

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DO EXTRATO
BRUTO DE *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot**

LYAH LAMARCK

São Luís – MA

2012

LYAH LAMARCK

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DO EXTRATO
BRUTO DE *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^a. D. Sc. Ana Lucia Abreu Silva

São Luís - MA

2012

Lamarck, Lyah.

Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot / Lyah Lamarck. – São Luís, 2012.

XXf.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientadora: Prof^a. D. Sc. Ana Lucia Abreu Silva.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot. 3. Estudo fitoquímico. 4. Atividade leishmanicida. I. Título.

CDU: _____

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 29/08/2012 pela banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a D. Sc. Ana Clara Gomes dos Santos
Universidade Estadual do Maranhão
1º Membro

Prof.^a D. Sc. Rubenice Amaral da Silva
Universidade Federal do Maranhão
2º Membro

Prof.^a D. Sc. Ana Lucia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão
Orientadora

"as folhas das árvores sejam para a cura dos povos."

Apocalipse 22, 2

Consagrado ao Senhor Jesus Cristo.

AGRADECIMENTOS

Toda a honra, toda a glória e todo o louvor sejam ao Deus todo poderoso!

Agradeço apenas à Deus.

Por que Deus me deu Lamarck e Conceição, meu oráculo e minha bússola. Pai, você é responsável pelos melhores insights que tive nos meus projetos. Mãe, obrigada eternamente por cuidar tão bem da minha família.

Por que Deus me deu Marcelo, o Amor. Você é a prova do amor que Deus tem por mim.

Por que Deus me deu Kalyel, o Bom. Obrigada por lutar tão bravamente contra a saudade e a ausência da mamãe. Você tem o melhor caráter que conheço.

Por que Deus me deu Heidy, o guerreiro. Meu irmão mais velho, parabéns pela vida. Você está vivo e vive.

Por que Deus me deu Sarah, minha princesa. Uma vitoriosa e testemunho vivo da cura de Jeová Rafá.

Por que Deus me deu Rachel, the sunshine of my life. O cosmos é o limite pra você.

Por que Deus me deu Sidney, o “Denzel Washington”. Obreiro e Ungido de Deus.

Por que Deus me deu Emanuel, Deus conosco. A voz mais linda do mundo dizendo “Saudade tia Lyah”. Minha diversão garantida!

Por que Deus me deu a professora Ana Lúcia. Viver sem ter a oportunidade de conhecê-la é apenas passar pela vida. De toda a nossa convivência, o mais evidente foi aprender a me importar primeiro com os outros. Pela oportunidade, pelo aprendizado, pelo seu caráter, pela maneira como conduziu a orientação, por seu exemplo de mulher, funcionária e pesquisadora.

Por que Deus permitiu o financiamento para realização deste projeto através da FAPEMA.

Por que Deus me favoreceu com Michele Moreira e a família Dornellas. Laços de amizade e gratidão eternos.

Por que Deus me deu a pequena Joicy Cortez de Sá. Não há dia, hora, lugar, pessoa ou circunstância que a impeçam! Não há outra como você.

Por que Deus me deu Solange, Nayanna, Verônica e Arannadia. A pós-graduação foi mais tranquila fugindo à tarde com vocês.

Por que Deus me favoreceu com os professores, funcionários e alunos do Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão e da Universidade Federal de Minas Gerais.

Por que Deus me privilegiou em poder conviver com os acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão. Especialmente Renata Mondêgo e a turma de 2012.1

Agradeço pela vida da Tió, pelo cuidado que tem comigo e por cuidar de todos os alunos de mestrado do Condomínio Ilhéus. Seu desprendimento pessoal é empolgante.

Agradeço também, Senhor, pela vida do Paulynho Paixão. Profetizo que ele terá vida longa e será Teu levita.

Omnis caelo est vulturem et totum cavitatem est gemma
J.L.

Muito obrigado.

RESUMO

Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot. LAMARCK, L. ABREU SILVA, A. L. 2012. XX f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2012.

O tratamento para as leishmanioses instituído há mais de cem anos dispõe de poucas drogas, e estas devem ser avaliadas quanto à toxicidade e efeitos adversos ao paciente, com alguns casos de resistência já relatados. A diversidade química e a imensa gama de bioagentes derivados de plantas levou à criação de centenas de drogas farmacêuticas, muitas, inclusive, possuem atividade leishmanicida. A *Arrabidaea chica*, conhecida como pariri possui diversos metabólitos ativos com propriedades antiinflamatórias, adstringentes e terapêuticas. Este trabalho realizou o estudo fitoquímico e a avaliação atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto de *Arrabidaea chica*. Os extratos brutos das folhas e do caule de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot tiveram rendimento de 59,2% e 3,33%, respectivamente. A prospecção fitoquímica preliminar mostrou que os extratos possuem flavonóides, compostos fenólicos, taninos, antocianinas e chalconas. O extrato das folhas da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot demonstrou atividade contra formas promastigota na dosagem de 500 µg/ml. O extrato bruto de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot apresentou citotoxicidade na concentração de 189,9 µg/mL. O extrato bruto das folhas da *Arrabidaea chica* é ativo contra formas promastigotas de *L. amazonensis* em modelo *in vitro* e promissor para novas pesquisas de opções terapêuticas para leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, *Arrabidaea chica*, estudo fitoquímico, citotoxicidade.

ABSTRACT

Phytochemical study and *in vitro* leishmanicidal activity of the gross extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot. LAMARCK, L. ABREU SILVA, A. L. 2012. XX f. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2012.

The treatment for leishmaniasis established for more than one hundred years has few drugs, and these should be evaluated for toxicity and adverse effects to the patient, with some cases of resistance have been reported. The chemical diversity and the vast range of bioagents derived from plants has led to the creation of hundreds of pharmaceutical drugs, many even have leishmanicidal activity. The *Arrabidaea chica*, known as “pariri” has many active metabolites with anti-inflammatory, astringent and therapeutics properties. We carried out conducted a phytochemical study and evaluation in vitro leishmanicidal activity of the gross extract *Arrabidaea chica*. The extracts of the leaves and stem of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot had income of 59,2% and 3,33% respectively. The preliminary phytochemical screening showed that the extracts are flavonoids, phenolics, tannins, anthocyanins and chalcones. The extract from the leaves of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot demonstrated activity against promastigote forms os *Leishmania amazonensis* at a dosage of 500 µg/ml. The gross extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot showed cytotoxicity at a concentration of 189,9 µg/ml. The gross extract from the leaves of *Arrabidaea chica* is active against promastigotes of *L. amazonensis* in vitro model for further research and promising treatment options for leishmaniasis.

Key words: *Leishmania amazonensis*, *Arrabidaea chica*, phytochemical study, cytotoxicity.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 01	Prospecção fitoquímica do extrato bruto etanólico da folha e do caule de <i>Arrabidaea chica</i>54
Tabela 02	Tabela XX – Concentração inibitória de 50% das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , após 72 horas de tratamento com o extrato bruto etanólico das folhas de <i>A. chica</i> e Anfotericina B.....56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01 – Mapa da disseminação das leishmanioses no mundo.....	19
Figura 02 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp. no inseto vetor.....	23
Figura 03 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	24
Figura 04 – <i>Arrabidaea chica</i> (H & B) B. Verlt.....	42
Figura 05 – Localização geográfica do local de coleta das amostras de <i>Arrabidaea chica</i>	47
Figura 06 – Gráfico da inibição de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivadas em meio RPMI, a 24°C, e tratadas com extrato bruto das folhas de <i>A. chica</i> nas concentrações de 62,5 a 500 µg/mL.....	55
Figura 07 – Gráfico da atividade leishmanicida do extrato bruto etanólico das folhas de <i>A. chica</i> nas concentrações de 0,97 a 500 µg/mL em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (10 ⁶ / ml).....	56
Figura 08 – Gráfico da citotoxicidade em macrófagos J774.G8, demonstrando o percentual de células viáveis, cultivadas em meio RPMI, a 37°C e 5% CO ₂ e tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de <i>A. chica</i> nas concentrações de 0,97 a 500 µg/mL.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
ATP	trifosfato de adenosina
CC ₅₀	citotóxica 50%
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	detector de arranjos de diodo
d.C.	depois de cristo
DMEM	meio Eagle Dulbecco modificado
DMSO	dimetilsulfóxido
ELSD	detector evaporativo de espalhamento de luz
ELISA	ensaio imunoenzimático
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GABA	ácido gama-aminobutírico
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GM-CSF	fator estimulante de colônia de granulócitos monócitos
INF-γ	interferon gama
INBiO	Instituto Nacional de Biodiversidade
IC ₅₀	concentração inibitória de 50% da população
IL	interleucina
Inc.	incorporação
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
kg	quilograma
km ²	quilômetro quadrado
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
PBS	tampão fosfato salino
PGE2	prostaglandina 2
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
SbIII	antimonial trivalente
SbV	antimonial pentavalente
SRB	sulforhodamina B
TNF-β	fator de necrose tumoral beta
tr	tempo de retenção
U	unidade
US\$	dólar
UV	ultravioleta
WHO	World Health Organization/Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 História da Leishmaniose.....	17
3.2 Epidemiologia	18
3.3 Leishmania.....	21
3.4 Ciclo biológico.....	23
3.5 Patogenia.....	25
3.6 Imunologia	26
3.7 Sinais Clínicos	29
3.8 Diagnóstico	30
3.9 Tratamento.....	33
3.10 O uso da fitoterapia nas leishmanioses	38
3.11 A espécie vegetal em estudo.....	40
3.12 Legislação sobre fitoterápicos.....	44
4. OBJETIVOS.....	46
4.1 Objetivo Geral	46
4.2 Objetivos Específicos.....	46
5. MATERIAL E MÉTODO.....	47
5.1 Área de Coleta.....	47
5.2 Preparo do extrato de <i>Arrabidaea chica</i>	48
5.3 Análise fitoquímica.....	48
5.3.1 Antraquinonas	49
5.3.2 Flavonóides	49
5.3.3 Triterpenóides e esteróides	49
5.3.4 Saponinas.....	49
5.3.5 Compostos fenólicos	49
5.3.6 Taninos.....	50

5.3.7 Antocianidinas e chalconas	50
5.4 Cultura de Parasita	50
5.5 Atividade do extrato de <i>A. chica</i> contra formas promastigotas	50
5.6 Cultivo celular	51
5.7 Ensaio de citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	52
5.8 Análise dos resultados	53
5.9 Comitê de Ética Experimental.....	53
6. RESULTADOS	54
6.1 Extratos brutos etanólicos e prospecção fitoquímica da <i>A. chica</i>	54
6.2 Atividade do extrato de <i>A. chica</i> contra promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	55
6.3 Citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	57
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	XX

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos ao homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos por meio da picada de insetos denominados flebotomíneos. Essas doenças representam uma das endemias parasitárias de maior importância em termos de saúde pública no mundo, haja vista a sua ampla distribuição, se encontra entre as seis maiores endemias consideradas prioritárias no mundo (OMS, 2011).

Atualmente estão distribuídas em todo o território nacional, com média anual de 3.500 casos (OMS, 2011). Os registros da doença são especialmente na região Nordeste (FUNASA, 2012), representando foco endêmico especificamente nos estados do Ceará, Maranhão, Piauí, Pernambuco e Bahia (OMS, 2011). É uma doença sistêmica que, se não for tratada adequadamente, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (BRASIL, 2009).

A leishmaniose apresenta-se em quatro formas: cutânea, cutânea difusa, mucosa e visceral (MARZOCHI et al., 1999). A forma cutânea é a mais comum (1 a 1,5 milhões de casos por ano) e representa 50 a 75% dos casos novos registrados. As espécies envolvidas nas leishmanioses cutâneas são *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) pifanoi*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica* (GRIMALDI et al., 1989).

Apesar do tratamento tanto para a leishmaniose visceral quanto a leishmaniose tegumentar americana ter sido instituído há mais de cem anos, poucas drogas estão disponíveis e, antes de iniciar o tratamento, é necessário avaliar alguns aspectos como a faixa etária do paciente, gravidez e as coinfeções. Além disso, as drogas de eleição no tratamento das leishmanioses também devem ser avaliadas quanto à toxicidade. Os antimoniais pentavalentes (Sb^V), a anfotericina B e as pentamidinas, podem apresentar eventos adversos como artralgias, mialgias, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, anorexia, náusea e vômito (HEPBURN et al., 1993; BRUMMIT et al., 1996).

Em 1985, no Sul da Europa, foi descrito o primeiro relato de coinfeção leishmaniose/HIV; atualmente, há registros em 35 países (SOUSA-GOMES et al.,

2011). A experiência mundial do aumento do número de casos de coinfeção levou a modificações na história natural das leishmanioses (ALVAR et al., 1997).

Segundo Pelissari et al. (2011), os aspectos relacionados aos efeitos adversos levam o paciente ao uso diário de doses inferiores ao recomendado, com consequente tratamento inadequado, recidivas e lesões de pele que deixam cicatrizes podendo levar à deformidades. O paciente se torna sujeito de estigmas que podem levar ao isolamento social, desemprego, alcoolismo, doenças mentais e até ao suicídio (KASSI et al., 2008).

Países desenvolvidos e em desenvolvimento tem aumentado o interesse em medicamentos fitoterápicos. No Brasil, a área de química de produtos naturais tem recebido investimentos da iniciativa privada e, sobretudo, do governo. Apesar de erroneamente difundida a idéia de que medicamentos à base de plantas sejam seguros e livres de efeitos colaterais, os eventos adversos de agentes fitoterápicos são menos comuns em relação às drogas sintéticas (CALIXTO, 2000).

A diversidade química e a imensa gama de bioagentes derivados de plantas levou à criação de centenas de drogas farmacêuticas. Diversos países da América Latina demonstraram que muitas plantas possuem atividade leishmanicida (FOURNET et al., 1992; TORRES-SANTOS et al., 1999; DELORENZI et al., 2001; FERREIRA et al., 2002; SALVADOR et al., 2002).

A espécie *Arrabidaea chica* (Humb. E Bonpl.) Verlot é uma vegetal da família Bignoniaceae, conhecida popularmente como “pariri”, “crajiru”, “puca-panga”, “coapiranga”, “chica” ou “cipó-cruz”. Nativa de quase todo o Brasil e comum na Floresta Amazônica (VON POSER et al., 2000). A medicina tradicional lhe atribui propriedades antiinflamatórias, adstringentes e terapêuticas (GENTRY, 1992; KALIL FILHO, 2000), sendo utilizada no combate de enfermidades de pele, olhos, cólicas intestinais, anemia, icterícia, entre outras (RÊGO, 1995).

