Fonte: QUEIROZ et al. (2002)

Os taninos apresentam atividades biológicas de grande interesse na medicina devido à sua capacidade de formar complexos com íons metálicos como o ferro, manganês, cobre, alumínio; exercer atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e de formar complexos com outras moléculas incluindo polissacarídeos e proteínas (OKUDA, 2005). Os principais efeitos estão relacionados com a maior capacidade dos taninos condensados de interagir com proteínas, ao contrário do que ocorre com os taninos hidrolisáveis que são rapidamente degradados em grupos fenólicos menores, incapazes de reagir com essas moléculas (OTERO; HIDALGO, 2004).

O efeito leishmanicida de inúmeros polifenóis, incluindo fenóis simples, taninos hidrolisados e taninos condensados, foi estudado por Kolodziej e Kiderlen (2005). Nesse estudo, 67 taninos e compostos estruturalmente relacionados foram avaliados sobre formas promastigota e amastigota de *L. donovani* e *L. major*, tendo sido observada baixa toxicidade direta na forma promastigota, ocorrendo o inverso para a forma amastigota, a qual apresentou reduzida sobrevivência, sugerindo-se que o efeito dos polifenóis na forma amastigota pode ser devido à ativação dos macrófagos e não por

atividade antiparasitária direta. A CI_{50} de taninos hidrolisados (1-2 μ M) demonstrou uma atividade leishmanicida superior ao Pentostam®.

Extratos das plantas *Pelargonium sidoides* e *Phyllanthus amarus* contendo polifenóis, fenóis simples, flavon-3-óis, proantocianidinas e taninos hidrolisáveis foram estudados para observação da indução na produção do óxido nítrico e citocinas em células Raw 264.7 infectadas com *L. major*. Todos os extratos e compostos foram capazes de aumentar os níveis de óxido nítrico e citocinas em células parasitadas (KOŁODZIEJ et al., 2005).

Ainda, o extrato polifenólico da fibra da casca de *Cocos nucifera* foi avaliado sobre *L. amazonensis*. A concentração inibitória mínima do extrato que matou completamente as promastigotas foi de 10 μ g/mL. Um pré-tratamento em macrófagos de camundongos com 10 μ g/mL reduziu aproximadamente em 44% o índice de associação entre esses macrófagos e promastigotas de *L. amazonensis*, com concomitante aumento de 182% na produção de óxido nítrico em macrófagos infectados. O extrato inibiu tanto o crescimento de promastigotas como amastigotas de *L. amazonensis* depois de 60 minutos, não apresentando reação alergênica *in vivo* e efeitos citotóxicos *in vitro* (MENDONÇA-FILHO et al., 2004).

Os galotaninos foram encontrados em sementes de *Mangifera indica* (Anacardiaceae) e demonstraram efeitos antimicrobianos que se devem a propriedade dos taninos hidrolisáveis em formar complexos ligando-se a íons metálicos (ENGELS et al, 2009; CHUNG et al.,1998). A mesma atividade dos galotaninos foi relatada por TIAN et al. (2009a) e TIAN et al. (2009b) com a planta *Galla chinensis*. Em outro estudo com polifenóis, estes também foram relatados com ação antibacteriana, contudo os bioativos antibacterianos não foram caracterizados (KABUKI et al. 2001). Todavia, ENGELS et al. (2009) evidenciaram em pesquisas subseqüentes com taninos hidrolisáveis que a atividade antimicrobiana pode ser devido a presença de galotaninos, especialmente porque os perfis do HPLC (cromatografia de alta performance) dos extratos foram muito similares aos relatados por Kabuki et al. (2001). Outros efeitos biológicos atribuídos aos taninos são suas atividades antitumoral e antiviral (YANG et al. 2000).

A atividade antimicrobiana dos taninos tem sido atribuída a vários modos de ação, em particular a sua habilidade de interagir com proteínas e inibir atividades enzimáticas (KONISHI et al.,1993).

Os taninos e polifenóis podem precipitar proteínas e formam complexos insolúveis com muitos íons de metais pesados, alcalóides e glicosídeos e outros biopolímeros. Esta capacidade foi correlacionada com a proteção das plantas contra predadores, tais como animais, insetos e microorganismos (HASLAM, 1996; HATANO et al. 1999). Mais estudos sobre o isolamento de grande quantidade de taninos estão sendo feitos para obter um melhor entendimento da relação estrutura-função dos compostos fenólicos e examinar seu mecanismo de ação (ENGELS et al., 2009).

Kolodziej et al. (2001) relataram que diversos taninos demonstraram ter atividade contra amastigotas de *L. donovani* e que diferenças na atividade leishmanicida entre promastigotas e amastigotas podem ser devido às diferenças bioquímicas ou características metabólicas das duas fases do parasita. Além disso, o efeito direto em amastigotas pode ser indicativo de uma ativação das funções dos macrófagos.

As propriedades dos taninos *in vitro* como antioxidante, antiviral, antimicrobiana, inibidor enzimático, seqüestrador de radicais livres e potencial de ligação com proteínas levam a pesquisa sobre a sua possível atividade leishmanicida (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005).

2.4 Família Musaceae

A família Musaceae é composta pelos gêneros *Ensete* e *Musa*. O gênero *Musa* inclui mais de 60 espécies e está dividida em quatro seções: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys, Eumusa. As quatro seções estão separadas em dois grupos distinguíveis pelo seu número de cromossomos, sendo o primeiro grupo constituído por Australimusa e Callimusa, bananeiras com número básico de dez cromossomos ($n=10$); e o segundo grupo por Rhodochlamys e Eumusa, bananeiras com número básico de onze cromossomos ($n=11$). Morfologicamente, a distinção destes grupos pode ser feita observando-se as brácteas: as bananeiras com dez cromossomos apresentam externamente brácteas lisas, enquanto as bananeiras com onze cromossomos apresentam brácteas onduladas. As seções Rhodochlamys e Callimusa produzem frutos não comestíveis. A espécie *M. paradisiaca* enquadra-se na seção Eumusa, apresentando cachos e inflorescência masculina horizontais ou cadentes, seiva leitosa ou aguada (SOFFNER, 2001)

A maioria das bananas consumidas mundialmente são os frutos de *M. paradisiaca*, um híbrido entre as espécies *M. acuminata* originária da Malásia e *M. balbisiana*, encontrada na Índia e Filipinas (OLIVEIRA, 2007)

2.4.1 *Musa paradisiaca*

A espécie vegetal *Musa* sp., Musaceae, conhecida popularmente como bananeira, é abundantemente distribuída no Brasil, sendo nativa ou cultivada para fins principalmente alimentares, pois a banana, seu fruto, é amplamente consumida por apresentar grande valor nutritivo. Desenvolve-se em todas as regiões tropicais do mundo e o fruto representa grande importância econômica em muitos países em desenvolvimento. Em termos de valor de produção, dentre os alimentos de colheita, a banana é o quarto mais importante do mundo, depois de arroz, trigo e milho. *M. paradisiaca*, foi primeiramente descrita em sua morfologia e taxonomia por Linnaeus em 1753 em sua obra 'Species Plantarum'. É conhecida pelo nome popular bananeira e o seu fruto é denominado banana (OLIVEIRA, 2007)