Mediante o uso medicinal e a abordagem fitoquímica da *A. chica* indicando a presença de metabólitos como alcaloides, antocianidinas, antocianinas, antraquinonas, esteroides, triterpenoides, fenois, flavanonois, flavanois, flavanonas, saponinas e taninos catéquicos (BARBOSA E QUIGNARD, 1998; ALVES, 2008),

este trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos brutos provenientes de folhas e caule de *A. chica*.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são representadas por um grupo de doenças com caráter zoonótico que acometem o homem e outras espécies de animais silvestres e domésticos. Causadas por protozoário digenético pertencente ao gênero *Leishmania*, realiza o ciclo biológico num hospedeiro invertebrado e em outro vertebrado, sendo o cão o principal reservatório doméstico e fundamental na manutenção da infecção no local.

Com os eventos adversos provocados pelas drogas de eleição no tratamento humano e algumas cepas resistentes às drogas, reforçada pela Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008 que proíbe, em todo o território nacional, o tratamento da leishmaniose em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou produtos não-registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é premente a avaliação de novas alternativas terapêuticas, de fácil acesso e aplicação pela população, com menos efeitos colaterais e que fundamentem a viabilidade do tratamento em Medicina Veterinária.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 História da Leishmaniose.

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias que afligem a humanidade há vários séculos. Seus primeiros registros reconhecidos foram de rostos com mutilações nasais, em peças de cerâmica pré-Inca do Peru e do Equador (400-900 d.C.), característicos da leishmaniose mucocutânea (GREVELINK e LERNER, 1996). No Velho Mundo (Ásia, África e Europa) os relatos da doença datam do século I d.C (CHOI e LERNER, 2001). Na Grécia em 1835 foi denominada "ponos" ou "hapoplínakon". Em 1869, na Índia, recebeu o nome "kala-jwar" (febre negra) ou "kala-azar" que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI et al., 1981).

No século passado, em 1900, um milênio após os relatos no Velho Mundo, o agente da doença foi descrito pela primeira vez, na Índia, por William Leishman, durante a necropsia de um soldado. Três anos depois, em um estudo independente, Charles Donovan descreveu o mesmo parasito no fígado de pacientes com suspeita de malária crônica. Ainda no mesmo ano, Laveran e Mesnil descreveram o protozoário com o nome de *Piroplasma donovani* (FAUST et al., 1974).

Leonard Rogers, em 1904, foi o primeiro a conseguir cultivar o parasita e observou que nas culturas o parasita apresentava flagelos. Patton, em 1907 observou as formas amastigotas em monócitos e as formas promastigotas no intestino de insetos que picavam pacientes com calazar (FAUST et al., 1974). Em 1908, Charles Nicolle na Tunísia demonstrou o papel do cão como hospedeiro intermediário e só em 1924 a transmissão da *Leishmania donovani* ao homem pela picada de *Phlebotomum argentipes* é confirmada, fechando assim, o ciclo desta zoonose (BADARÓ E DUARTE, 1986).

3.2 Epidemiologia.

As leishmanioses ocorrem em 98 países dos cinco continentes com relato de transmissão endêmica. A contagem de casos oficiais totalizou mais de 58.000

casos de LV (leishmaniose visceral) e 220.000 casos de LTA (leishmaniose tegumentar americana) por ano. A prevalência mundial das diferentes formas clínicas da Leishmaniose tegumentar e visceral ultrapassa 12 milhões de casos. No entanto, apenas cerca de dois terços dos países relataram dados de incidência, por um período de cinco anos, geralmente refletindo uma ausência de vigilância ou de outras investigações (ALVAR et al., 2012).

A distribuição geográfica de cada espécie do gênero *Leishmania* corresponde ao tipo de doença que ocorre em cada região do mundo (Figura 1). A leishmaniose visceral é causada pela *L. donovani* no Sul da Ásia e África, enquanto a *L. infantum* provoca a mesma forma visceral no Mediterrâneo, no Oriente Médio, América Latina e partes da Ásia também. Outros mamíferos também podem ser infectados com *Leishmania* spp., como os cães que desenvolvem leishmaniose visceral canina e servem como um importante reservatório do parasito nas regiões acometidas. A leishmaniose cutânea é causada por *L. major* na África, Oriente Médio e regiões da Ásia; por *Leishmania tropica* no Oriente Médio, Mediterrâneo e partes da Ásia; e por *Leishmania aethiopica* em partes da África (OMS, 2011).

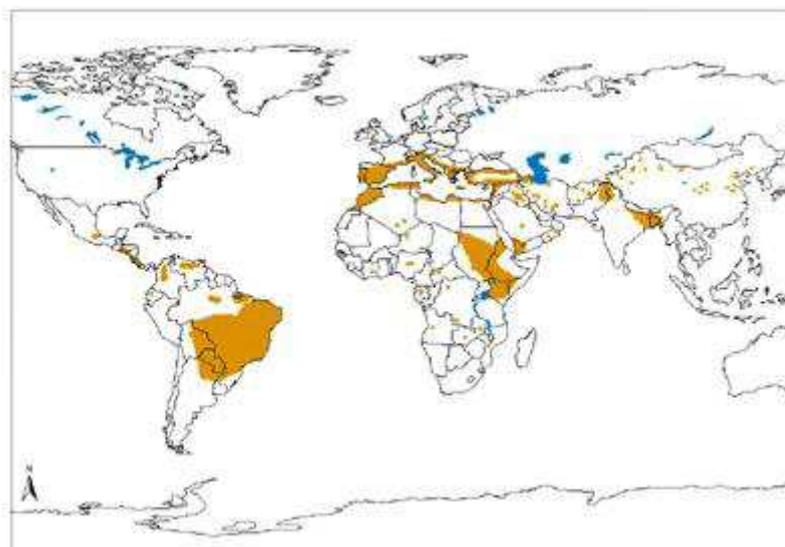


Figura 1 – Mapa da disseminação das leishmanioses no mundo (WHO, 2011).

Diferentes espécies do gênero *Leishmania* podem estar envolvidas nos casos de leishmanioses nas Américas, onde a forma visceral pode ser encontrada

em toda a América do Sul e até o Norte do México. Há relatos, também, no Canadá e os EUA. Já constam relatos na Austrália, em diversas espécies de cangurus e outros marsupiais, com possibilidade de transmissão da doença para humanos através da carne infectada e também devido à proximidade com os animais nativos (GELANEW et al., 2010). Dados, ainda, constam casos no Timor Leste (CHEVALIER et al., 2000) e Tailândia (KONGKAEW et al., 2007).

Atualmente, segundo a Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, a LV está distribuída em 25 unidades federadas, atingindo 1300 municípios brasileiros. Nos últimos anos a doença vem se expandindo para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, sendo que, até o final da década de 1990, a região Nordeste concentrava 90% dos casos e em 2009 registrou 47,5% do total de casos do País (BRASIL, 2011).

Os dados epidemiológicos dos últimos anos revelam também a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (BRASIL, 2011).

A Leishmaniose tegumentar no Brasil caracteriza-se pela diversidade das apresentações clínicas e de espécies causadoras da doença. No nosso país, sete espécies de *Leishmania* estão associadas a essa forma da doença, das quais algumas causam síndromes peculiares associadas a fenômenos imunopatogênicos específicos, como a forma difusa causada por *L. (Leishmania) amazonensis* e a forma mucosa causada por *L. (Viannia) braziliensis*. A leishmaniose visceral (LV) é causada pela *L. infantum/chagasi* (ISHIKAWA et al., 2002); no entanto, há relatos de resistência em camundongos BALB/c para a infecção com *L. amazonensis* isolados de pacientes com leishmaniose visceral. Esta resistência parece ser devido a alterações do curso da doença em seres humanos (ALMEIDA et al., 1996).

No período compreendido entre os anos de 2005 a 2009, a média de casos a cada ano de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil foi de 3.679, acompanhada de taxa de letalidade de 5,8%. A LV pode evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos, quando não tratada corretamente. Num período de avaliação maior, 2000 a 2009, foi registrada no Brasil uma média de 24.684 casos

de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). O índice de letalidade dessas doenças demonstra aumento gradual, passando de 3,2% em 2000 para 5,7% em 2009 (BRASIL, 2011).

As leishmanioses são predominantemente rurais, com uma epidemiologia doméstica ou peri-doméstica, sendo que algumas pessoas contraem a doença nas cidades ou nos arredores (WHO, 2011). Atinge principalmente populações de baixa renda, sendo considerada emergente devido a sua urbanização e a coinfeção com outras doenças. Os fatores de risco, como a desnutrição concomitante ou doenças infecciosas, parece muito importante no que diz respeito à futura evolução clínica da doença (DESJEUX, 2004).

As leishmanioses correspondem a uma das doenças mais negligenciadas no mundo, estimada em segundo lugar em mortalidade e morbidade e em quarto entre as infecções tropicais de maior prevalência (BERN et al., 2008). A expansão da leishmaniose e o aumento acentuado da sua prevalência estão relacionados a mudanças ambientais e de migração de pessoas não imunes para áreas endêmicas (WHO, 2011). As modificações antrópicas no ambiente são capazes de expandir a área de atuação de um vetor e, conseqüentemente, da *Leishmania spp.*, principalmente para áreas não-habitadas anteriormente (PATZ et al., 2000).

Outra observação importante quanto à expansão das leishmanioses são as coinfeções, destacando-se a infecção pelo HIV (CRUZ et al., 2006). A notificação da leishmaniose é consideravelmente subestimada em todo o mundo; em se tratando da África e Ásia, que contam com altas prevalências das duas doenças, a situação pode ser ainda pior; com isso, a leishmaniose tornou-se uma doença multifacetada, como aconteceu com outras doenças infecciosas que apresentam coinfeção com o HIV, em que a infectologia da doença deve ser reavaliada (CATORZE, 2005).

3.3 *Leishmania spp.*

A classificação taxonômica da *Leishmania spp.* proposta por Lainson E Shaw (1987) é a seguinte:

Reino: Protista (Haekel, 1886)

Subreino: Protozoa (Goldfuss, 1817)

Filo: Sarcocystophora (Honigberg e Balamuth, 1963)

Subfilo: Mastigophora (Diesing, 1866)

Classe: Zoomastigophora (Calkins, 1909)

Ordem: Kinetoplastida (Vick-Kerman, 1976)

Subordem: Trypanosomatina (Kent, 1880)

Família: Trypanosomatidae (Grobbe, 1905)

Gênero: *Leishmania* (Ross, 1903).

São descritas pouco mais de 30 espécies de *Leishmania*, destas, aproximadamente 21 espécies possuem importância médica e veterinária. As diversas espécies são morfologicamente indistintas, sendo diferenciadas por análises isoenzimáticas, métodos moleculares ou por anticorpos monoclonais (BATES, 2007).

O gênero *Leishmania*, é constituído por três subgêneros distintos. Essa classificação é feita com base no segmento do intestino do flebotomíneo em que o parasito se desenvolve, bem como, pelas análises filogenéticas de sequências de DNA. Segundo Lainson e Shaw (1987) as espécies que se desenvolvem na porção posterior do intestino integram o subgênero *Viannia*. Já as espécies com desenvolvimento na porção anterior e média do intestino, pertencem ao subgênero *Leishmania* (SAF'JANOVA, 1982). O terceiro subgênero é o *Sauroleishmania*, que são encontrados em répteis e somente há pouco tempo foi incluído dentro do gênero após análise filogenética baseada em sequência de DNA. É considerado um grupo de desenvolvimento secundário derivado das espécies de mamíferos (BATES, 2007).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas morfológicas evolutivas: a amastigota e a promastigota. A forma amastigota apresenta corpo ovóide, entre 2,1 e 3,2 μm , imóvel e intracelular, com pouca variação morfológica entre as espécies. O núcleo é grande, arredondado ou ovóide, ocupando maior parte do corpo do parasita. O cinetoplasto, mitocôndria única constituída DNA (k-DNA) fica próximo ao núcleo e tem forma de bastonete. Uma bolsa flagelar relacionada às atividades de endocitose e exocitose, encontra-se na região anterior do corpo celular, por onde o flagelo fica fixado. Complexo golgiense, retículo endoplasmático e outras organelas estão localizadas no citoplasma. A forma amastigota se desenvolve poucas horas após sofrer fagocitose pelas células-alvo do hospedeiro vertebrado (WEBSTER E RUSSEL, 1993; GULL, 1999; BATES, 2007).

A forma promastigota é uma forma extracelular do protozoário que apresenta corpo alongado e tamanho variando entre 14 e 20 μm . Possui um flagelo livre responsável por sua locomoção. É encontrado no intestino do inseto flebotomíneo onde sofre pequenas transformações morfológicas (Figura 2), sendo classificadas em cinco estágios: promastigotas procíclicas, são as formas recém ingeridas que podem ser destruídas ainda no inseto; nectomonas, que são encontradas na região do intestino médio, são mais delgadas; leptomonas são formas menores; na região da válvula estomacal são encontradas as duas formas finais de estágio: haptomonas, de flagelo curto e imóveis; e metacíclicas, que são o estágio infectante do parasita, pequenas, resistentes e muito ágeis (KAMHAWI et al., 2006).

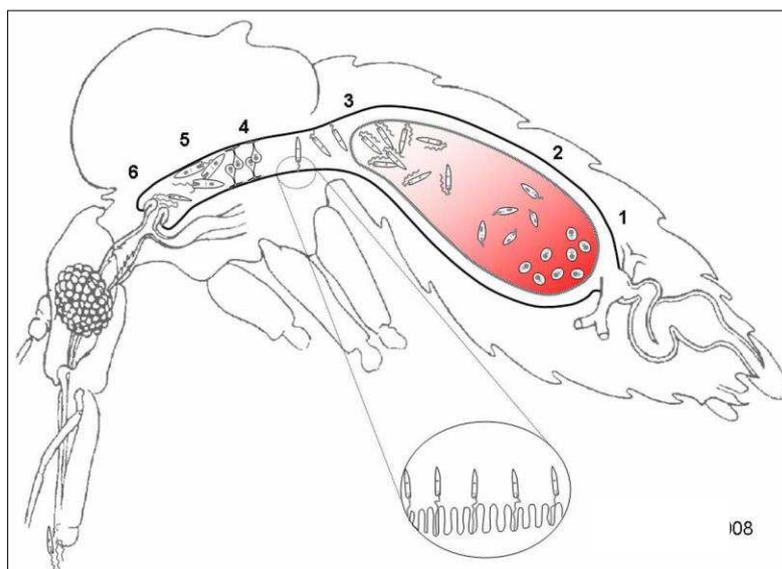


Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp. no inseto vetor (SCHLEIN, 1993)

3.4 Ciclo biológico.

As leishmanioses podem ser causadas por várias espécies de *Leishmania* spp. O espectro clínico dependerá da espécie do parasita e da resposta imunológica do hospedeiro. As formas clínicas podem ser cutânea, mucocutânea, cutânea difusa, cutânea disseminada ou visceral (MARZOCHI et al., 1999).