A bananeira cultivada exige solo bastante drenado, profundo, rico em nutrientes minerais e ligeiramente ácido, além de condições pluviométricas anuais de 1200 mm e temperatura superior a 15°C. Trata-se de uma espécie vegetal arbustiva, que pode atingir 7m de altura, não apresentando caule, mas um pseudocaule formado pela superposição de bainhas foliares verde-claras e brilhantes, reunidas em grupos de 25cm de diâmetro na base. As folhas são os prolongamentos das referidas bainhas foliares dispostos em espiral; apresentam-se simples, pecioladas, com coloração verde-clara, apresentam comprimento de 2m a 2,5 m e largura de até 60 cm, o limbo é inteiro com nervuras principal e secundárias nítidas. A bananeira é uma planta perene, o seu ciclo vegetal dura cerca de um ano: o pseudocaule floresce ao final de sete meses, frutifica apenas uma vez quatro meses depois, e então morre. As inflorescências apresentam-se como uma haste, normalmente pendulosa, que suporta muitas brácteas avermelhadas envolvendo as flores de coloração clara. O fruto é uma baga longa e curva, falciforme, apresentando comprimento de 8-13cm e largura de 1,5-3cm. A casca do fruto maduro é amarela, envolvendo a polpa de coloração creme, que não apresenta sementes (MUDGE et al., 1995).



Figura 11: *Musa paradisiaca* (Bananeira)



Figura 12: Haste pendulosa contendo penca de frutos imaturos de *M. paradisiaca* e brácteas avermelhadas envolvendo flores.
Fonte: OLIVEIRA, 2007.

A região de origem da bananeira se encontra entre a Índia e as ilhas Molinésias do Pacífico, passando pela Indonésia e a Nova Guiné. Atualmente, a banana é cultivada em todas as regiões tropicais do planeta. O cultivo da banana foi introduzido nas Américas com a colonização européia, em cerca de 1500. Os principais países produtores na América Latina são Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Honduras, México; na Ásia são China, Índia, Filipinas, Indonésia, Tailândia, Vietnam; na África são Burundi e Tanzânia (ARIAS et al., 2003). Os principais estados brasileiros produtores dessa fruta são Pará, São Paulo, Bahia, Amazonas, Minas Gerais e Santa Catarina. Cerca de 90% da produção destina-se ao mercado interno para comercialização da fruta *in natura* e para fins industriais (SOFFNER, 2001).

Existe também a inclusão de valor farmacológico em *M. paradisiaca*, que historicamente é reportado 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 e antihelmíntico (NGO et al., 2009). As bananas imaturas são adstringentes e utilizadas para tratar diarreia. As folhas são usadas contra tosse e bronquite. As raízes podem deter hemoptise e possuem forte adstringência além de propriedades anti-helmínticas. A seiva pode ser utilizada para fins antiofídicos.

Estudos em animais demonstraram que o extrato de frutos verdes de *M. paradisiaca* reduz a glicemia em ratos normais e diabéticos (OJEWOLE; ADEWUNMI, 2003). Outras ações incluem atividade antimicrobiana do extrato da raiz devido ao alto conteúdo de taninos (GOEL et al., 1989). Ngo et al. (2009) relataram ainda a ação das folhas contra bronquite e resfriados e efeito vaso-relaxante em musculatura lisa.

Os compostos químicos reportados como presentes em *M. paradisiaca* incluem 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., 2009).

2.4.1.1 Fitosteróis

O fitosterol é, no reino vegetal, o equivalente ao colesterol entre os mamíferos. Portanto, são compostos derivados alcoólicos do ciclopentanoperhidrofenantreno, essenciais na formação e estabilização da estrutura da membrana celular dos vegetais

(LAW, 2000). Embora Law (2000) tenha referido a existência de cerca de 40 fitosteróis, Moreau et al. (2002), citaram que, atualmente há mais de 200 tipos identificados. Os fitosteróis mais encontrados são os 4 desmetilesteróis, beta-sitosterol, campesterol e estigmasterol (JONES et al., 2000)

Os esteróides presentes em maior abundância em *M. paradisiaca* são o estigmasterol e o beta-sitosterol, sendo que apresentam ações biológicas semelhantes visto que são fitoesteróides. No entanto o estigmasterol apresenta maior semelhança estrutural com as substâncias hormonais de origem animal (OLIVEIRA, 2007).

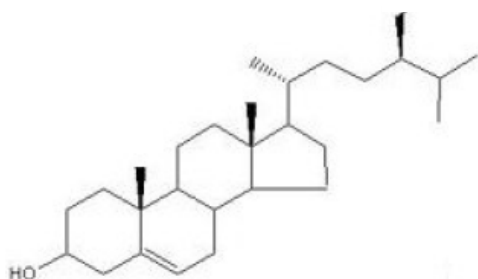


Figura 13: Forma estrutural do β -sitosterol
Fonte: OLIVEIRA, 2007.

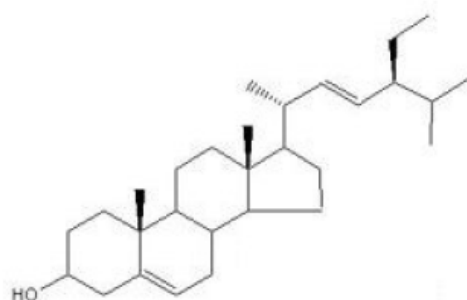


Figura 14: Forma estrutural do Estigmasterol
Fonte: OLIVEIRA, 2007.

Tal grupo de substâncias está presente nas membranas celulares de espécies vegetais superiores, assumindo uma grande variedade de atividades biológicas específicas, em adição aos seus papéis como constituintes na bicamada lipídica. Em células vegetais, os fitoesteróides são encontrados em grande concentração também em frações particuladas e no desenvolvimento de plastídios em cloroplastos, participando do transporte intracelular da fração microssomal para a fração cloroplástica (LEHNINGER et al., 1995). As substâncias esteroidais presentes em vegetais freqüentemente ocorrem em sua forma não-livre, ou seja, como derivados mais complexos, como glicosídeos ou ésteres com ácidos graxos ou aromáticos (ROBINSON, 1991).

Bouic e Lamprecht (1999) constataram que uma mistura de beta-sitosterol e seu glicosídeo melhoravam a atividade de linfócitos-T e células natural *killer*. Foram citados os benefícios futuros que poderiam advir desse efeito no âmbito do tratamento das

infecções virais crônicas, alergias e câncer. Nishioka et al (2002) estudaram a ação do extrato de semente de *Eriobotrya japonica* em ratos com hepatopatia constatando melhora que pode ser atribuída aos fitoesteróis. As ações antimicrobiana e anti-inflamatória de *Mallotus peltatus* foram observadas contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophytus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, além do fungo de pele *Microsporum gypseum*. Num modelo de inflamação em ratos, detectaram efeito antiinflamatório. Atribui-se parte dos efeitos à combinação de algumas substâncias, dentre elas o beta-sitosterol. O mesmo efeito antiinflamatório do beta-sitosterol e estigmasterol isolados das folhas de *Croton pullei* foram contemplados por ROCHA et al. (2008), apesar dos mecanismos responsáveis pelo efeito ainda não estarem completamente esclarecidos. Outro efeito observado utilizando *M. paradisiaca* foi antiulcerogênico e os dois compostos responsáveis foram dois acilglicosídeos de beta-sitosterol (KOVGANKO; KASHKAN, 1994).

Ações imunomoduladoras em nível celular também vêm sendo exploradas, além de possíveis propriedades cosméticas em pele e cabelos (DE STEFANI et al., 2000).

Ramesh et al. (2002) avaliaram o efeito anti-microbiano de *Begonia malabarica*. Houve atividade contra bactérias gram-negativas, evidenciando potencial para uso em tratamentos de infecções do trato respiratório, diarreias e doenças de pele. Dentre os 6 compostos identificados na planta, um deles foi o beta-sitosterol e o outro beta - sitosterol -3-b-D-glicopiranosídeo.

Na literatura não existem trabalhos que relatem o uso de fitosteróis, com ação leishmanicida, mas como relatado anteriormente sabe-se que possuem atividade antimicrobiana, antiinflamatória (NISHIOKA et al.,2002), anticarcinogênica (AWAD; FINK, 2000) e hipocolesterolemiantes (LAW,2000), podendo apresentar atividade leishmanicida.

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose grave, sem tratamento eficaz do seu principal reservatório doméstico mantenedor da cadeia epidemiológica da doença, o cão. Os desmatamentos intensos expandiram o habitat dos flebotomíneos, que inicialmente predominavam o meio rural e foi difundindo para o meio urbano no peri e intradomicílio, possibilitando o aumento do número de casos da doença. A necessidade da eliminação dos cães infectados, dada a sua relevância como reservatório doméstico da doença, tem trazido um grande impacto social, pois o sacrifício destes animais é sempre traumático para os proprietários e de difícil execução pelas autoridades sanitárias. A maior gravidade neste processo é a possibilidade de cães infectados, ainda assintomáticos, funcionarem como reservatórios da doença, arriscando a saúde de outros animais e de pessoas co-habitantes das regiões afetadas. Isto resulta na necessidade de desenvolver novas tecnologias de controle e tratamento na busca por qualidade de vida e controle de doenças de importância em saúde pública. Assim, a descoberta de compostos naturais com atividade leishmanicida, como os metabólitos secundários, vêm surgindo como uma alternativa para o tratamento da LV e tornando um desafio para a ciência, estimulando a pesquisa com o uso de substâncias provenientes de plantas.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Frações provenientes das folhas da cajazeira (*Spondias mombin*) e bananeira (*Musa paradisiaca*) possuem atividade leishmanicida *in vitro* sobre *L. chagasi*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* de frações obtidas a partir das folhas da cajazeira (*S. mombin*) e bananeira (*M. paradisiaca*).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos brutos das folhas da cajazeira e bananeira;
- Realizar análise fitoquímica dos extratos;
- Obter frações dos extratos através de coluna cromatográfica;
- Determinar as frações que possuem compostos mais puros;
- Testar a eficácia *in vitro* das frações da etapa anterior sobre as formas promastigotas e amastigotas da *L. chagasi* bem como determinar a citotoxicidade sobre células RAW 264.7.
- Identificar e determinar a estrutura química e as substâncias das frações mais eficazes sobre as formas promastigota e amastigota através de ressonância magnética nuclear de H^1 e C^{13} e análise espectroscópica no infravermelho.

6 CAPÍTULO 1

Atividade leishmanicida *in vitro* de frações de *Musa paradisiaca* L. e *Spondias mombin* L.

Leishmanicidal activity *in vitro* of *Musa paradisiaca* L and *Spondias mombin* L fractions. Periódico: Veterinary Parasitology (Submetido em outubro de 2009).

**Leishmanicidal activity *in vitro* of *Musa paradisiaca* L
and *Spondias mombin* L fractions**

Marina Parissi Accioly^a, Claudia Maria Leal Bevilaqua^{a*}, Fernanda C. M. Rondon^a,
Selene Maia de Moraes^b, Lyeghyna K.A. Machado^b, Camila A. Almeida^a, Heitor Franco
de Andrade Junior^c, Roselaine P. A. Cardoso^c

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/Universidade Estadual do Ceará; ^bLaboratório de
Protozoologia/Universidade de São Paulo

*Corresponding author

Av. Paranjana, 1700

60740-913 Fortaleza, Ceará, Brazil

Tel. 55.85.31019853; Fax 55.85.31019840

E-mail: claudia.bevilaqua@pq.cnpq.br

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease characterized by infection of mononuclear phagocytes by *Leishmania chagasi*. The primary vector is *Lutzomyia longipalpis*, and the dog is the main domestic reservoir. The control and current treatment of dogs using synthetic drugs have not shown effectiveness in reducing the incidence of disease in man. In an attempt to find new compounds with leishmanicidal action, plant secondary metabolites have been studied in search of treatments of VL. This study aimed to evaluate the leishmanicidal activity of fractions of *Musa paradisiaca* (banana tree) and *Spondias mombin* (cajazeira) on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi*. Phytochemical analysis was performed on crude extracts of the leaves, and fractions were isolated by column chromatography. Thin layer chromatography was used to separate the fractions with the purest substances to be used in *in vitro* tests. The *in vitro* tests on promastigotes of *L. chagasi* used the MTT colorimetric method, and the ELISA method was used *in situ* against amastigotes in addition to cytotoxicity in RAW 264.7 cells. Of the 13 fractions tested, methanol:acetate (80:20) and acetate:methanol (70:30) from *S. mombin* had no action against either form of the parasite. The best result was obtained with the acetate:methanol (80:20) fraction from *S. mombin*, which resulted in an IC₅₀ of 11.26 µg/ml against

promastigotes and 0.27 µg/ml against amastigotes. The acetate:methanol (50:50), 100% methanol, and acetate:methanol (20:80) fractions of *M. paradisiaca* and methanol:acetate (80:20), acetate:methanol (50:50), and acetate:methanol (30:70) fractions of *S. mombin* were cytotoxic to RAW 264.7 cells. The acetate:methanol (80:20) fraction of *S. mombin* gave the best result and is a good candidate for evaluation in *in vivo* tests.

Keywords: Visceral leishmaniasis, secondary metabolites, banana tree, cajazeira.

Introduction

Leishmaniasis is a zoonotic disease with worldwide distribution and is considered by the World Health Organization (WHO) one of the six most important tropical diseases. Visceral leishmaniasis (VL) is caused by the subgenus *Leishmania leishmania*, *Leishmania donovani* complex (Gontijo and Melo, 2004, Rath et al. 2003). It is considered endemic in the Mediterranean and extends to Latin America from Mexico to Argentina (Lainson and Rangel, 2005). Although several animal species may become infected (Luppi et al. 2008), the main domestic reservoir of this disease is the dog (Diniz et al. 2008), and *Lutzomyia longipalpis* is the primary sand fly vector (Wood et al. 2003). As recommended by the WHO, the control of LV is highlighted by the serological survey of dogs and euthanasia in cases in which they are positive, diagnosis and treatment of human cases and residual insecticide application based on pyrethroid (Melo, 2004). Treatment of dogs with drugs used in humans, such as N-methylglucamine, sodium stibogluconate, amphotericin B and others, may decrease the symptoms, but are not able to eliminate all of the parasites. Therefore, the use of drugs in dogs is very limited and results in the dog remaining infected, maintaining the transmission cycle (Mishra et al. 2009). In Brazil, ministerial decree No. 1426 of July, 11th, 2008, prohibits the treatment of canine visceral leishmaniasis with products for human use or those not registered in the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Therefore, there is a need to develop new therapies aimed at control and treatment in the quest for a better quality of life and control of diseases of public health importance (Araújo 2006).