A inoculação do protozoário dentro do hospedeiro mamífero ocorre quando o inseto se alimenta de sangue, que é um requisito fundamental da oviposição da fêmea. Durante a alimentação do inseto, as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas juntamente com imunomoduladores derivados do parasita (proteofosfoglicanos), além dos vários componentes salivares do inseto. As promastigotas metacíclicas são rapidamente fagocitadas por um dos vários tipos de células encontrados no hospedeiro mamífero. Os tipos celulares incluem neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e monócitos. Depois da fagocitose das promastigotas metacíclicas, estas são transformadas em amastigotas, que são formas circulares e imóveis. Os amastigotas se replicam dentro das células hospedeiras, o que leva à ruptura da célula e consequente liberação dos parasitas, permitindo a reinfecção de fagócitos. A transmissão é completa quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebótomo (Figura 3), no repasto sanguíneo e, em seguida, convertem as formas amastigotas em promastigotas no intestino de flebotomíneos (SEHGAL et al., 2012).

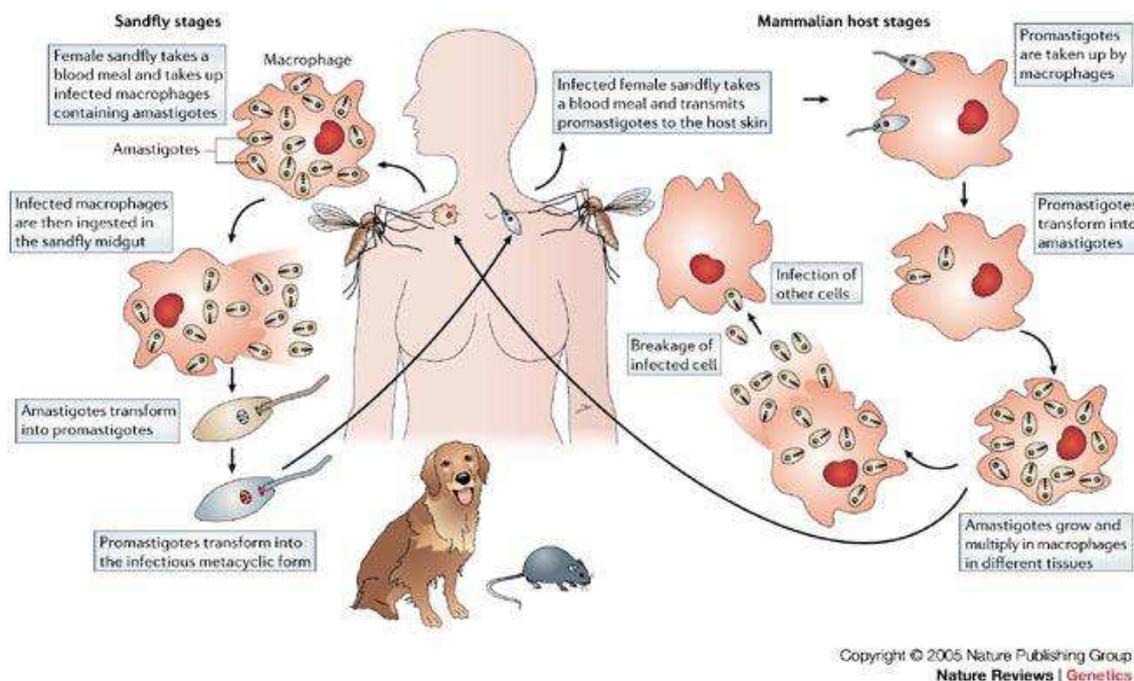


Figura 3 – Ciclo biológico da *Leishmania* spp. (Nature Reviews, 2005).

3.5 Patogenia.

Os flebotomíneos possuem atividade crepuscular e noturna. Estes tem predileção por habitar em locais próximos a fontes de alimento e são muito encontrados no intra e peridomicílio. Quando as fêmeas picam um hospedeiro mamífero já infectado com leishmaniose ingerem as formas amastigotas e no tubo digestivo do inseto estas formas se transformam em promastigotas, as quais sofrem uma série de transformações morfológicas e fisiológicas diferenciando-se posteriormente em promastigotas metacíclicas (forma infectante) que se deslocam para o tubo digestivo do inseto (AMÓRA, 2004).

Através de um novo repasto sanguíneo, as fêmeas contaminam um hospedeiro vertebrado saudável onde são liberadas as formas promastigotas metacíclicas do parasita juntamente com sua saliva. Ainda na epiderme do hospedeiro, essas formas promastigotas são fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário (LAURENTI, 2010). Já no interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, estas formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se energeticamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então à disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. Cerca de 3 horas após a inoculação já é possível observar vários neutrófilos e alguns macrófagos parasitados tanto por promastigotas quanto por amastigotas. Os leucócitos migram progressivamente da pele para outros locais do organismo e se encontram ausentes 24h depois (SANTOS-GOMES et al., 2000).

Os órgãos sofrerão hiperplasia progressiva na tentativa de conter o progresso da multiplicação das promastigotas. A não destruição da *Leishmania* fagocitada pelos macrófagos, condição que facilita a progressão da doença parece estar na dependência da ativação destas células pelos linfócitos T (SHIMOMURA, 2006). As complicações infecciosas e as hemorragias são os principais fatores associados à morte na leishmaniose visceral (BRASIL, 2011).

3.6 Imunologia.

A susceptibilidade ou resistência às infecções por *Leishmania* dependem de uma série de fatores, que envolvem desde a carga parasitária do hospedeiro, a espécie de *Leishmania* envolvida, a resposta imunológica do indivíduo, bem como a imunidade mediada por células e expressão de citocinas, até componentes da saliva do vetor. Todos estes têm um fator preditivo para o progresso ou não da infecção. Para que a infecção seja bem sucedida é necessário o parasito escapar tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa do hospedeiro, de modo a garantir o sucesso do parasitismo. As formas promastigotas, ao adentrarem o organismo, são fagocitadas pelos macrófagos, entretanto são resistentes à proteólise e degradação no fagossomo desta célula. No interior do organismo do hospedeiro mamífero susceptível, além dos macrófagos, as promastigotas são fagocitadas por outras células fagocíticas-mononucleadas, tais como neutrófilos e células dendríticas, transformando-se em amastigotas (SHARMA E SINGH, 2009).

Componentes da saliva do flebótomo protegem o parasito e aumentam a infectividade para o hospedeiro durante repasto sanguíneo. O maxadilan, presente na saliva de *Lutzomyia longipalpis*, é um peptídeo com ação vasodilatadora com vários efeitos sobre macrófagos, o que pode explicar a sua habilidade em exacerbar a infecção por *L. major*, em camundongos, e prolongar a sobrevivência da *Leishmania*. Dentre suas ações, pode-se citar: inibição da produção de óxido nítrico, H_2O_2 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelo macrófago, e todos os fatores associados com a morte da *Leishmania*, e aumento dos níveis de IL-10 e IL-6 (GOMES E OLIVEIRA, 2012).

A proteína C3b do complemento é uma potente opsonina, capaz de ligar-se a corpos estranhos, promovendo sua fagocitose através de receptores presentes nas células fagocitárias. As espécies de *Leishmania* possuem em sua superfície uma glicoproteína, gp63, capaz de converter C3b em iC3b, o que favoreceria a sua fagocitose. No entanto, uma vez fagocitado, o parasito torna-se muito resistente à degradação, sendo, desta forma, essa conversão crucial para a sobrevivência da *Leishmania* (SHARMA E SINGH, 2009).

Macrófagos detêm um importante papel na defesa do hospedeiro e na regulação da resposta imune. Acredita-se que essa resposta protetora é mediada pela indução da óxido nítrico-sintase em macrófagos em consequência do estímulo de citocinas de perfil Th1, como o IFN- γ . Isto resulta na diminuição da produção de arginase, e conseqüentemente, das poliamidas, essenciais para o crescimento do parasito e sua sobrevivência nos macrófagos, e uma aumentada produção de derivados do óxido nítrico com papel leishmanicida (MORENO et al., 2012).

A identificação de duas populações distintas de células CD4+, baseada nos seus diferentes perfis de citocinas foi feita por Mosmann et al. (1986). Estudos posteriores, na maioria utilizando o modelo murino de infecção por *L. major* deram origem ao paradigma de que o perfil Th1 estaria relacionado à resistência à infecção intracelular e o perfil Th2, à susceptibilidade (HEINZEL et al., 1989). Há muito tempo, as espécies do gênero *Leishmania* são consideradas um modelo ideal para o estudo dos mecanismos de infecção intracelular persistente. Em primeira instância, a imunidade protetora contra todas as espécies é, por consenso geral, reconhecida como sendo Th1 dependente (ALEXANDER E BROMBACHER, 2012).

No entanto, as espécies do gênero *Leishmania* desenvolveram diferentes mecanismos para sobreviver no hospedeiro mamífero. Como consequência, criaram excelentes ferramentas para encontrar caminhos para evitar o desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora. Estudos envolvendo camundongos deficientes de citocinas, assim como diferentes espécies e linhagens de *Leishmania* questionaram a simplicidade, ou até mesmo a anulação da premissa básica de resistência/susceptibilidade do Th1/Th2 à infecção intracelular. Parte da reavaliação dessa premissa resultou na identificação de populações adicionais de células TCD4+, que incluem células TCD4+ reguladoras, células Th9 e Th17; que podem influenciar significativamente nos resultados da doença (ALEXANDER E BROMBACHER, 2012).

Células T reguladoras (Tregs) são linfócitos que regulam a resposta imune adaptativa em vertebrados superiores. Seu papel primordial é levar a homeostase e diminuir a inflamação causada pela produção excessiva de IL-10. Sua deficiência é associada a doenças autoimunes, incluem células T

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ derivadas do timo, e células T reguladoras naturais (nTreg) (PETERSON, 2012).

O papel das Tregs durante a infecção por *Leishmania* é multifacetado, promovendo doença ou proteção dependendo do modelo experimental utilizado. No modelo de infecção por *L. major*, tem sido demonstrado o acúmulo de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ nas lesões e linfonodos drenantes de camundongos resistentes da linhagem C57 BL/6, além do seu papel responsável pela persistência do parasito IL-10 dependente e infecção latente (ALEXANDER E BROMBACHER, 2012).

As células Th9 são consideradas um subgrupo de células Th2, que necessitam da influência adicional do TGF- β para ser reprogramada, bem como da IL-2. Células Th9 expressam o fator de transcrição PU.1 mas não expressam os fatores T-bet, GATA3, ROR- γ t, ou Foxp3. Células Th9 produzem tanto a IL-9 como IL-10, embora a expressão de IL-10 não seja regulada por PU.1. Enquanto células Th9 são consideradas a principal fonte de IL-9, esta citocina também pode ser produzido pelo Th17 e por células T reguladoras (NOVAK E NOELLE, 2010).

Estudos envolvendo o papel da IL-9 durante a leishmaniose são limitados e restritos à *L. major*. Trabalhos mostram que esta citocina pode ser induzida precocemente na infecção em camundongos BALB/c, DBA/2 e C57BL/6, susceptíveis e resistentes, respectivamente (GESSNER et al., 1993; NASHED et al., 2000) . No entanto, níveis elevados da IL-9 foram observados em camundongos BALB/c, e a capacidade das células TCD4⁺ em produzir IL-9 persistiu apenas nesta linhagem, com o progresso da infecção. A vacinação dos camundongos susceptíveis com anticorpos Anti-IL9 mostraram efeitos protetores, uma vez que há uma troca nos perfis Th2/Th1, em favor de uma resposta protetora (ARENDSE et al., 2005).

Células Th17 estão associadas com a proteção de superfícies da mucosa, mas também com doenças autoimunes e alergias. O seu desenvolvimento está sob a influência de TGF- β e IL-6 e IL-21. Células Th17 são caracterizadas, em particular pela produção de IL-17, e também pela secreção de IL-22 e IL-21 (ALEXANDER E BROMBACHER, 2012).

A IL-17 desempenha um papel significativo na migração, recrutamento e ativação de neutrófilos. Neutrófilos têm papel importante na infecção por *Leishmania*, sendo recrutados rapidamente ao sítio de inoculação, onde fagocitam os parasitos. Além disso, iniciam o processo inflamatório, importante para o estabelecimento da resposta imunológica. É de se esperar que as células Th17 teriam papel importante a desempenhar neste momento (CHARMOY et al., 2011).

Por exemplo, enquanto neutrófilos contribuem para uma resposta protetora contra *L. donovani*, eles promovem uma resposta favorável a infecção contra *L. major* em camundongos BALB/c. De modo geral, o papel das células Th17 permanecem incertos e tanto a promoção da doença quanto a proteção podem ser atribuídas à sua influência. Decisivamente, a espécie infectante e a genética do hospedeiro desempenham um papel na atividade das células Th17 (ALEXANDER E BROMBACHER, 2012).

3.7 Sinais Clínicos.

A apresentação clínica exibe polimorfismo e o espectro de gravidade dos sinais e sintomas também são variáveis, embora exista certa correspondência entre as distintas apresentações clínicas e as diferentes espécies do parasita. A presença de linfadenopatia localizada com ausência de lesão visual é comum. A úlcera típica de leishmaniose cutânea (LC) é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele; tem formato arredondado ou ovalado, mede de alguns milímetros até alguns centímetros, a base da lesão é eritematosa, infiltrada e de consistência firme, as bordas da ferida são bem delimitadas e elevadas com um fundo avermelhado e granulações grosseiras (BRASIL, 2007).

A forma disseminada da leishmaniose tegumentar é uma expressão relativamente rara que pode ser observada em até 2% dos casos, sendo, ultimamente, descritos em pacientes soropositivos para HIV. A forma cutânea difusa é rara, porém grave, que ocorre em pacientes com alergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (BRASIL, 2007).

Clinicamente, a forma mucosa se expressa por lesões severas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. A disseminação hematogênica ou linfática promove a lesão mucosa metastática. Geralmente, surge após a cura clínica da forma cutânea, com início insidioso e pouca sintomatologia. Na maioria dos casos,

resulta de casos de Leishmaniose cutânea sem tratamento ou com tratamento inadequado, que se tornam crônicas (BRASIL, 2006).

Em cães, a úlcera cutânea costuma ser única, eventualmente múltipla, localizada nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal. No entanto, deve-se estar atento a outras doenças que causem sinais clínicos semelhantes (BRASIL, 2007).

3.8 Diagnóstico.

É importante ressaltar que a utilização de métodos de diagnóstico laboratorial visa não somente a confirmação dos achados clínicos, mas subsidia informações epidemiológicas como a espécie envolvida no ciclo; essas informações, quando notificadas, orientam quanto às medidas a serem adotadas para o controle da doença. Na anamnese devem constar dados que relacionem a área residencial do paciente à região endêmica, características geográficas da área residencial, identificação dos insetos predominantes no local, além da presença de cães suspeitos (MARZOCHI et al., 1981).