The use of medicinal plants and studies on the chemistry and pharmacology of natural products have grown considerably in the second half of the 20th century

(Albuquerque et al., 2007). Many compounds derived from natural sources have pharmacological activities and may be used for drug development (Lawrence 2003). Several compounds isolated from plants, such as terpenoids, aminosteroids, flavonoids, alkaloids, phenolic compounds and naphthoquinones, have been studied to evaluate their effects on promastigotes and amastigotes of different species of leishmania. Some of these substances can be found in the leaves of cajazeiras, banana trees and other plants common in the Brazilian Northeast, are easily accessible to the population, and have been reported as having biochemical and pharmacological activities *in vitro* (Kolodziej et al. 2005). Compounds from banana tree leaves, such as tannins, have shown antimicrobial properties (Olivo et al, 2007), and the leaves from the cajazeira have shown healing action in addition to antimicrobial properties (Njoku and Akumefala, 2007). The objective of this study was to evaluate the leishmanicidal effect *in vitro* of the fractions obtained from crude extracts of leaves of cajazeiras (*Spondias mombin*) and banana trees (*Musa paradisiaca*) on promastigotes and amastigotes of *L. chagasi*.

Material and methods

Collection of plants

Samples of the aerial parts of *S. mombin* and *M. paradisiaca* were collected and identified in the Herbarium Prisco Bezerra at the Universidade Federal do Ceará, under numbers 44919 and 44920, respectively.

Obtaining the fractions and chemical analysis

The leaves of cajazeiras and banana trees were collected on the campus of the Universidade Estadual do Ceará in Fortaleza, Brazil, and dried at room temperature for seven days. The plants were ground, weighed (1.905 kg and 1.405 kg respectively) and immersed in methanol:water 4:1 (v/v) for 15 days (Queiroz et al. 2002). The crude extracts were obtained by filtration and evaporation of solvents using a rotary evaporator.

The extract of each plant was submitted to column chromatography, which used the solvents hexane, chloroform, methanol and acetate as the mobile phase. Thin layer chromatography was performed on these fractions. The purer compounds were stored at

room temperature until use. These compounds were submitted to spectroscopic methods of organic analysis, including nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon-13 for identification and determination of chemical structures and infrared spectroscopic analysis.

The qualitative phytochemical tests of phenols, tannins, catechins, leucoanthocyanidins, flavonoids, steroids, terpenes, saponins and alkaloids were carried out in accordance with Matos (1997).

In vitro tests

Strains of *L. chagasi* MHOM46/LC/HZ1 were grown in M199 plus 10% fetal calf serum, 5% sterile human urine, and 40 mg/ml gentamicin in a BOD chamber at 23.6°C (Tempone et al, 2005). The fractions at concentrations of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/ml were added to the plates with logarithmic phase promastigotes and left overnight. The viability of parasites was evaluated using the tetrazolium dye (MTT) colorimetric method. Subsequently, 10% SDS and 4 N HCl were added and the plate was read at 570 nm using a microplate reader. The experiment included pentamidine (40µg/ml) as a positive control and the medium without treatment as a negative control.

RAW 264.7 cells grown in Dulbecco's medium plus 10% fetal calf serum and 40 mg/ml gentamicin were seeded in 96-well plates, incubated at 36.6°C in 5% CO₂ for 4 days and infected with promastigotes in the proportion 10 parasites:1 macrophage for 24 hours. The fractions were added and incubated overnight. Thereafter, the testing was performed *in situ* by ELISA, using the modified methodology of Piazza (1994). Saponin (0.01%, Sigma) diluted in 1x PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (Sigma) was added to microplates for 30 minutes at 37°C. Blocking was done with 1x PBS plus 5% skim milk for 30 minutes at 37°C. Plates were washed 3 times, and the serum of immunized rabbits diluted 1:500 in 1x PBS plus 3% skim milk, 0.05% Tween-20 and 10% fetal calf serum was added after drying and maintained overnight at 37°C. Conjugated anti-rabbit IgG (Sigma) was diluted 1:10,000 in PBS plus 3% skim milk and 0.05% Tween-20 was added, and after further washing, orthophenylenediamine chromogen (OPD) was added. The reaction was stopped using 4 N HCl and read at 492 nm in a microplate reader. The experiment included amphotericin B (40 µg/ml) as a positive control and medium with cells and promastigotes as a negative control.

Cytotoxicity

RAW 264.7 cells grown in Dulbecco's medium plus 10% fetal calf serum and gentamicin were incubated in 96-well plates for 4 days at 36.6°C in 5% CO₂. The cells not adsorbed were removed, and the fractions were added and incubated overnight. OPD was added, and the reaction was stopped using 4 N HCl and read at 492 nm in a microplate reader.

Statistical analysis

The IC₅₀ 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.

Results

The phytochemical analysis of crude extracts of *S. mombin* revealed the presence of hydrolyzable tannins and saponins. In the crude extract of *M. paradisiaca*, the phytochemical analysis showed condensed tannins and steroids. In search of natural products with leishmanicidal action, we used fractions from the methanol extracts of native plants from the tropics. In total, 13 fractions from the crude extract from the leaves of *M. paradisiaca* and *S. mombin* were obtained, 5 and 8, respectively. IC₅₀ values for promastigotes, amastigotes and cytotoxicity are shown in Table 1.

The infrared spectrum of acetate:methanol (70:30), 100% methanol, acetate chloroform (90:10) and acetate:methanol (80:20) fractions of *S. mombin* revealed the presence of phenolic hydroxyl (3408 cm⁻¹ to 3236 cm⁻¹), ester carbonyl (1742 cm⁻¹, to 1718 cm⁻¹), bands of aromatic skeletons (1625 cm⁻¹ to 1409 cm⁻¹) and CO function ester links with sugar (1377 cm⁻¹ to 1004 cm⁻¹). All fractions showed the same spectroscopic characteristics of gallotannins, hydrolysable tannins, confirmed by the blue color in presence of FeCl₃ solution.

The result of spectroscopic methods of organic analysis of magnetic resonance in the hexane: chloroform (50:50) fraction of *M. paradisiaca* showed absorptions in the

spectra of carbon-13 and hydrogen corresponding to a mixture of the phytosterols β -sitosterol and stigmasterol.

The other four fractions from *M. paradisiaca* display a green color in presence of FeCl_3 solution characteristic of condensed tannins. The infrared spectrum of these fractions showed similar absorption bands in 3406 to 3347 cm^{-1} (O-H from phenol and alcohol functions), 1740 to 1680 cm^{-1} (C=O of carbonyl group), 1640 , 1528 , 1429 cm^{-1} (aromatic skeletal bands), 1242 to 1234 cm^{-1} (C-O from phenol group) and 1076 to 1107 cm^{-1} due to C-O alcohol and ether groups, which are due to condensed tannins, confirming the phytochemical color test.

From the fractions tested, seven had good *in vitro* activity against promastigotes, and the most effective fraction was 100% methanol from *M. paradisiaca*, with IC_{50} of $1.70\text{ }\mu\text{g/mL}$. No fraction differed statistically from the positive control pentamidine. The hexane: chloroform (50:50), methanol 100%, acetate:methanol (90:10) fractions of *M. paradisiaca* and acetate:methanol (80:20), acetate: chloroform (90:10), acetate:methanol (70:30), chloroform:acetate (80:20) and 100% methanol fractions of *S. mombin* had good leishmanicidal activity *in vitro* against *L. chagasi* amastigotes, resulting in IC_{50} values of $15.07\text{ }\mu\text{g/mL}$, $16.54\text{ }\mu\text{g/mL}$, $14.18\text{ }\mu\text{g/mL}$, $10.68\text{ }\mu\text{g/mL}$, $0.27\text{ }\mu\text{g/mL}$, $0.61\text{ }\mu\text{g/mL}$, $42.16\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $17.07\text{ }\mu\text{g/mL}$, respectively. No fraction differed from the positive control amphotericin B. Regarding cytotoxicity values from fractions of *M. paradisiaca*, just acetate: methanol (50:50) caused low mortality cells (36%), the other fractions have killed more than 60% of the cells. About the fractions of *S. mombin*, the fraction chloroform: acetate (80:20) was not toxic to cells, and fractions acetate: methanol (80:20) and acetate: methanol (30:70) showed low cytotoxicity, 22.9% and 10.3%, respectively. The fraction that showed the best *in vitro* activity against both forms of the parasite and no cytotoxicity to RAW 264.7 cells was acetate:methanol (80:20) from *S. mombin*, with IC_{50} values of $11.26\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $0.27\text{ }\mu\text{g/mL}$ against promastigotes and amastigotes, respectively.

Table 1. IC₅₀ values of the fractions extracted from the leaves of banana tree (*M. paradisiaca*) and cajazeira (*S. mombin*).

Fractions	IC ₅₀ promastigotes (µg/ml)	IC95%	IC ₅₀ amastigotes (µg/ml)	IC95%	Citotoxicity (100µg/ml) % mortality
<i>Musa paradisiaca</i>					
hexane:					
chloroform (50:50)	915.2 ^a	3.41-24.441	15.07 ^b	3.71-61.30	63.2
acetate: methanol (50:50)	21.60 ^a	11.12-41.95	95.31 ^{bc}	15.00-605.5	36.3
methanol 100%	1.70 ^a	0.02-12.91	16.54 ^b	6.36-42.98	68.7
acetate: methanol (20:80)	14.72 ^a	3.72-57.12	216.10 ^c	96.11-485.8	64.3
acetate:methanol (90:10)	1.83 ^a	0.34-9.79	14.18 ^b	2.60-77.15	72.4
<i>Spondias mombin</i>					
acetate: methanol (70:30)	556.41 ^a	0.02-1,683	10.68 ^b	5.28-21.61	58.6
acetate: methanol (80:20)	11.26 ^a	8.5-148.76	0.27 ^a	0.02-3.28	22.9
acetate: chloroform (90:10)	253.60 ^a	8.37-7,683	0.61 ^a	0.13-2.95	31.3
methanol 100%	58.10 ^a	28.25-119.50	42.16 ^b	29.54-60.17	40.2
methanol:acetate (80:20)	1,116 ^a	47.20-55, 308	22, 465 ^{bc}	14.82-340, 000	58.6
acetate:methanol (50:50)	12.60 ^a	12.39-128.19	41.38 ^b	22.58-75.83	63.5
acetate:methanol (30:70)	1,065 ^a	165.30-6, 859	739.90 ^{abc}	0.36-1, 524	10.3
chloroform:acetate (80:20)	246.10 ^a	3.92-15, 458	17.07 ^{abc}	2.43-119.60	0.0
Pentamidine	0.29-52.99 ^a	0.01-497.30	-	-	-
Amphotericin B	-	-	4.08-219.20 ^{abc}	0.58-28.68	-

Equal letters in the same column show that there was no statistical difference with p> 0.05.

Discussion

The phytochemical analysis of a crude extract of *S. mombin* was similar to that described by Ayoka et al. (2005), which confirmed the presence of tannins, anthraquinones, flavonoids, glycosides and saponins in aqueous and methanol extracts. Additionally, Oliveira (2007) reported that a crude extract of *M. paradisiaca* contained the presence of tannins, eugenol, phenolic compounds, anthocyanins, alkaloids and phytosterols, such as β -sitosterol and stigmasterol, similar to this work.

The gallotannins present in *S. mombin* fractions were also found in the seeds of *Mangifera indica* and showed antimicrobial effects, probably because of the property of hydrolyzable tannins to form complexes by binding to metal ions (Engels et al. 2009). The same activity of gallotannins was reported by Tian et al. (2009a) and Tian et al. (2009b) in the plant *Galla chinensis*. There are also reports of polyphenols with antibacterial action, but the principle antibactericidals were not characterized (Kabuki et al. 2001). However, Engels et al. (2009) showed in subsequent searches with hydrolyzable tannins that antimicrobial activity may be due to the presence of gallotannins, especially since the HPLC extract profiles were very similar to those reported by Kabuki et al. (2001). Other biological effects attributed to the tannins are their antiviral and antitumor activities (Yang et al. 2000). The antimicrobial activity of hydrolyzable tannins has been attributed to several mechanisms of action, particularly its ability to interact with proteins and inhibit enzymatic activity (Konishi et al. 1993). Another mechanism may be related to the ability of complexation with metal ions (Chung et al. 1998). This ability was correlated with the protection of plants against predators, such as animals, insects and microorganisms (Hatano et al. 1999). However, further studies of isolation of large amounts of hydrolyzable tannins are being performed to obtain a better understanding of the structure-function relationship of phenolic compounds and examine their mechanism of action (Engels et al., 2009). Kolodziej et al. (2001) reported that several tannins have demonstrated activity against amastigotes of *L. donovani* and that differences in the leishmanicidal activity between promastigotes and amastigotes may be due to differences in biochemical or metabolic characteristics of the two stages of the parasite. Furthermore, the direct effect on amastigotes may be indicative of an activation of the functions of macrophages.

With respect to the phytosterols β -sitosterol and stigmasterol found in the hexane:chloroform (50:50) fraction from *M. paradisiaca*, there are no studies that report leishmanicidal action; however, antimicrobial, anti-inflammatory (Nishioka et al., 2002), anti-carcinogenic (Awad and Fink, 2002) and cholesterol-lowering (Law, 2000) activities have been demonstrated. Bouic and Lamprecht (1999) reported that β -sitosterol increased the activity of T-lymphocytes and natural killer cells. Nishioka et al. (2002) reported that the antimicrobial and anti-inflammatory actions of *Mallotus peltatus* were caused by a combination of several substances, among them β -sitosterol. The same anti-inflammatory effects of β -sitosterol and stigmasterol isolated from the leaves of *Croton pullei* were observed by Rocha et al. (2008), although the mechanisms responsible for the effect are not yet fully understood. Another biological activity demonstrated in *M. paradisiaca* was antiulcerogenic, and the two compounds responsible were two acylglycosides of β sitosterol (Kovganko and Kashkan, 1994).