Os dados relativos aos aspectos epidemiológicos das leishmanioses, referentes aos últimos dez anos, demonstram aumento na letalidade da doença em diversas regiões do País. Com o incremento dos recursos financeiros no tratamento intensivo, as normas quanto à investigação epidemiológica rápida, além do tratamento específico, constatando que o diagnóstico tardio contribui fortemente para o aumento da letalidade. Os dados do SINAN referentes aos anos de 2001 a 2008 demonstram indivíduos com idade menor que um ano e com 50 anos ou mais, são os pacientes que mais sofrem os resultados desse aumento de letalidade (BRASIL, 2011).

As técnicas diagnósticas laboratoriais são diversas e vão desde achados parasitológicos às técnicas imunológicas e biomoleculares. O Ministério da Saúde sugere o diagnóstico pelos exames parasitológicos direto, o isolamento *in vivo* ou *in vitro*, a reação de imunofluorescência reativa com título de 1:80 ou mais, atentando para as reações cruzadas, e os testes imunocromatográficos, comumente conhecidos como teste rápido, que utilizam antígenos recombinantes (BRASIL, 2011).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é uma reação de hipersensibilidade tardia bastante empregada na rotina de pacientes com a forma cutânea e mucocutânea da doença (MARZOCHI et al.,1995; REED et al.,1996). A técnica pode apresentar resultado negativo quando realizado muito cedo (um mês), mesmo na presença de lesões cutâneas, ou em repetições do teste com poucas semanas de intervalo (WEIGLE et al., 1991).

A partir da década de 80, várias técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania*, sem necessidade de isolamento do parasita em cultura. As provas moleculares de detecção e identificação da doença são empregadas no diagnóstico da doença e estudos taxonômicos. Elas permitem diagnosticar doenças infecciosas baseado na amplificação do DNA. Métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR) para detecção de RNA e PCR para detecção de DNA, estão disponíveis para identificação do parasita (GONTIJO E MELO, 2004).

Entre os métodos laboratoriais utilizados para detecção do agente etiológico ou do seu material genético, a PCR é considerada uma técnica de diagnóstico bastante específica. Algumas das vantagens desse método quando comparado a outros métodos parasitológicos são a possibilidade da detecção do DNA de *Leishmania*, mesmo com uma baixa carga parasitária; especificidade, disponibilidade rápida de resultados, possibilidade da utilização de diferentes materiais biológicos e a possibilidade de detectar o DNA de promastigotas e amastigotas (GOTO e LINDOSO, 2010).

Os principais alvos utilizados são o DNA do cinetoplasto (kDNA), sequências de DNA codificadoras de RNA ribossômico (rDNA), lócus do mini-exon, lócus da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), sequências teloméricas, entre outras (LIMA, 2010).

Nos estudos com leishmaniose visceral, a PCR tem sido utilizada com várias finalidades além do diagnóstico, tais como o monitoramento do tratamento e estudos epidemiológicos, inclusive identificando várias espécies tendo grande valor na detecção de *Leishmania* spp em flebotomíneos (PAIVA et al., 2006). Esta técnica tem sido descrita como um método sensível para a detecção do parasita,

independente da imunocompetência ou da história clínica do paciente (WEISS, 1995). Muitos centros de pesquisas têm avaliado o uso da PCR para o diagnóstico de leishmaniose visceral utilizando o sangue periférico, considerando que a biópsia esplênica e a punção de medula óssea não são técnicas adequadas para uso fora do ambiente hospitalar (LACHAUD et al., 2001).

Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, a PCR é mais usada em estudos epidemiológicos do que no diagnóstico de rotina (SOLANO-GALEGO et al., 2001). Para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes para se tornar mais simples e com custo operacional mais baixo.

Para sorologia específica, a punção de medula óssea para o diagnóstico parasitológico é primordial (BAIN, 2001). O hemograma com contagem de plaquetas, a velocidade de hemossedimentação, creatinina, uréia, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, atividade de protrombina, albumina, globulina, fosfatase alcalina, bilirrubinas e amilase sérica são outros exames que poderão complementar e auxiliar o profissional médico na determinação da doença. Com o intuito de prevenir ou detectar precocemente complicações infecciosas e hemorrágicas, o sumário de urina, hemocultura, urocultura e radiografia do tórax devem ser solicitados. Em decorrência da prevalência elevada de coinfeção HIV-leishmania recomenda-se oferecer o teste de HIV a todo paciente com diagnóstico de leishmaniose, considerando que esta pode manifestar-se como doença oportunista em pessoas imunodeprimidas (BRASIL, 2009).

De acordo com a Nota Técnica n.º 48/2011 do Ministério da Saúde, o diagnóstico laboratorial da doença no cão é semelhante ao realizado para o paciente humano, baseado no diagnóstico parasitológico e sorológico. Os métodos diagnósticos sorológicos da LVC, recomendados pelo Programa de Vigilância e Controle das Leishmanioses para os órgãos de saúde pública no Brasil são o Ensaio Imunoenzimático (Elisa) como método de triagem e a Reação de Imunofluorescência Indireta (Rifi) como confirmatório, cujos kits, no ano de 2011, tiveram sensibilidade e especificidade acima de 95%.

3.9 Tratamento.

Algumas formas de leishmanioses, como a visceral, podem ser fatais ao paciente se não tratadas. Na falta de uma vacina eficaz, o controle dessas doenças fica dependente unicamente da quimioterapia. Os medicamentos utilizados contra as leishmanioses ainda são muito restritos. Os antimoniais pentavalentes são as drogas de escolha para o tratamento das leishmanioses há mais de 60 anos (FRÉZARD et al., 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde (2009) preconiza o uso do antimoníato de N-metil glucamina, o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal. A prescrição de um desses medicamentos deve ser feita considerando a faixa etária, presença de gravidez, co-morbidades e o perfil de toxicidade das drogas. Todas as drogas de escolha pelo órgão são tóxicas e com diversos efeitos colaterais (PELISSARI et al., 2011).

No Brasil, uma Portaria Interministerial do Ministério da Saúde e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nº 1.426, de 11 de julho de 2008 proíbe, em todo o território nacional, o tratamento de leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA para tratamento específico em cães. Regulamenta ainda que, para a obtenção de registro no MAPA, o produto de uso veterinário para tratamento de leishmaniose visceral canina deverá preferencialmente ser constituído de drogas ou princípios ativos não destinados ao tratamento de seres humanos. Portanto, o tratamento descrito abaixo refere-se exclusivamente ao uso humano.

Antimônio Pentavalente

O antimônio trivalente, ou tártaro emético, foi instituído no Brasil por Gaspar Vianna em 1912. Atualmente, sob a forma de antimoniais pentavalentes (SbV), são as drogas de escolha para o tratamento das leishmanioses. Há comercialmente o antimoníato de N-metilglucamina (NMG) (Glucantime), na América Latina e África, e o estibogluconato de sódio (SGS) (Pentostam), nos EUA e Europa (LIMA et al., 2007).

Embora os antimoniais sejam a base da terapia antileishmania, seu mecanismo de ação ainda permanece incerto. Dados recentes sugerem que o antimônio compromete o potencial redox tiol da célula induzindo o efluxo de tiol

intracelular e inibindo a tripanotona redutase (OUELLETTE et al., 2004). Uma enzima específica do parasito, TDR1, pode catalisar a conversão de SbV para Sb III usando glutatona como redutor. A enzima antimônio redutase, ACR2, também reduz o SbV e aumenta a sensibilidade ao mesmo. O tiol, incluindo tiol parasito-específico como glicilcisteína, pode reduzir SbV para Sb III de forma não enzimática. É possível que mais de um mecanismo seja responsável pela ativação da droga (LIMA et al., 2007).

O esquema terapêutico recomendado para a leishmaniose visceral é de 20mg/Kg/dia, durante 20 dias, podendo chegar a 30 dias e, no máximo, 40 dias, utilizando o limite máximo de 3 ampolas/dia. As injeções devem ser feitas por via intravenosa ou intramuscular, com repouso após a aplicação. A via intramuscular pode apresentar o inconveniente da dor local (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Os antomoniatos pentavanentes apresentam diversos efeitos colaterais tais como artralgia, mialgia, inapetência, náusea, vômito, sensação de plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insônia, choque pirogênico, edema, hepatite com aumento de transaminases e fosfatase alcalina, insuficiência renal aguda por alteração da liberação do hormônio antidiurético e toxicidade direta sobre as células tubulares, pancreatite e alterações dose-dependentes do eletrocardiograma (ECG), cardiotoxicidade, pancreatite, (LIMA et al., 2007; SUNDAR E CHAKRAVARTY, 2010; PIMENTEL et al., 2011). Deve-se observar que, mesmo doses menores da droga também podem induzir efeitos colaterais (CASTRO et al., 1990).

A resistência ao medicamento é ponto de discussão quanto ao seu uso correto e o surgimento de cepas resistentes. Este fenômeno é complexo e multifatorial, pois vários são os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência. Testes *in vitro* de sensibilidade em células infectadas continuam a ser a melhor estimativa dos mecanismos de resistência da Leishmania, porém, as discrepâncias entre os mecanismos de resistência demonstrados *in vitro* e nas apresentações clínicas da doença tornam necessárias o uso de testes moleculares para identificar marcadores de resistência; mediante testes de fácil implementação, substituindo a determinação demorada de IC₅₀ no modelo de macrófagos infectados com as formas amastigota do parasita. (JEDDY et al., 2011).

Anfotericina B

A Anfotericina B é um antifúngico, produzido por cultura de actinomicetos *Streptomyces nodosus*. É considerada como droga de primeira escolha no tratamento de gestantes e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Interage com os esteróis da membrana, principalmente o ergosterol, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita (SUNDAR et al., 2004).

Embora altamente eficaz, a anfotericina B é tóxica e está associada a efeitos secundários graves. No entanto, em áreas onde há altos níveis de resistência ao antimoniato pentavalente, a anfotericina é claramente a droga de eleição para o tratamento, uma vez que casos de resistência não aparecem rapidamente. Novas formulações lipídicas da anfotericina retêm sua atividade antifúngica, enquanto diminuem drasticamente sua toxicidade (OUELLETTE et al., 2004).

A dose preconizada pelo Ministério da Saúde é de 1mg/kg/dia e apesar de ser a droga de segunda escolha no tratamento da leishmaniose, seu uso é limitado pelos efeitos adversos, como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos doentes (LIMA et al., 2007), sendo que toda sua terapêutica deve ser realizada com o paciente hospitalizado.

Pentamidina

A pentamidina, uma diamina aromática, é a droga de segunda escolha no tratamento da leishmaniose, sendo utilizada na forma de sais de pentamidina (isotionato de pentamidina). Quanto ao mecanismo de ação, tem sido relatado que atua na inibição da topoisomerase II mitocondrial, interfere no potencial de

membrana da mitocôndria, no transporte de cálcio, além de modificações no cinetoplasto do protozoário (BASSELIN et al., 1996).

Um estudo comparando a eficácia do isotionato de pentamidina (4mg/kg/dia), três aplicações, intramuscular, durante uma semana, e N-metilglucamina, 20 mg SbV/kg/dia durante 20 dias, intravenoso, apontou eficácia semelhante, tendo a vantagem do menor tempo de tratamento e menor toxicidade cardíaca (PAULA et al., 2003).

Os efeitos adversos da pentamidina incluem hipotensão, náuseas, vômitos, síncope, alterações renais, além dos efeitos sistêmicos no metabolismo da glicose (diabetogênico e hipoglicemia) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi originalmente desenvolvida para o tratamento de metástases cutâneas de carcinomas mamários (LEONARD et al., 2001) mas que também demonstra atividade contra *Leishmania*. Tem sido empregada desde 1998 na Índia para o tratamento da leishmaniose visceral e a sua eficácia levou a uma avaliação como um tratamento das outras formas de leishmaniose (VÉLEZ et al., 2010). Tem sido testada com bons resultados *in vitro*, em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*, desde 1987 e a partir de 1992, *in vivo*, na leishmaniose visceral (COSTA-FILHO et al., 2008).

Esta droga age interferindo na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, depois modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolípidos, induzindo morte celular por apoptose (PARIS et al., 2004; VERMA E DEY, 2004).

A miltefosina parece ser uma alternativa para o tratamento de pacientes, uma vez que sua ação não está relacionada ao estado imunológico do hospedeiro. Entretanto, o fármaco parece afetar o sistema gastrointestinal, causando vômitos e diarreia, além de poder aumentar os níveis sanguíneos de transaminases, bem como elevar os níveis de uréia e creatinina (FISCHER et al., 2001).

Paramomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, extraído de *Streptomyces rimosus*. Atua na inibição de síntese protéica através da ligação às proteínas ribossômicas, induzindo uma leitura equivocada do mRNA. Desta forma, interfere no complexo de formação de peptídeos e causando ruptura dos polissomos em monossomos não-funcionais (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Por via parenteral tem mostrado eficácia, tanto isolado quanto combinado ao antimônio pentavalente para leishmaniose visceral. Na Índia e no Quênia teve resultado promissor com cura de 90% para leishmaniose visceral na dose de 15mg/kg/dia durante 20 dias, incluindo casos refratários ao antimônio (THAKUR et al., 2000).

No entanto, a paromomicina pode apresentar nefrotoxicidade e ototoxicidade, afetando o oitavo par de nervos cranianos, o que pode levar também a problemas de controle motor e do equilíbrio (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

3.10 O uso da fitoterapia nas leishmanioses.

O tratamento químico clássico contra as leishmanioses apresenta vários óbices, dentre eles o custo dispendioso, efeitos colaterais deletérios ao paciente e a comprovada resistência de algumas cepas aos medicamentos; por conseguinte, existe uma necessidade de investigar outros alvos terapêuticos e de controle da doença, quando comparadas às drogas de eleição.

A fitoterapia foi a terapêutica predominante até a primeira metade do século XX. A OMS estima que 50% da população mundial fazem uso de preparações oriundas de plantas medicinais. Atualmente, no continente africano, o uso de plantas para tratamento de doenças representa 80% da prática terapêutica escolhida (DA SILVA et al., 2011), os quais representam alternativas frente ao alto custo dos fármacos sintéticos e a ampla distribuição das leishmanioses naquele continente (TUROLLA E NASCIMENTO, 2006).

Mohammad (2011) demonstrou que o uso associado do extrato de *Ephorbia milii*, *Aloe vera*, gordura animal e açafrão (*Curcuma aromática*) tem grande influência no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo murino. Em trabalho de revisão sobre duas importantes plantas de amplo uso medicinal no continente africano, Da Silva et al. (2011) demonstraram que a pristimerina, metabólito presente

na *Maytenus senegalensis*, tem atividade, *in vitro*, contra formas promastigota de *L. major*, que é uma cepa de referência no desenvolvimento de vacinas.