We conclude that some fractions used showed good leishmanicidal activity *in vitro*, suggesting the use of herbal and natural products as potential agents for the treatment of tropical diseases caused by protozoa. The gallotannins and phytosterols are probably the secondary metabolites responsible for this activity and are promising compounds for further studies conducted *in vivo*.

Acknowledgments

This work received financial support from CNPq (grant 464390/0). Dr. Claudia M. L. Bevilaqua and Selene Maia de Moraes have a grant from CNPq. Authors would like to thank Dr. Nilce Viana Gramosa (CENAUREN/UFC) for obtaining the spectra of ^1H and ^{13}C NMR.

References

- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Neto, E.M.F.L., 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.
- Araújo, M.S.S., 2006. Alterações imunológicas no sangue periférico de cães submetidos à imunoprevenção para leishmaniose visceral canina 180p. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- Awad , A.B., Fink, C.S.,2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of nutrition*. 130, 2127-2130.
- Ayoka, A.O., Akomolafe, R.O., Iwalewa, E.O., Akanmub, M.A., Ukponmwan, O.E.,2006. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 103, 166–175.
- BOUIC, P.J., LAMPRECHT, J.H., 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating properties. *Alternative Medicine Review*. 4,170-177.
- Chung K T, Wei C, Johnson M G, Are tannins a doubleedged sword in biology and health?, 1998. *Trends and Food Science & Technology* .9, 168-175.
- Diniz,S.A., Silva, F.L., Carvalho, A.V., Bueno, R., Guerra, R.M.S.N.C., Abreu-Silva,A.L., Santos, R.L., 2008. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban áreas. *Journal of infection in developing countries*. 2, 24-33.
- Engels, C., Knödler, M., Zhao, Y., Carle, R., Gänzle, M.G., Schieber, A., 2009. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from Mango (*Mangifera indica*) kernels. *Journal of agricultural and chemistry*. 57, 7712-7718.
- Gontijo, C.M.F., Melo, M.N.,2004.Leishmaniose Visceral no Brasil:quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 7, 338-347.
- Hatano T, Yoshida T, Hemingway R, 1999. Interactions of flavonoids with peptides and proteins and conformations of dimeric flavonoids in solution. In: Gross, et al. (Eds.), *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 509–526.
- Kabuki T,Nakajima H, Arai M, Ueda S,Kuwabara Y, Dosako S, 2001. Characterization Kolodziej, H., Kinderlen, A.F., 2005. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasited RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*. 66, 2056-2071.
- Kolodziej,H., Kayser,O., Kinderlen,A.F., Ito.,H., Hatano,T., Yoshida,T., Foo,L.Y., 2001.Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor factor- α -release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 9,1016-1021
- Konish K, Adachi H, Ishigaki N, Kanamura Y, Adachi I, Tanaka T, Nishioka I, Nonaka G, Horikoshi I, 1993. Inhibitory effects of tannins on NADH dehydrogenases of various organisms. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 16, 716-718.

Kovganko N, Kashkan Z, 1994. Advances in the chemical transformation of β -sitosterol. *Chemistry of Natural Compounds*. 30, 533.

Lainson, R.R., Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil— a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100, 811–827.

Law, M., 2000. Plant sterol and stanol margarines and health. *British Medical Journal*. 30, 861-864.

Lourenço, M.V., 2003. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. *O Biológico*. 65, 63-65.

Luppi, M.M., Malta, A. M.C., Silva, T.M., Silva, F.L., Motta, R.O., Miranda, I., ECCO, R., SANTOS, R.L., 2008. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 155, 146-151.

Madeira, M. F., Uchoa, C. M. A., Leal, C. A., Silva, R. M. M., Duarte, R., Magalhães, S. C. M., Serra, C. M. B., 2003. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36, 551-555.

Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*, Fortaleza: UFC, 1997. 126p.

Melo, M.N., 2004. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 23, 41-45.

Mishra, B.B., Kale, R.R., Singh R.K., Tiwari, V.K., 2009. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*. 80, 81–90.

Nishioka, Y., Yoshioka, S., Kusunose, M., Cui TaiLin., Hamada, A., Ono, M., Miyamura, M., Kyotani, S., 2002. Effects of extract derived from *Eriobotrya japonica* on liver function improvement in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 25, 1053-1057.

Njoku, P.C., Akumefala, M.I., 2007. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias Mombin* Leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*. 6, 613-615.

Of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L) kernel seeds. *Food chemistry*. 71, 61-66.

Oliveira, A.B., 2007. Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de *Musa paradisiaca* L., Musaceae. p.112. Defesa de dissertação. Curitiba, Paraná.

- Olivo, C. J., Techio, P. L. E., Madruga C.N., Vogel, F. F., Heinzmann, B. M., Neves, A. P ., 2007. Uso da bananeira (*Musa* spp.) no controle de parasitas de animais domésticos: do empirismo à ciência. *Livestock Research for Rural Development*. 19.
- Piazza, R.M.F., Andrade, H.F., Umezawa, E.S., Katzin, M., Stolf, A.M.S., 1994. In situ immunoassay for the assessment of *Trypanosoma cruzi* interiorization and growth in cultured cells. *Acta Tropica*. 57, 301-306.
- Queiroz, C.R.A., Morais, S.A.L., Nascimento, E.A., 2002. Caracterização dos taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*. 26, 485-492.
- Rath, S., Trivelin, L.A., Imbrunato, T.R., Tomazela, D.M., Jesus, M.N., Marzal, P.C., Andrade Junior, H.F., Tempone, A.G., 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*. 26, 550-553.
- Rocha, F.F., Neves, E. M.N., Costa, E.A., Matos, L.G., Müller, A. H., Guilhon, G.M.S.P., Cortes, W.S., Vanderlinde, F.A., 2008. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 18, 344-349.
- Tempone, A.G., Borborema, S.E.T., Andrade Jr, H.F., Amorim G. N.C., Yogi, A., Carvalho, C.S., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Fisher, D.C.H., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. *Phytomedicine*. 12,382-390.
- Tian F, Li B, Ji B, Yang J, Zhang G, Chen Y, Luo Y, 2009a. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: the polarity affects the bioactivities. *Food chemistry*. 133, 173-179.
- Tian F, Li B, Ji B, Yang J, Zhang G, Luo Y, 2009b. Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT-Food Science and Technology*. 42,1289-1295
- Yang L, Lee C Y, Yen K, 2000. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemic cells. *Cancer Letters*. 157, 65–75.

7 CONCLUSÕES

O potencial biológico proveniente do reino vegetal é uma fonte inesgotável para investigação científica de novas drogas que possam vir a ser utilizadas no tratamento das infecções e afecções do homem e animais, melhorando a qualidade de vida. A pesquisa por produtos oriundos de espécies vegetais tem se intensificado por eles possuírem grande diversidade molecular que é primordial para produção de novos fármacos.

Na investigação para a atividade leishmanicida com 13 frações provenientes das folhas de *M. paradisiaca* e *S. mombin*, todas apresentaram atividade contra promastigotas e/ou amastigotas de *L. chagasi*.

Taninos e fitoesteróis, compostos encontrados nas folhas de *S. mombin* e *M. paradisiaca*, respectivamente, podem ser os responsáveis pela atividade observada, indicando a necessidade de estudos futuros para a avaliação da atividade em infecções *in vivo*.

8 PERSPECTIVAS

As perspectivas para a cura da leishmaniose são ainda incertas, mas o progresso nos aspectos imunológicos, parasitológicos e bioquímicos desta doença, além do desenvolvimento de novas técnicas e melhoria da extração, análise e identificação de novos compostos a partir de plantas estão convergindo em busca de avanços no tratamento da doença.

Uma completa elucidação da atividade leishmanicida dos compostos químicos será possível com a avaliação do seu mecanismo de ação.

O estudo mais completo do potencial leishmanicida de *S. mombin* e *M. paradisiaca*, será através do isolamento dos diversos constituintes das frações com melhores resultados para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO, K.A.; OGUNLEYE, V.O.; ASHIDI, J.S. Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *cróton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. *Phytotherapy Research*, v.13 p. 494-497, 1999.

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

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

ALVES, R. E.; FILGUIERAS, H. A.. C.; MOURA, C.F.H. Org. *Caracterização de frutas nativas da América Latina*. Jaboticabal: UNESP/SBF, 2000.

AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.16, n.2, p.89–203, 2002.

ARIAS, P.; DANKERS, C.; LIU, P.; PILKAUSKAS, P. *The world banana economy 1985-2002*. Rome: 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5102e/y5102e00.htm> Acesso em: 26 outubro 2009.

AWAD, A.B.; FINK, C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition*, v.130, p.2127-2130, 2000.

AYOKA, A.O.; AKOMOFALÉ, R.O.; IWALEWA, E.O.; AKANMU, M.A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.103, p. 166-175, 2006.

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

BANETH, G. A review of the treatment of canine leishmaniasis. In: *Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sevilla, Spain, p. 15-20, 2002.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 106, p. 315-324, 2002.

BANGS, J. D.; RANSOM, D. A.; NIMICK, M.; CHRISTIE, G. H. In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 114, p. 111-117, 2001.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Viçosa:Universidade Federal de Viçosa, p. 433, 1999.

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

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Disease*, v. 24, p. 684-703, 1997.

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

BIZZETI, M.; ARITI, G.; MANCIANTI, F.; FRANCESCHI, A.; SGORBINI, M. Valutazione dell'efficacia dell'associazione ibafloxacin-metronidazolo nella terapia della leishmaniosi canina: Studio preliminare. *Annali Facoltà di Medicina Veterinaria*, v.61, p. 171-179, 2006.

BORASCHI C.S.S.; NUNES C.M. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral urbana no Brasil. *Clinica Veterinária*, v.71, p.44-48, 2007.

BOUIC, P.J.; LAMPRECHT, J.H. Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating properties. *Alternative Medicine Review*, v. 4, p.170-177, 1999.

BRASIL. *Portaria Interministerial nº. 1.426 de 11 de Julho de 2008: Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Ministério da Saúde, Diário Oficial, 133, p. 37, 2008.

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.

CECHIEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, p. 99-106, 1998.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, p. 156-160, 2004.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. *The Royal Society of Chemistry*, v. 18, p. 674-688, 2001.

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

CHUNG, K. T., WEI, C.; JOHNSON, M. G. Are tannins a doubleedged sword in biology and health? *Trends and Food Science & Technology*, v. 9, 168-175. 1998.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. *Química Nova*, v.29, n.6, 1287-1300, 2006.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, v. 19, p. 502-508, 2003.

DE STEFANI, E.; BOFFETA, P.; RONCO, A.L. *Plant sterols and risk of stomach cancer: a case control study in Uruguay*. *Nutrition and cancer*, v.37, p.140-144,2000.

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.

DESPHANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of foods products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.24. p. 401-449, 1986.

DUTTA, A.; SARKAR, D.; GURIB-FAKIM, A.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. In vitro and in vivo activity of Aloe Vera leaf exudates in experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 102, p. 1235-1242, 2008.

ENGELS, C.; KNÖDLER, M.; ZHAO, Y.; CARLE, R.; GÄNZLE, M.G.; SCHIEBER, A. Antimicrobial activity of gallotannins isolated from Mango (*Mangifera indica*) kernels. *Journal of Agricultural and Chemistry*, v. 57, p. 7712-7718, 2009.

FEITOSA, S. dos S. *Nutrição mineral e adubação da cajazeira (Spondias mombin L.) na Zona da Mata Paraibana*. Areia PB: 50p. Dissertação (Solose Nutrição de Plantas), 2007.

FERREIRA, M. E.; ROJAS de ARIAS, A.; TORRES de ORTIZ, S.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var *angustifolium*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 199-202, 2002.

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

FUNASA. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. p.62, 2000.

GOEL, K.; GOVINDA, D.; SANYAL, K. In vivo antimicrobial activity of *Musa paradisiaca* L root extracts. *Fitoterapia*, v. 60, p.157-158, 1989.

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

GRAMICCIA M.; GRADONIL. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal of Parasitology*, v. 35, p. 1169-1180, 2005

HAGERMAN, A.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, v.256, p.4494-4497, 1981.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicine: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, p. 205–215, 1996.

HATANO, T.; YOSHIDA, T.; HEMINGWAY, R. Interactions of flavonoids with peptides and proteins and conformations of dimeric flavonoids in solution. In: Gross, et al. (Eds.). *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 509–526, 1999.

JONES, P.J.; RAEINI-SARJAZ, M.; NTANIOS, F.Y. Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytotanol esters. *Journal of Lipid Research*, v.41, p.697-704, 2000.

KABUKI, T.; NAKAJIMA, H.; ARAI, M.; UEDA, S.; KUWABARA, Y.; DOSAKO, S. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chemistry*, v. 71, p.61-66, 2001.

KAPIL, A. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Planta Medica*, v. 59, n. 5, p. 474, 1993.

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

KOŁODZIEJ H.; BURMEISTER, A.; TRUN W.; RADTKE O. A, KIDERLEN, A.F.; ITO, H.; HATANO T.; YOSHIDA, T. E FOO L. Y. Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.13, p. 6470–6476, 2005.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; FOO, L.Y. Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor α -release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 9, p.1016-1021, 2001.

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

KONISHI, K.; ADACHI, H.; ISHIGAKI, N.; KANAMURA, Y.; ADACHI, I.; TANAKA, T.; NISHIOKA, I.; NONAKA, G.; HORIKOSHI, I. Inhibitory effects of tannins on NADH dehydrogenases of various organisms. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 16, p.716-718, 1993.

KOVGANKO, N.; KASHKAN, Z. Advances in the chemical transformation of β -sitosterol. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 30, p. 533, 1994.

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

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

LAW, M. Plant sterol and stanol margarines and health. *British Medical Journal*, v. 30, p. 861-864, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2 ed.1995.

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

LEON, J.; SHAW, P.E. *Spondias*: the red mombin and related fruits In: NAGY, S. SHAW, P.E., WARDOWSKI, W.F. *Fruits of tropical and subtropical origin. Composition, properties and uses*. Lake Alfred: FSS, p. 116-126, 1990.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Tannins: their place in plant metabolism. In: HEMINGWAY, R. W; KARCHESY, J. J. *Chemistry and significance of condensed tannins*. New York: Plenum Press, p. 23-46, 1989.