Algumas plantas utilizadas na medicina popular brasileira (*Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla*, *Mikania glomerata*, *Ocimum gratissimum*, *Piper regnellii*, *Prunus domestica*, *Psidium guajava*, *Sambucus canadensis*, *Stryphnodendron adstringens*, *Tanacetum parthenium*, e *Tanacetum vulgare*) apresentaram atividade leishmanicida de seus extratos brutos (LUIZE et al., 2005).

A utilização de óleos de *Copaifera reticulata* (copaíba) no tratamento da leishmaniose é citada em vários estudos etnofarmacológicos (GRENARD E MORETTI, 1987; KVIST et al., 2006). Um estudo recente de Santos et al. (2012) sobre a atividade leishmanicida do óleo de copaíba contra promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares do parasita, comprovaram que a morfologia típica destas formas mudou drasticamente após o tratamento com óleo de copaíba.

Oliveira et al. (2002) comprovaram a viabilidade do extrato de *Porophyllum ruderale* (jack.) Cass. (arnica) sobre formas promastigotas, amastigotas intracelulares e amastigotas de cultura axênica de *Leishmania (Leishmania) mexicana*. No Estado do Pará, Chagas et al. (2010) avaliaram o extrato aquoso de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae) (acapurana) para resposta imunomoduladora, revelando potencial imunossupressor com atividade anti-inflamatória, diminuindo os danos teciduais causados pelo sistema imune em resposta à infecção.

Mendes (2006) observou atividade dos extratos de *Morella pubescens* e da *Guarea glabra* no crescimento dos parasitos, comprovando a atividade de tais extratos na produção dos ácidos orgânicos do metabolismo das promastigotas, possibilitando a identificação de alvos específicos de ataque.

Nico (2006), pesquisando um novo adjuvante na vacinação contra leishmaniose, no modelo murino de leishmaniose visceral canina, determinou a saponina CP05 de *Calliandra pulcherrima* Benth como potencial adjuvante com o antígeno FML de *Leishmania (L.) donovani*. Luize et al. (2005) observaram atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Tanacetum parthenium* apresentando efeito significativo contra *Leishmania amazonensis*.

Ramírez-Macías et al. (2012) avaliaram atividade leishmanicida *in vitro* de nove flavonoides derivados da *Delphinium staphisagria* em *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*. Os nove flavonoides apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas de ambas espécies e em concentrações semelhantes até ou inferiores que o medicamento de referência (Glucantime®).

Almeida-Souza (2011) demonstrou que o extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia* (Noni) é ativo contra *L. amazonensis* em modelo *in vitro* e promissor para novas pesquisas de opções terapêuticas para leishmaniose.

3.11 Espécie vegetal em estudo.

Como uma possível droga no tratamento das leishmanioses, foi selecionada a *A. chica*, conhecida popularmente como cipó-pau, cipó-cruz, carajuru, carapiranga (CORREA, 1984), pariri, carajiru, crajiru, carajeru, crejer, entre outras, pertencente à família das Bignoniaceae, que possui 78 gêneros e 832 espécies (LOHMANN E ULLOA, 2008), as quais são encontradas, em sua maior parte, nas regiões tropicais e subtropicais, com duas grandes regiões nativas, o Brasil e o continente africano; o Brasil é o país com o maior número de espécies, ocorrendo desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul (PAULETTI et al., 2003). Os compostos farmacologicamente importantes dessa família são o ácido ursólico, ácido oleanólico, α e β -lapachona, lapachol, verbascoside, corymboside, lupeol, quercitrina, apigenina, ácido pomólico e isoacteoside; compostos com reconhecida atividade moluscicida, tripanocida, larvicida, anti-oxidante, antidiabético, antiplasmódio, anti-inflamatório, imunostimulantes, antimicrobiana, antidepressivo, antiofídico, antineoplásico, antinociceptiva e neurotrófico (RAHMATULLAH et al., 2010).

A *A. chica* tem a seguinte classificação taxonômica (CRONQUIST, 1981):

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Subclasse: Asteridae

Ordem: Scrophulariales

Família: Bignoniaceae

Gênero: *Arrabidaea*

Espécie: *Arrabidaea chica*

É uma planta arbustiva, uma liana lenhosa de tronco em formato quadrangular, de cor cinza bem como seus ramos, que são estriados. Possui folhas compostas bi ou trifolioladas, penaticomposta do tipo imparipenada, de folíolos glabros, oblongos e lanceolados; fitotaxia tipo oposta dística e com estômatos distantes. Suas flores são campanuladas, róseas a violáceas, em disposição terminal (LOHMANN E HOPKINS, 1999; LORENZI E MATOS, 2002). O fruto é alongado, linear e capsular, extremidades afiladas, uma nervura medial, cor castanho-ferrugem e com sementes elipsoides (COSTA et al., 2001). A planta alcança, em média, 2,5 m de altura e possui folhas modificadas denominadas gavinhas, que auxiliam na sua fixação ao substrato (CORRÊA, 1984) (Figura 04).



Figura 04: *Arrabidaea chica* (H E B) B. Verlt. (RODRIGUES et al., 2009)

As espécies pertencentes ao gênero *Arrabidaea* são usadas na medicina tradicional para assepsia de feridas e tratamento de desordens intestinais (CORRÊA, 1926). Alcerito et al. (2002) isolaram quatro flavonoides com atividade antifúngica das folhas de *A. brachypoda*. Pauletti et al. (2003) descobriram novas glicosilxantonas isoladas do caule de *Arrabidaea samydoides* que apresentaram propriedades antioxidantes.

A medicina popular atribui à espécie um amplo espectro de ação: antiinflamatórias, adstringentes e terapêuticas; tem conhecido uso no tratamento de dermatopatias (psoríase, dermatites, feridas, úlceras, piodermites), nos transtornos intestinais, reprodutivos, hematológicos, neoplasias orais, uterinas e leucemia; urólitos, hipertensão arterial sistêmica, conjuntivites, diabetes mellitus, algumas hepatopatias, na prevenção de cáries dentárias e uso cosmético, (GENTRY, 1992; RÊGO, 1995; KALIL FILHO, 2000). Seu uso se dá pela forma de banhos de assento, pomadas, cremes, tinturas, chás e lavagens (BORRÁS, 2003).

Das folhas de *A. chica* foi isolado o 3-deoxiantocianidina (carajurina) no primeiro estudo fitoquímico da planta (CHAPMAN et al., 1927), um pigmento muito utilizado por índios para fazer tatuagens e no tratamento de oftalmias e repelente de insetos (ZORN et al., 2001). Este pigmento não era restrito à *A. chica* (TAKEMURA et al., 1995) como achavam anteriormente (SCOGIN, 1980; HARBORNE E WILLIAMS, 1998); após o isolamento de antocianinas, fito-esteróis, 7,4'-di-hidroxi-5-metaxiflavona e 6,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavona (carajuruflavona).

No vegetal *A. chica*, foram identificados alguns pigmentos derivados da cajurina: a carajurina e a carajurona (GRENARD et al., 1987). Também foram isolados fitosteróis, flavonoides e pigmentos utilizados em cosméticos (ESTRELA, 1995; ZORN et al., 2001; DEVIA et al., 2002). A 3-deoxiantocianidina, a 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium e a 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilium, isoladas das partes aéreas da *A. chica* juntamente com a conhecida 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (carajurina) são antocianinas, corantes naturais raramente isoladas e identificadas devido à sua grande instabilidade. As antocianinas são fundamentais nos mecanismos de polinização de flores, na dispersão de sementes por insetos, na defesa contra insetos predadores, além dos relatos do alto poder antioxidante em doenças metabólicas (KONG et al., 2003).

Também é reconhecida pelo uso do extrato das folhas como agente de cicatrização de feridas, exibindo estimulação de crescimento de fibroblastos e da síntese de colágeno *in vitro* e *in vivo* (JORGE et al., 2008). Lentz (1993) também observou o uso da *A. chica* contra picada de insetos e cobras.

O extrato alcoólico da *A. chica* foi testado a uma concentração de 4 mg/kg e exibiu uma atividade significativa em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, induzindo 41% de lise de células (BARBOSA et al., 2008). Além disso, o extrato etanólico *in*

vitro, não demonstrou qualquer toxicidade aguda relevante, mesmo a uma dose de 1000 mg/kg. Cartágenes (2009), avaliando o efeito do extrato da *A. chica* em camundongos não observou sinais de morte ou tóxicos. Outros estudos também não observaram efeito tóxico do extrato hidroalcolico da *A. chica* (OLIVEIRA et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1998; SAMPAIO et al., 1998; CUNHA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004; PAES et al., 2005;).

Amaral et al. (2012) pesquisaram o uso do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* e suas frações, quanto à ações antioxidantes, citotóxicas, antibacterianas e diuréticas. As amostras demonstraram atividade antioxidante, diurética e nenhuma citotoxicidade ou atividade antimicrobiana. O uso para tratar infecções do trato urinário deve-se pela ação diurética demonstrada, o que aumenta as 'lavagens' do trato urinário, reduzindo a multiplicação bacteriana na vesícula urinária.

3.12 Legislação sobre Fitoterápicos.

Os fitoterápicos são produtos obtidos de plantas medicinais, ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, de acordo com o Plano Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.

Desde que a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu, em 1978, o uso oficial de fitoterápicos, o Brasil desenvolveu, regularmente, legislação satisfatória que abrange o uso e a pesquisa de plantas medicinais. Iniciada pela Portaria Ministerial n.º 212 de 1982, que instituiu a investigação clínica de plantas de uso medicinal; apoiada pelo decreto 5.813, de 2006, que institui a Política Nacional de Plantas Medicinais; a portaria n.º 971, de 2006, que insere as práticas integrativas e complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Portaria Interministerial n.º 2.960, de 2008, que instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico, mediante a coordenação de um comitê (FARMACOPÉIA, 2011).

Os medicamentos desenvolvidos a partir de extratos vegetais padronizados por desenvolvimento de pesquisas, que usam os mesmos padrões estabelecidos para os medicamentos sintéticos, seguem critérios estabelecidos pela

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2009). Em 2008 foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS), contendo 71 plantas, porém com poucas informações sobre as mesmas. A Portaria GM/MS nº 886/2010 instituiu, no âmbito do SUS, o programa Farmácia Viva (FARMACOPÉIA, 2011).

A regularização sobre a utilização da biodiversidade da flora brasileira, com o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, também está sob o âmbito do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), que é o órgão competente para emitir as autorizações de acesso ao patrimônio genético de espécies para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico; o que inclui a atividade de elaboração de fitoterápicos, cuja função de secretaria executiva é exercida pelo Ministério do Meio Ambiente.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA instituiu, por Instrução Normativa (154/2007), o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, que regula as normas sobre a realização de atividades com finalidade científica ou didática no território nacional através do registro voluntário para coleta de material botânico, dentre outros.

Em relação às prospecções econômicas sobre mercado de fitoterápicos, as estimativas apontam que essa modalidade terapêutica deverá movimentar cerca de US\$ 93,5 bi em 2015 (SCARAMUZZO, 2012); a Associação Brasileira de Fitoterapia (ABIFIT) alerta, ainda, sobre o uso de plantas típicas do Brasil serem largamente exploradas por empresas européias e norte-americanas, em função de diferenças sobre a pesquisa em fitoterápicos; cerca de 70% dos pesquisadores da área de fitoterápicos de países desenvolvidos estão na iniciativa privada, enquanto que no Brasil a pesquisa ainda está muito concentrada no meio acadêmico.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

- Realizar a caracterização fitoquímica e avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* dos extratos brutos de folhas e caule de *Arrabidaea chica*.

4.2 Específicos

- Identificar as classes de constituintes químicos dos extratos brutos de *Arrabidaea chica*;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos de *Arrabidaea chica* em cultura de células;
- Avaliar a atividade dos extratos brutos de *Arrabidaea chica* contra formas promastigota de *L. amazonensis*.

5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 Área de Coleta

A coleta das amostras de *A. chica* foram realizadas no Viveiro Tracoá, localizada em São José de Ribamar, na Ilha de São Luis, Maranhão, Brasil (Figura 5), nos meses de agosto a novembro do ano de 2011. A ilha está à 2° ao Sul do Equador, nas coordenadas geográficas latitude S 2°31' e longitude W 44°16', com área de 1.455,1 km² e à 24 metros acima do nível do mar. Possui solo predominantemente argissolo, com rochas sedimentares, clima tropical, quente e úmido. A coleta foi realizada na estação seca com índice médio de precipitação pluviométrica de 900 mm e temperatura média de 28 °C (LABMET, 2012).

A exsicata da planta encontra-se registrada e catalogada sob o número 1067, no herbário “Atico Seabra” do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão.

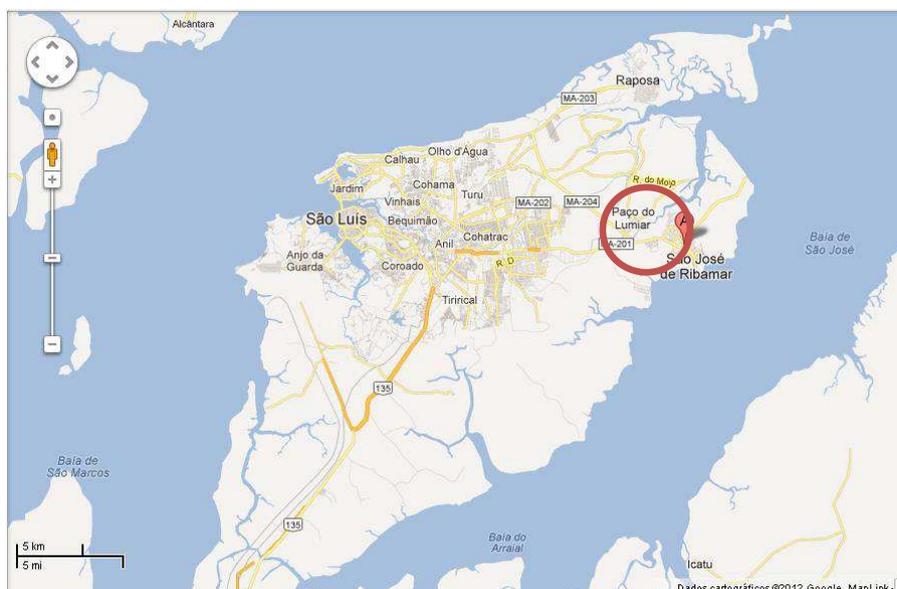


Figura 5 – Localização geográfica do local de coleta das amostras de *Arrabidaea chica* – Ilha de São Luis – MA (Google Earth, 2012).