LI, J.; MAPLESDEN, F. Commercial production of tannins from radiata pine bark for wood adhesives. *IPENZ Transactions*, v. 25, p. 46-52, 1998.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa. Plantarum, p 370, 1992.

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

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

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, p.41-45, 2004.

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

MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 372, p. 495-502, 2002.

MITCHELL, J.D.; DALY, D.C. Revisão das espécies neotropicais de *Spondias* (Anacardiaceae). In: Congresso Nacional de Botânica, 46. Universidade de São Paulo, 1995.

MOLANO, I; GARCIA-ALONSO, M.; MIRON, C.; REDONDO, E.; REQUENA, J.M.; SOTO, M; GOMEZ-NIETO, C.; ALONSO, C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic proteins mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 92, p. 1-13, 2003.

MONTEIRO, E.M.; SILVA, J.C.F.; COSTA, R.T.; COSTA, D.C.; BARATA, R.A.; PAULA, E.V.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; ROCHA, M.F.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n.2, p. 147-152, 2005.

MORAIS, S.; BRAZ FILHO, R. *Produtos naturais: estudos químicos e biológicos*. Fortaleza: Ed. UECE, p.105-122, 2007.

MOREAU, R.A.; WHITAKER, B.D.; HICKS, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity. *Progress in lipid research*, v.4, n.6, p.457-500, 2002.

MOREIRA, R.C.R.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; BEZERRA, J.L.; GUERRA, R. N.M.; REBÊLO, J.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; COSTA, J. M. L. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.1. p.59-63, 2007.

MORITZ, A.; STEUBER, S.; GREINER, M. Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine*, v. 23, p. 279-283, 1999.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde*. – 6. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, p.816, 2005.

MUDGE, K. W.; LUCKOW, M. A.; BRENNAN, E. B. *Musa X paradisiaca* Linnaeus,

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 landscape project. Disponível em http://www.bu.edu/bhlp/pages/herbs/herb_monographs/musa_paradisiaca.htm Acesso em: 26 out.2009.

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

NISHIOKA, Y.; YOSHIOKA,S.; KUSUONSE, M.; CUI TAI LIN; HAMADA, A.; ONO, M.; MIYAMURA, M.; KYOTANI, S. Effects of extract derived from *Eriobotrya japonica* on liver function improvement in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.25, p.1053-1057,2002.

NJOKU, P.C.; AKUMEFALA, M.I. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias Mombin* Leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 6, p. 613-615, 2007.

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

OJEWOLE, J.; ADEWUNMI, C. Hypoglycemic effect of methanolic extract of *Musa paradisiaca* L (Musaceae) green fruits in normal and diabetic mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*,v.25, p. 453-456, 2003.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, v.66, n.17, p. 2012-2031, 2005.

OLIVEIRA, A.B. *Microencapsulamento de estigmasterol proveniente de Musa paradisiaca L., Musaceae*. 112f. Defesa de dissertação. Curitiba-Paraná, 29 março. 2007.

OLIVO, C. J.; TECHIO, P. L. E.; MADRUGA, C.N.; VOGEL, F. F.; HEINZMANN, B. M.; Neves, A. P. Uso da bananeira (*Musa* spp.) no controle de parasitas de animais domésticos: do empirismo à ciência. *Livestock Research for Rural Development*, v.19, 2007.

ORHAN, L.; ASLAN, M.; SENER, B.; KAISER, M.; TASDEMIR, D. *In vitro* antiprotozoal activity of the extracts of different parts of Turkish *Pistacia vera* L. *Phytomedicine*, v.13,p.735-739, 2006.

OTERO, M. J.; HIDALGO, L. G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado:efectos sobre la productividad de ruminantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). *Livestock Research for Rural Development*, v. 16, p. 1-9, 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.

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

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, v.26, n.4, p.485-492, 2002.

RAMESH, N.; VISWANATHAN, M.B.; SARASWATHY, A. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. *Journal of ethnopharmacology*, v.79,n.1,p.129-132, 2002.

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

RIBEIRO, V. M. Protocolos terapêuticos e controle da leishmaniose visceral canina. *Ciência Animal*, v. 10, p. 13-19, 2001.

RIERA, C.; VALLADARES, J. E.; GÁLLEGO, M.; AISA, M. J.; CASTILLEJO, S.; FISA, R.; RIBAS, N.; CARRIÓ, J.; ALBEROLA, J.; ARBOIX, M. Serological and Parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, v. 84, p. 33-47, 1999.

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

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

ROBINSON, T. *The Organic Constituents of Higher Plants*. 6 ed. Massachusetts: Cordus Press. p. 151-153, 1991.

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

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. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, p.344-349, 2008.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; FRANKE, C. R.; BARROS, R. S.; OLIVEIRA, F. R.; ALCÂNTARA, A. C.; DINIZ, A. T. Cross-sectional serological study of canine leishmania infection in Fortaleza, Ceará, Brasil. *Veterinary Parasitology*, 155, 24-31, 2008.

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

SACRAMENTO, C.K.; SOUZA, F.X. *Cajá (Spondias mombin L.)*. Jaboticabal:Funep,. (Série Frutas Nativas, 4), p.42, 2000.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; DIAS, D. A. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Phamaceutical Sciences*, v. 43, p. 295-300, 2007.

SESA - SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. Informe Epidemiológico, Leishmaniose Visceral, 2009. Acesso: http://www.saude.ce.gov.br/site/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=9:boletins&Itemid=247#

SHARIEF, A. H.; KHALIL, E. A. G.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A.; OMER, S. A.; IBRAHIM, M. E. *Leishmania donovani*: An *in vitro* study of antimony-resistant amphotericin B-sensitive isolates. *Experimental Parasitology*, v. 114, p. 247-252, 2006.

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

SHETTINI, D. A.; COSTA, V. A. P.; SOUSA, L. F.; DEMICHELI, C.; ROCHA, O. G. F.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 1879-1883, 2005

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

SOARES, D. C.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of supercritical fluid fraction from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitology International*, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOFFNER, M. L. A. P. *Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira*. Piracicaba, Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2001.

STEUBER, S.; MORITZ, A.; SCHIRMANN, I.; GREINER, M. PCR follow-up examination after treatment of canine leishmaniosis (CaL). *Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine*, v. 23, p. 285-292, 1999.

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

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

TIAN, F.; LI, B.; JI, B.; YANG, J.; ZHANG, G.; CHEN, Y.; LUO, Y. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: the polarity affects the bioactivities. *Food chemistry*, v.133, p.173-179, 2009a.

TIAN, F.; LI, B.; JI, B.; YANG, J.; ZHANG, G.; CHEN, Y.; LUO, Y. Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT-Food Science and Technology*, v.42, p.1289-1295, 2009b.

VALLADARES, J. E.; RIERA, C.; ALBEROLA, J.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M.; CRISTÒFOL, C.; FRANQUELO, C.; ARBOIX, M. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, v. 75, p. 33-40, 1998.

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

WAECHTER, A.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A.R.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research*, v. 12, p. 541-544, 1998.

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

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO).
<http://www.searo.who.int/EN/Section10/Section2163>, acesso outubro de 2009.

YANG, L.; LEE, C. Y.; YEN, K. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemic cells. *Cancer Letters*, v.157, p. 65–75, 2000.