5.2 Preparo dos extratos de *Arrabidaea chica*

Para a obtenção dos extratos etanólicos brutos (EEBs) de *A. chica*, folhas e caule, após separação e limpeza, foram deixados por 96 horas em estufa à 40°C e circulação de ar forçado, para secagem. O material vegetal seco foi então triturado em moinho de facas, separadamente, folha e caule, e os macerados foram imersos em álcool etílico a 96 °GL na proporção 3:1. Em seguida, os macerados foram filtrados em funil de Buchner com papel filtro e bomba a vácuo; concentrados à baixa pressão entre 30 a 40 °C, em evaporador rotatório, até a evaporação completa do solvente; acondicionado em frasco âmbar e conservado à -20°C até a liofilização e realização dos testes (BARBOSA et al., 2004).

Para determinação do peso seco foram utilizadas três alíquotas de 0,5 mL do EEB em béckeres secos previamente tarados. O solvente das alíquotas foi evaporado sob corrente de ar quente e os béckeres, após resfriados, foram pesados em balança analítica para determinação do peso seco dos resíduos. Esta operação foi repetida sucessivas vezes até obtenção de pesos constantes. Para cálculo do rendimento (%) utilizou-se o peso total do pó, o peso seco obtido e o volume final total do extrato concentrado, de acordo com Cartágenes (2009).

A preparação do estudo e as análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Porto Nacional.

5.3 Análise fitoquímica

Os extratos foram submetidos a identificação dos constituintes químicos por classe metabólica. As classes de metabólitos secundários testados foram: saponinas, antocianinas e chalconas, fenois e taninos, flavonoides, esteroides e triterpenoides e antraquinonas, de acordo com Costa (1982) e Matos (1997).

5.3.1 Antraquinonas

Em uma placa de 96 poços, 150 µL da amostra do extrato foram colocados em três poços e adicionado 50 µL de NaOH 0,5M. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas.

5.3.2 Flavonoides

A amostra foi gotejada em tira de papel de filtro e em seguida adicionado solução 5% de AlCl_3 . O aparecimento de fluorescência de cor amarela sob luz UV 365 nm indica a presença de flavonoides.

5.3.3 Triterpenoides e esteroides

Em uma placa de 96 poços, foram pipetados em um poço 150 μL da amostra. Em seguida, foi adicionada 1 gota de anidrido acético e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de cor azul-esverdeada indica a presença de esteroides e a cor vermelha, presença de triterpenoides.

5.3.4 Saponinas

Em três tubos de ensaio foi colocado 1 mL da amostra e 2 mL de água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos e colocado em repouso por 10 minutos. A presença de espuma com altura superior a 1 cm indica a presença de saponinas.

5.3.5 Compostos fenólicos

A amostra foi gotejada em tira de papel de filtro e em seguida adicionado solução 5% de FeCl_3 . O aparecimento de mancha azul escura indica a presença de compostos fenólicos.

5.3.6 Taninos

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL da amostra e gota a gota, foi adicionado uma solução de gelatina a 2,5%. A formação de precipitado branco indica a presença de taninos.

5.3.7 Antocianidinas e chalconas

Em três tubos de ensaio foi adicionado 1 mL da amostra. No tubo 1, foi adicionado HCl 0,5M até atingir pH 3,0. No segundo e no terceiro tubo foi adicionado NaOH 0,5M até atingir pH 8,0 e 11,0 respectivamente. O aparecimento de cor vermelha, lilás e azul-púrpura nos tubos 1, 2 e 3 respectivamente, indica a presença de antocianidinas, enquanto a coloração vermelha nos tubos 1 e 3 é indicativo de chalconas.

5.4 Cultura de Parasita.

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina (50 µg/mL) e penicilina (100 µg/mL), a 26°C em estufa BOD. Para garantir a característica de infectividade, foram utilizadas somente culturas de promastigota com no máximo sete passagens *in vitro*.

5.5 Atividade dos extratos de *A. chica* contra formas promastigotas

A concentração de uso dos extratos foi determinada por triagem. Os extratos foram diluídos em DMSO e, de forma seriada em triplicata, adicionados em placas de 96 poços contendo meio RPMI. Foram determinados poços contendo apenas o meio e o parasita, sem adição do extrato ou da droga de referência; poços somente com o meio e poços com a droga de referência, Anfotericina B, na dosagem de 2 µg/mL. Estes poços são usados como controle, indicando contaminação e resistência do parasita avaliado.

Após o preparo da placa com as concentrações seriadas dos extratos a serem testados, adicionou-se em cada poço 100 µL de cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase log (1×10^6 parasitos/mL) cultivados em meio RPMI, incubando posteriormente a placa em BOD a 26°C.

A viabilidade das formas promastigotas foi mensurada no final dos intervalos 24, 48 e 72 horas, através da observação de parasitas viáveis em

microscópio invertido, classificando de acordo com a mobilidade dos parasitos em zero (nenhuma forma viável), cinco (poucas formas viáveis) e dez (formas viáveis).

Após o tratamento, a atividade leishmanicida foi realizada mediante a contagem de parasitas viáveis em câmara de Neubauer. Os dados normalizados, conforme fórmula abaixo foram utilizados para a análise estatística e cálculo do IC₅₀ da substância testada.

5.6 Cultivo celular

Macrófagos da linhagem J774.G8 foram cultivados em frascos de 25 cm² com meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20 mM de L-glutamina, bicarbonato de sódio a 7,5%, penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) a 37 °C e 5% de CO₂. A solução teve o pH ajustado em 6,9 com variação de 0,3.

5.7 Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* do extrato de *A. chica* foi realizada através do ensaio colorimétrico MTT, conforme Mosmann (1983). Foram pipetados 100 µl do cultivo de células J774.G8 cultivadas em RPMI para placas de 96 poços com densidade de 10⁶ células/mL. Para melhor adesão das células no fundo dos poços, as placas eram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C em 5% CO₂. Após este período foram adicionadas concentrações seriadas de 500 a 0,97 µg/mL do extrato de *A. chica*. Para cada concentração do extrato, foi mantido um controle negativo somente com o extrato e o meio. A droga de referência para avaliação de citotoxicidade foi o DMSO em diluições seriadas iniciadas com 20%. As placas eram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C em 5% CO₂. Após o intervalo de 24 horas, foram adicionadas 20 µl de MTT na concentração de 5 mg/mL e incubadas por duas a quatro horas em estufa sob as mesmas condições. Após este período a placa foi centrifugada a 1500 rpm por cinco minutos. De todos os poços da placa eram retirados 200 µl do líquido, adicionados e homogeneizados 100 µl de DMSO

em cada poço. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem, sendo determinada a concentração que inibe 50% do crescimento celular (CC₅₀), através do programa GraphPad Prism 5.

5.8 Análise dos resultados.

Os resultados numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão, sendo organizados em tabelas ou plotados em gráficos. Para as variáveis com distribuição paramétrica foi utilizada a análise de variância (ANOVA). As análises foram feitas com o software GraphPad Prism 5.0.4 (GraphPad Software Inc.).

5.9 Comitê de Ética Experimental

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sob número de protocolo 26/2009.

6. RESULTADOS

6.1 Extratos brutos etanólicos e prospecção fitoquímica da *A. chica*.

O extrato resultante das folhas da *A. chica* foi de textura cremosa de odor adocicado e cor vermelha alaranjada intensa, enquanto o extrato do caule tinha textura colóide de cor verde escura intensa e odor adocicado. O rendimento do extrato de folhas foi de 59,2% e o rendimento do caule foi de 3,33%. O liofilizado das folhas, de cor vermelha intensa, apresentou-se como uma mistura amorfa altamente higroscópica.

Os resultados da prospecção fitoquímica (Tabela 1) mostraram que os extratos de folhas e caule de *A. chica* possuem flavonoides, taninos, antocianinas e chalconas. Diferindo nos metabólitos somente em relação aos compostos fenólicos, que está presente nas folhas e não foi detectado no extrato proveniente do caule.

Tabela 01 – Prospecção fitoquímica do extrato bruto etanólico da folha e do caule de *Arrabidaea chica*.

Classe dos metabólitos	<i>Arrabidaea chica</i>	
	Folha	Caule
Antraquinonas	-	-
Flavonoides	+	+
Triterpenos/éster	-	-
Saponinas	-	-
Compostos fenólicos	+	-
Taninos	+	+
Antocianinas/chalconas	+	+

(+) presença; (-) ausência

6.2 Atividade dos extratos de *A. chica* anti-promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Durante os testes de triagem dos extratos da planta, quanto às concentrações de potencial leishmanicida, o extrato do caule da *A. chica* não demonstrou ação contra o protozoário, na maior concentração testada 500 µg/mL durante 72 h de incubação, portanto não foi utilizado na continuidade dos testes.

Em relação ao extrato bruto proveniente das folhas de *A. chica*, a triagem, através da avaliação em microscópio invertido, demonstrou redução da viabilidade em 50% das formas promastigotas na concentração de 125 µg/mL, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação; assim como a concentração de 250 µg/mL que também apresentou ação leishmanicida em 24 e 48 horas, mas demonstrou ausência total de viabilidade dos parasitas no intervalo de 72 h de incubação; a concentração de 500 µg/mL foi a dosagem que demonstrou melhor eficiência, nos três intervalos testados, contra os parasitas, conforme pode ser observado na Figura 6.

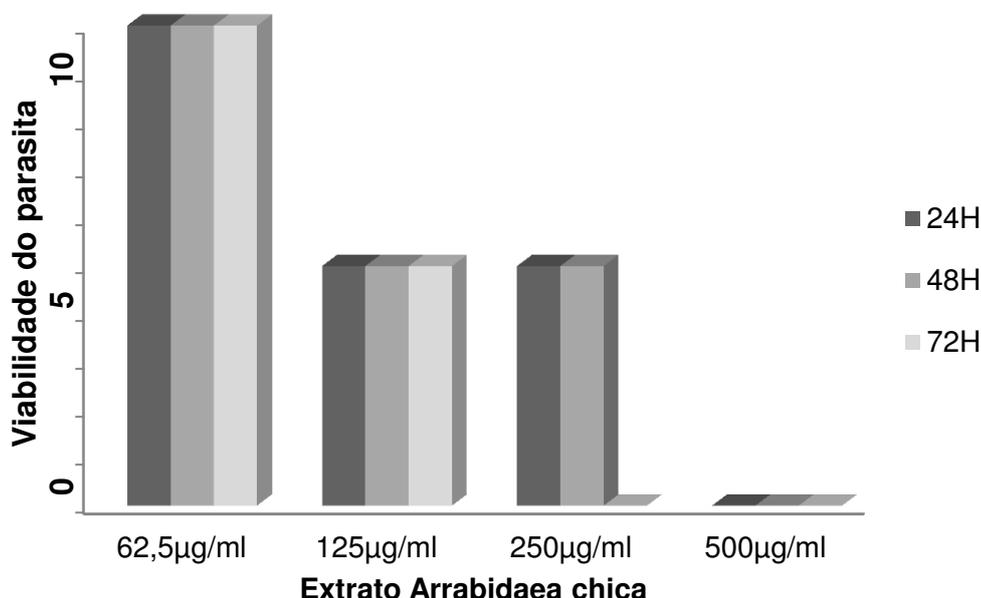


Figura 6 – Inibição de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cultivadas em meio RPMI, a 24°C, e tratadas com extrato bruto das folhas de *Arrabidaea chica* nas concentrações de 62,5 a 500 µg/mL. Escore: (10) viáveis, (5) pouco viáveis, (0) inviáveis.

A droga de referência utilizada, a Anfotericina B, provocou a redução de 50% do número de promastigotas viáveis a partir de uma concentração de 0,76 µg/mL, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração inibitória de 50% (IC₅₀) das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, após 72 horas de tratamento com o extrato bruto etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* e Anfotericina B

Tipos de tratamento	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato etanólico da folha de <i>A. chica</i>	155,9 ± 0,1185
Anfotericina B	0,76 ± 0,9218

Os valores representam média ± desvio padrão.

O efeito do extrato bruto das folhas de *A. chica* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foi monitorado durante três dias consecutivos. O IC₅₀ foi determinado na concentração de 155,9 µg/mL, conforme pode ser observado na Figura 7.

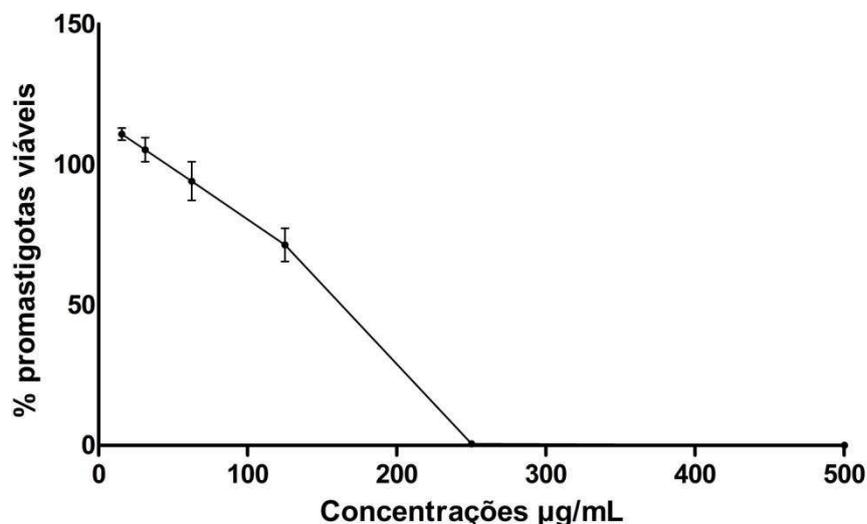


Figura 07 – Atividade leishmanicida do extrato bruto etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* nas concentrações de 0,97 a 500 µg/mL em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (10^6 /ml).

6.3 Citotoxicidade celular *in vitro*.

Os testes de citotoxicidade do extrato das folhas de *A. chica* em macrófagos de linhagem J774.G8, por meio do ensaio colorimétrico MTT, foram realizados durante 24 horas. A concentração de 189,9 µg/mL demonstrou toxicidade em 50% das células, correspondendo o CC_{50} . Os resultados podem ser observados na Figura 8.

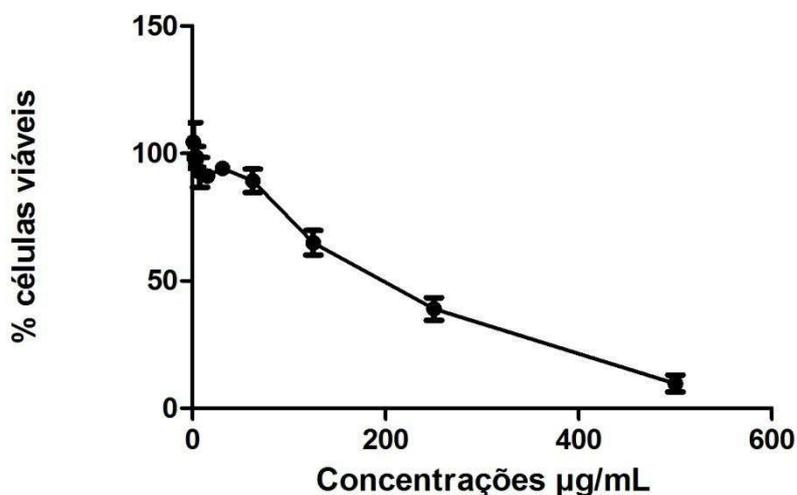


Figura 08 – Citotoxicidade em macrófagos J774.G8, demonstrando o percentual de células viáveis, cultivadas em meio RPMI, a 37°C e 5% CO₂ e tratadas com extrato bruto etanólico das folhas de *A. chica* nas concentrações de 0,97 a 500 µg/mL.

7. DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma das seis doenças tropicais de maior relevância mundial e ocupa o segundo lugar, depois da malária, entre as infecções por protozoários que acometem os seres humanos, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). As plantas oferecem fonte de moléculas que apresentam diferentes efeitos na homeostase dos seres vivos. Estas moléculas têm sido extensivamente reconhecidas como importantes fontes da maior parte dos componentes ativos em medicamentos terapêuticamente eficazes (CALDERON et al., 2009).

O estudo fitoquímico dos EEBs da *A. chica* demonstrou a presença de flavonoides, compostos fenólicos, taninos, antocianinas e chalconas. Os resultados confirmaram a presença, no extrato, de substâncias que já foram descritas na literatura (SCOGIN, 1980). A pesquisa dos constituintes químicos presentes na espécie em estudo podem apresentar várias variáveis, pois se trata de uma análise de triagem. Puhl et al. (2006) e Taffarello (2008) também identificaram taninos, além de antraquinonas, núcleo triterpênico e açúcares nos extratos etanólicos de *A. chica*.

O gênero *Arrabidaea* é fonte de antocianinas, flavonoides e taninos (PAULETTI et al., 2003). As antocianinas são pigmentos vegetais pertencentes à família dos flavonoides, também identificados como compostos fenólicos (TAIZ E ZEIGER, 2004). Os compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes naturais têm sido relatados como potenciais agentes terapêuticos contra uma ampla gama de doenças incluindo câncer, doenças inflamatórias e o envelhecimento (ALCERITO et al., 2002; MOYER et al., 2002; KONG et al., 2003; SRIVASTAVA et al., 2007). A atividade terapêutica dos compostos fenólicos é principalmente atribuída a sua capacidade antioxidante, a quelação de íons metálicos redox ativos, a modulação da expressão gênica e interação com as vias celulares de sinalização (SOBRATTEE et al., 2005).

A *A. chica* é utilizada na medicina tradicional brasileira como agente de cicatrização de feridas (JORGE et al., 2008), no tratamento da inflamação, cólica intestinal, disfunções sanguíneas, inflamação uterina e leucemia (ZORN et al., 2001; JORGE et al., 2008; BARBOSA et al., 2008). Um estudo farmacológico demonstrando sua atividade antineoplásica e antioxidante, *in vitro*, relacionou estes benefícios diretamente ao maior teor de flavonoides da planta, as antocianinas,

reforçado por biotécnicas, como o tratamento com xilanases (TAFFARELLO, 2008). Seus efeitos anti-inflamatórios foram demonstrados *in vivo* (OLIVEIRA et al., 2009) e *in vitro* (ZORN et al., 2001). Além disso, há relatos da capacidade antioxidante da planta relacionada à presença das antocianinas (JORGE et al., 2008). Ribeiro et al. (2010) e Ribeiro et al. (2012) avaliaram a atividade antineoplásica da *A. chica*, reforçando a relação com a presença de antocianinas, flavonoides ou da ação de ambos. Estes e outros benefícios tornou premente a pesquisa de novas fontes de antocianinas (ZAFRA-STONE et al., 2007), flavonoide abundante na espécie em estudo, o que justifica as diversas pesquisas sobre os metabólitos da *A. chica*.

Barbosa et al. (2008) isolaram dois flavonoides a partir do extrato etanólico de *A. chica* e, apesar de ser amplamente utilizada na medicina popular para cicatrização de feridas, pouco se sabe sobre as propriedades farmacológicas e toxicidade dos seus extratos (PASCUAL-TERESA E SANCHES-BALLESTA, 2008), ressaltando-se a necessidade de avaliações que garantam a segurança do uso das antocianinas.

Vários fatores devem ser levados em consideração quanto ao efeito tóxico de um extrato vegetal como, por exemplo, fatores sazonais, ambientais, variações genóticas da espécie, a parte da planta utilizada para produção do extrato, a época de coleta e a idade da planta. Os métodos tradicionais de extração também podem afetar o rendimento e a qualidade (composição química) do produto final a ser testado. As técnicas extrativas simples são vantajosas no aspecto de menor custo do que a escolha de biotécnicas mais avançadas (TAFFARELLO, 2008).

Apesar do extrato bruto das folhas de *A. chica* apresentar efeito leishmanicida numa concentração elevada e citotoxicidade em 50% das células na concentração de 189,9 µg/mL, os dados existentes na literatura são controversos. Estudos experimentais quanto a atividade antiinflamatória da *A. chica* não evidenciaram nenhum sinal clínico ou histopatológico de toxicidade do extrato na mucosa gástrica (CUNHA et al., 2000), na pleura (OLIVEIRA et al., 2004) ou em feridas abertas, feridas suturadas e queimaduras (OLIVEIRA et al., 1998). A baixa toxicidade do extrato aquoso da planta, sem nenhum sinal ou sintoma anormal, ou alterações histopatológicas também foram observados por Oliveira et al. (2009).

Na literatura observamos que os efeitos tóxicos são descritos principalmente em células, como demonstrou Azevedo et al. (2011) que a CC₅₀, em cultura de células Vero, foi superior a 500µg/mL, dose terapêutica constatada neste trabalho; e não há relatos que os extratos causem danos teciduais, como demonstrou Rodrigues et al. (2009), que avaliaram o efeito do extrato em úlceras, na concentração de 500 mg/kg, com inibição do índice de lesão ulcerativa de 76%.

O efeito do extrato bruto das folhas de *A. chica* sobre as formas promastigota de *L. amazonensis* identificou IC₅₀ na concentração de 155,9 µg/mL, sendo estabelecida a dose terapêutica em 500 µg/mL. OLIVEIRA et al. (2009) indicaram DL₅₀, em camundongos, de 2 g/kg via intraperitoneal e 6 g/kg via oral, doses muito superiores que as estabelecidas na triagem deste trabalho.

A ação antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* (ALVES, 2008) e antiviral contra vírus HSV-1 e HSV-2 (AZEVEDO et al., 2011) do extrato da *A. chica* foi constatada com sucesso na mesma concentração deste trabalho.

A terapêutica contra as leishmanioses já está estabelecida há 50 anos (CALDERON et al., 2009); as diamidinas, pentamidina e anfotericina B são utilizados como drogas de segunda escolha para no tratamento; no entanto, a utilização destas drogas é limitada devido à sua toxicidade ou a administração inadequada (CROFT, 2001).

Vários metabólitos vegetais isolados têm atividade biológica importante contra *Leishmania* SP. (ANDRADE-NETO et al., 2007; GUO et al., 2005; HOLETZ et al., 2002; CALDERON et al., 2009), como a *M. senegalensis* (DA SILVA et al., 2011) e a *Porophyllum ruderale* (OLIVEIRA et al., 2002); outras moléculas purificadas e extratos dos gêneros *Annona* (Annonaceae) (COSTA et al., 2006), *Cassia* (Fabaceae) (SARTORELII et al., 2007), *Copaifera* (Fabaceae) (SANTOS et al., 2012), *Croton* (Euphorbiaceae) (ROSYAL et al., 2003), *Cuatteria* (Annonaceae) (CORREA et al., 2006), *Jacaranda* (Bignoniaceae) (PASSERO et al., 2007)), *Piper* (Piperaceae) (NAKAMURA et al., 2006), *Stachytrapheta* (Verbenaceae) (MOREIRA et al., 2007), *Pourouma* (Moraceae) (TORRES-SANTOS et al., 2004), *Euphorbia* (Euphorbiaceae) e *Aloe* (Asphodelaceae) (MOHAMMAD, 2011), que também têm espécies amazônicas, possuem reconhecida atividade leishmanicida.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio de uma abordagem fitoquímica preliminar e farmacológica *in vitro* do EEB de *Arrabidaea chica* demonstram que:

- Os extratos brutos das folhas e do caule de *Arrabidaea chica* tem rendimento de 59,2% e 3,33%, respectivamente;
- A prospecção fitoquímica preliminar demonstra que os extratos possuem flavonoides, compostos fenólicos, taninos, antocianinas e chalconas;
- O extrato bruto das folhas da *Arrabidaea chica* possui atividade contra formas promastigota de *L. amazonensis*, com um IC₅₀ de 155,9 µg/mL;
- O extrato bruto das folhas de *Arrabidaea chica* apresenta citotoxicidade celular (CC₅₀ - 189,9 µg/mL) no teste *in vitro* em concentrações superiores a dose leishmanicida, não inviabilizando portanto, o seu uso terapêutico.

REFERÊNCIAS

AHERNE, S. A. E O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, v. 18, p. 75-81, 2002.

ALCERITO, T.; BARBO, F. E.; NEGRI, G.; SANTOS, D. Y. A. C.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C. T. T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical and Systematics Ecology*, v. 30, p. 677-683, 2002.

ALEXANDER, J. E BROMBACHER, F. T helper 1/T helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Frontiers in Immunology*, v. 3, 2012.

[ALMEIDA R. P.](#); [BARRAL-NETTO M.](#); [DE JESUS A. M. R.](#); [DE FREITAS L. A. R.](#); [CARVALHO E. M.](#); [BARRAL A.](#) Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. [The American journal of tropical medicine and hygiene](#) . v. 54, p. 178-184. 1996.

ALMEIDA-SOUZA, F. Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia* (noni). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

ALVAR, J. et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus co-infection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, p. 298-319, 1997.

ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. 2012.

ALVES, M. S. M. Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. E Bonpl.) B. Verl. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Pará, 2008.

AMARAL, R. R. et al. Biological Activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Leaves. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 31, p. 451- 455, 2012.

AMÓRA, S. S. A. Epidemiologia da Leishmaniose e Tripanossomíase Canina no Município de Mossoró, Rio Grande do Norte. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, 2004.

ANDRADE-NETO, V.F. et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 359-365, 2007.

ARENDSE, B. et al. IL-9 is a susceptibility factor in *Leishmania major* infection by promoting detrimental Th 2/type 2 responses. *Journal of Immunology*, v. 174, p. 2205–2211, 2005.

AZEVEDO, M. M. B. et al. Atividade anti-Herpes simplex dos extratos alcoólico, hexânico e hidroalcoólico de *Arrabidaea chica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Foz do Iguaçu, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011.

BAIN, B. J. Bone marrow aspiration. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 54, 2001.

BADARÓ, R. E DUARTE, M. I. S. Leishmaniose Visceral (Calazar). *J. Bras. Med.*, v. 97, p. 1234-1255, 1986.

BARBOSA, W. L. R. E QUIGNARD, E. Projeto integrado - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Relatório final de atividades. Belém-PA. 1998.

BARBOSA, W. L. R. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. *Revista Científica da UFPA*. Belém-Pa. 2001. Disponível em <http://www.ufpa.br/rcientifica>. vol. 4, 2004.

BARBOSA, W. L. R. et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 544-548, 2008.

BASSELIN, M. et al. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigote. *Biochemical Journal*, v. 315, p. 631-634, 1996.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, v. 37: p. 1097:1106, 2007.

BERN, C. et al. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. v. 2, 2008.

BORRÁS, M. R. L. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas?: plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa. Manaus: Valer / Governo do Estado do Amazonas, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

BRUMMIT, C. F.; PORTER, J.H.; HERWALDT, B.L. Reversible peripheral neuropathy associated with sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 878-9, 1996.

CALDERON, L.D.A., et al. 2009. Amazonian biodiversity: a view of drug development for Leishmaniasis and malaria. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 20, p. 1011-1023, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARTÁGENES, M. S. S. Investigação dos efeitos tóxicos e anti-hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae) / Maria do Socorro de Sousa Cartágenes. -- João Pessoa: UFPB, 2009.

CASTRO, C. et al. Severe arthralgia, not related to dose, associated with pentavalent antimonial therapy for mucosal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.84, p. 362, 1990.

CATORZE, Goreti Baião Maria. Leishmaniose e SIDA. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.* 2005;33(6):237-250

CHAGAS, A. P. et al. Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador de extratos de *Capsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, p. 117-124, 2010.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R. The colouring matters of carajura. *Journal of the Chemical Society*, v. 2, p. 3015-3041, 1927.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010..

CHEVALIER B. et al. Report of the first cases of cutaneous leishmaniasis in East Timor. *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, p. 840, 2000.

CHOI, C. E LERNER, E. Leishmaniasis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, v. 6, p. 175–182, 2001.

CORRÊA, P. M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

CORREA, J. E. et al. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. *Planta Medica.*, v. 72, p. 270 -272, 2006.

CORRÊA, M. P. "Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas", Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, v. 2. 1984.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Guibenkian. v. 3. p. 1032. 1982.

COSTA P. R. C. et al Caracterización Farmacognóstica del Crajiru - *Arrabidaea chica* Verlot. Bignoniaceae. In: X CONGRESO ITALO LATINOAMERICANO DE ETNOMEDICINA, 10., Caracas, 2001. Memórias del X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina. Anais... Caracas: Sociedad Italo Latinoamericana de Etnomedicina – SILAE, v.10. p. 217-220. 2001.

COSTA, E.V. et al. A pyrimidine-Bcarboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 292-294, 2006.

COSTA-FILHO, A. V. et al. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, p. 424-427, 2008.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis, *Tropical Medicine and International Health*, v. 6, p. 899-905, 2001.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia: Univ. Press, 1981.

CRUZ, I. et al. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 123, p. 357-388, 2006.

CUNHA I. G. B. et al Effects of *Arrabidaea chica* Verl. (Bignoniaceae) aqueous extract on experimental gastric ulceration. In: LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 16., 2000, Aguas de Lindoia, SP. From new molecules to new methods for health and knowledge in the beginning of a new millennium. Anais... 2000

DA SILVA, G. et al. *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis*, two traditional herbal medicines. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, v. 2, p. 59-65, 2011.

DELORENZI, J. C. et al. Antileishmanial activity of indol alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 1349-1354, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004.

DEVIA, B., LLABRES, G., WOUTERS, J., WOUTERS, J., DUPONT, L., ESCRIBANO-BAILON, M. T., ANGENOT, L., TIST, M. New 3-Deoxyanthocyanidins from Leaves of *Arrabidaea chica*. *Phytochem Analysis*. 2002.

ESTRELA, E. Tratado de Cooperacion Amazonica – Secretaria Protempore, Plantas medicinales Amazonicas: Realidad Y Perspectivas, Lima: TCA, p. 302. 1995.

FARMACOPÉIA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

FAUST, E. C. et al. Parasitologia clínica. 8ª edição. ed. Barcelona: Salvat; p. 888. 1974.

FERREIRA, M. E. et al. 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.

FERREIRA, M. E. et al. Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. Phytomedicine, v. 17, p. 375-378, 2010.

FISCHER, C. et al. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. Medical Microbiology and Immunology, v. 190, p. 85-87, 2001.

FOURNET, A. et al. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. Journal of Ethnopharmacology, v. 37, p. 159-164, 1992.

FRÉZARD, F. DEMICHELI, C. RIBEIRO, R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*. 2009.

FUNASA/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica: Leishmaniose visceral. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/internet/desai/programasAcoesSaudeVigilanciaAmbiental.asp>>. Acessado em 30/06/2012.

GELANEW, T., K. KUHLS, et al. "Inference of population structure of *Leishmania donovani* strains isolated from different Ethiopian visceral leishmaniasis endemic areas." PLoS Negl Trop Dis. 2010.

GENTRY, A. H. A synopsis of *Bignoniaceae* ethnobotany and economic botany. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 79 p. 53-64, 1992.

GESSNER, A. et al. Differential regulation of IL-9 expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. Immunobiology, v. 189, p. 419–435, 1993.

GOMES, R. E OLIVEIRA, F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. Frontiers in Immunology, v. 03, 2012.

GONÇALVES DA COSTA, S. C. et al. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistant to infection by *Trypanosoma cruzi* in mice. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 76, p. 367-381, 1981.

GONTIJO, C. M. F. E MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, p. 338-349, 2004.

GOTO, H. E LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 8, p. 419-433, 2010.

GRENARD, P. et al. *Pharmacopees traditionnelles em Guyana.* – Paris: L'orstom, 1987. p.457. GRENARD, P. E MORETTI, C. *Pharmacopée traditionnelle en Guyane*, Orstom, Paris, France, p. 95-96, 1987.

GREVELINK, S. A. E LERNER, E. Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 34, p. 257-272, 1996.

GRIMALDI, J. R. G. et al. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 41, p. 687-725, 1989.

GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 53, p. 629–55, 1999.

GUO, Z. et al. Biologically activity Quassinoids and their chemistry potential lead for drug design. *Current Medical Chemistry*, v. 12, p. 173-190, 2005.

HARBORNE, J. B. WILLIAMS, C. A.. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, 1998.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 169, p. 59–72. 1989

HEPBURN, N. C.; SIDDIQUE, I.; HOWIE, A. F.; BECKETT, G. J.; HAYES, P. C. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. *Lancet.*, v. 342, p. 238-9, 1993.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p.1027-1031, 2002.

ISHIKAWA, E. A et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, p. 111-121, 2002.

JEDDY, F. et al. Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. *Journal of Tropical Medicine*, 2011.

JORGE, M. P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 118, p. 361-366, 2008.

KALIL FILHO, A. N. et al. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Comunicado Técnico. EMBRAPA, v. 50, p. 1-4, 2000.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends in Parasitology, v.22, p. 439-445, 2006.

KASSI, M. et al. Marring leishmaniasis: the stigmatization and the impact of cutaneous leishmaniasis in Pakistan and Afghanistan. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 2, 2008.

KONG, J. M.; KHANG, N. K.; CHIA L. S.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. Acta Pharmacology Singapore, v. 24, n.1, p. 7-21, 2003.

KONGKAEW, W., SIRIARAYAPORN, P., LEELAYOOVA, S., SUPPARATPINYO, K., AREECHOKCHAI, D., DUANG-NGERN, P., et al. Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007.

KVIST, L. P. et al. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. Journal of Ethnopharmacology, v. 106, p. 390–402, 2006.

LABMET - Laboratório de Meteorologia da Universidade Estadual do Maranhão. Disponível em <http://www.nemrh.uema.br/>. Acesso em: 02 de agosto de 2012.

LACHAUD, L. et al. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. Journal of Clinical Microbiology, v. 39, p. 613-617, 2001.

LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, 1987.

LAURENTI, M. D. Patologia e patogenia das leishmanioses. Tese (Livre docência), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

LENTZ, D. L. Medicinal and other economic plants of the Paya of Honduras. Economic Botany. v. 47. p. 358-370, 1993.

LEONARD, R. et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial of 6% Miltefosine Solution, a Topical Chemotherapy in Cutaneous Metastases From Breast Cancer. Journal of Clinical Oncology, v. 19, p. 4150-4159, 2001.

LIMA, A. C. S. Diagnóstico molecular de Leishmaniose Tegumentar Americana: identificação de espécies de *Leishmania* por SSUrDNA PCR e G6PD PCR. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2010.

LIMA, E. B. et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 82, p. 111-124, 2007.

LOHMANN, L. G.; HOPKINS, M. J. G. Bignoniaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Org.). Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID, p. 608. 1999.

LOHMANN, L. G.; ULLOA, C. Bignoniaceae. Plants Prototype Checklist. 2008. Disponível em: <www.iplants.org>. Acesso em: 28 mai. 2012.

LORENZI, H. E. MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum de Estudos de Flora: São Paulo, Brasil. 2002.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 41, p. 85-94, 2005.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose Visceral (Calazar). Jornal Brasileiro de Medicina, v.41, p.69-70, 1981.

MARZOCHI, M. C. A. E MARZOCHI, K. B. F. História epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Brasil. III Congresso Brasileiro de Epidemiologia 1: 43. Resumos. Salvador, Bahia. 1995.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B., CIMERMAN, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu, 1999.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**, EUFC, Fortaleza, Brazil. 1997.

MENDES, J. M. Efeito leishmanicida de extratos naturais de *Magonia pubescens* e *Glycyrrhiza glabra* no desenvolvimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Dissertação. Universidade Federal de Goiás. 2006

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da coinfeção Leishmania-HIV. Brasília-DF, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2007.

MISHRA, B. B. et al. Alkoloids: Future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia, v. 80, p. 81-90, 2009.

MOHAMMAD, B. A. Antileishmanial effects of traditional herbal extracts against cutaneous leishmaniosis *in vivo*. *Advances in Environmental Biology*, v. 5, p. 3188-3195, 2011.

MOREIRA, R. C. R. et al. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 59-63, 2007.

MORENO, J. et al. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, 2012. e1683. doi:10.1371/journal.pntd.0001683.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348–2357, 1986.

MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B., WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus and ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 519-525, 2002.

NAKAMURA, C. V. et al. Antileishmanial activity of hydroalcoholic extract and fractions obtain leaves of *Piper regnellii* (Mig.). *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16, p. 61-66, 2006.

NASHED, B. F. et al. Different cytokines are required for induction and maintenance of the Th 2 type response in DBA/2 mice resistant to infection with *Leishmania major*. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1435–1443, 2000.

NICO, D. Análise da estrutura-função das saponinas purificadas QS21 de *Quillaja saponaria* Molina e CP05 de *Calliandra pulcherrima* Benth e dos seus potenciais adjuvantes na vacina FML contra a leishmaniose visceral murina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

NOWAK, E. C. E NOELLE, R. J. Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine. *Immunology*, v. 131, p. 169–173, 2010.

OLIVEIRA, A. B.; TAKAHASHI, J. A.; LOMBARDI, J. A.; JACOME, R. L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; CHIARI, E. *VIII Simpósio Latino-americano de Farmacobotânica*. 1996.

OLIVEIRA, F., AKISUE, K., AKISUE, M. K. 1998. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu.

OLIVEIRA, A. P. et al. Efeito do extrato de *Porophyllum ruderale* (Jack.) Cass. sobre a viabilidade de formas promastigotas, amastigotas intracelulares e amastigotas de

cultura axênica de *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Anais do XI Encontro Anual de Iniciação Científica, Maringá, 2002.

OLIVEIRA, G. G. G.; FERRAZ, H. G.; MATOS, J. D. R. Estudo termoanalítico de glibenclamida e alguns excipientes utilizados em formas farmacêuticas sólidas. In: 2º Congresso Panamericano de Análise térmica e Calorimetria. Poços de Caldas, 2004.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. E Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, p. 643-649, 2009.

OMS. Catalogación por la Biblioteca de la OMS. Estadísticas sanitarias mundiales. 2011.

OUELLETTE, M. et al. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resistance Updates, v. 07, p. 257–266, 2004.

PAES, E. R. C. et al. Formulação de um gel de *Arrabidaea chica* (Humb. E Bonpl.) Verl e sua ação em feridas provocadas na pele de ratos Wistar. Jornal Brasileiro de Fitoterapia, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 67-73, 2005.

PAIVA, B. R.; SECUNDINO, N. F. C.; NASCIMENTO, J. C.; PIMENTA, P. F. P.; GALATI, E. A. B.; ANDRADE JR, H. F.; MALAFRONTA, R. S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Tropica, v. 99, p. 252–259, 2006

PARIS, C. et al. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, p. 852-859, 2004.

PASCUAL-TERESA, S.; SANCHES-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry**, v. 7, p. 281-299, 2008.

PASSERO, L. et al. Anti-*leishmania* activity of semi-purified of *jacaranda puberula*. Parasitology Research, v. 101, p. 677-680, 2007.

PATZ, J. A.; GRACZYK, T. K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol.* v. 1. p. 1-11. 2000.

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

PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; BOLZANI, V. S. New antioxidant CGlucosylxanthones from stems of *Arrabidaea samydoides*. Journal of Natural Products, v. 66, p. 1384-1387, 2003.

PELISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, p. 107-110, 2011.

PETERSON, R. A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicology Pathology*, v. 40, p. 186 – 204, 2012.

PIMENTEL, M. I. F. et al. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 254-256, 2011.

PUHL, M. C. M. N. et al. Contribuição ao estudo farmacognóstico do cajurú: *Arrabidaea chica* (HEB) Verlot. (Bignoniaceae). Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC, Florianópolis, SC - Julho/2006.

RAMÍREZ-MACÍAS, I. et al. Leishmanicidal activity of nine novel flavonoids from *Delphinium staphisagria*. *The Scientific World Journal*. 2012.

RAHMATULLAH, M. et al. An ethnomedicinal, pharmacological and phytochemical review of some Bignoniaceae family plants and a description of Bignoniaceae plants in folk medicinal uses in Bangladesh. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2010.

REED, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 14: 471-478. 1996.

RÊGO, T. J. A. Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão. 2. ed. São Luís: EDUFMA, 1995.

RIBEIRO, A. F. C. et al. Antileukemic potential of crude extracts of *Arrabidaea chica*. XII International Congress of Toxicology. Barcelona, Spain, 2010.

RIBEIRO, A. F. C. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(2): 364-373, Mar./Apr. 2012

RODRIGUES, R. A. F. et al. Pharmacological activity from *Arrabidaea chica* Verlot bioencapsulated with arabic gum. XVIIth International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherlands; 2009.

RODRIGUES, I. A. et al. Efeito citocida dos extratos de *Arrabidaea chica* em *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011.

ROSYAL, A. C., et al. Emergence of zoonotic canine Leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 50, p. 691-693, 2003.

SAF'JANOVA, V. M. 1982. Classification the genus *Leishmania* Ross, 1903. In: The Leishmaniasis. Protozoology, part 7. Academy of Sciences. USSR. All Union Society of protozoologists: Leningrad. Chapter: 11, p 95-100.

SALVADOR, M. J. et al. A. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine*, v. 9, p. 566-571, 2002.

SAMPAIO, A. L. F. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* Verl. (Bignoniaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu, 1998. Resumos....Caxambu: FESBE, 1998.

SANTOS, A. O. et al. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 193-198. 2000.

SARTORELLI, P. et al. Isolation of anthileishmanial sterol from the fruits of *Cassia fistula* using bioguided fraction. *Phytotherapy Research* v. 21, p. 644-647, 2007.

SCARAMUZZO, M. Laboratórios reforçam apostas no segmento fitoterápico. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em <<http://boletim.sbq.org.br/noticias/n400.php>>. Acessado em 30/06/2012.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, v. 9. p. 255-257, 1993.

SCOGIN, R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochemical and Systematics Ecology*, v. 8, p. 273-276, 1980.

SEHGAL, R. et al. Immunology of Leishmaniasis and Future Prospective of Vaccines, *Recent Advances in Immunology to Target Cancer, Inflammation and Infections*. (Ed.). 2012.

SHARMA, U. E SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 47, p. 412-423, 2009.

SHIMOMURA, J. Z. et al. Leishmaniose visceral canina: uma doença em expansão no Brasil. *Ciências Agrárias e da Saúde*, v.6, p.53-59, 2006.

SOARES-BEZERRA, R. J. et al. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármaco. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 139-149, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and sorology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 560-563, 2001.

SOBRATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUSA-GOMES M. L. et al.. Coinfecção Leishmania/HIV no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 20, p. 519-526, 2011.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C. C.; FISCHER, J.; KREWER, G. Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia - grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 3180-3185, 2007.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 07, p. 4267-4277, 2010.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B treatment for Indian visceral Leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, 377-383, 2004.

TAFFARELLO, D. Extratos de *Arrabidaea chica* (Humb. E Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica. 2008. 191 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004.

TAKEMURA, O. S.; IINUMA, M.; TOSA, H.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, E. A.; NOZAWA, Y. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *Cuprea*. *Phytochemistry*, v. 38, p. 1299-1300, 1995.

THAKUR, C. P. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-II clinical study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, p. 432-433, 2000.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, v. 11, p. 114-120, 2004.

TUROLLA, M. S. R. E NASCIMENTO, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, p. 289-306, 2006.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, p. 351-356, 2010.

VERMA, K. E DEY, C. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 48, p. 3010-3015, 2004.

VON POSER, G. L. et al. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemistry Systems Ecology*, v. 28, p. 351-366, 2000.

WEBSTER, P. E RUSSEL, D. G.; The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol. Today*, v. 9, p. 201-206, 1993.

WEIGLE, K. A. et al. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, [S.l.], v. 44, p. 260-271, 1991.

WEISS, J. B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, p. 113-130, 1995.

WHO. The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/em/>>. Acesso em: 23 de junho de 2012.

ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition E Food Research*, v. 51, n. 6, p. 675-683, 2007.

ZORN, B. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 831-835, 2001.