

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DO
EXTRATO BRUTO DO FRUTO DE *Morinda citrifolia* (noni)**

FERNANDO ALMEIDA DE SOUZA

São Luís – MA

2011

FERNANDO ALMEIDA DE SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DO
EXTRATO BRUTO DO FRUTO DE *Morinda citrifolia* (noni)**

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

Orientadores: Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva

Profa. Dra. Kátia da Silva Calabrese

São Luís – MA

2011

Souza, Fernando Almeida de.

Estudo fitoquímico e análise leishmanicida in vitro do extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia* (Noni) / Fernando Almeida de Souza.– São Luís, 2011.

94 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2011.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

1.Cromatografia líquida de alta eficiência. 2.Microscopia eletrônica. 3.*Leishmania amazonensis*. I.Título

CDU: 581.6

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 15 de abril de 2011 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Márcio Galdino dos Santos
Universidade Federal de Tocantins

Dra. Celeste da Silva Freitas de Souza
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

Dra. Kátia da Silva Calabrese
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ
Orientadora

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão
Orientadora

À minha família,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha família, suporte em todos os momentos.

Aos “primos” e “tios”, em especial Roseane, Rochana, Claudiana, Cássia, Hugo, Nizete, Pedro e Binoca, pelos momentos de renovação espiritual.

Aos professores e alunos do Mestrado em Ciência Animal, em especial Júlia e Joyce.

À todos do Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, Lucilene, Karina, Glauciomar, Flávia, pelos momentos de trabalho e descontração

Ao pessoal do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do IOC-FIOCRUZ/RJ, Luiz Otávio, Luiz d’Escoffier, Tânia, Dr. Silvio, Luciana, Flávia, Carol, Daiana, Mariana, Bruno, Suzane, Anderson e Karine, pela acolhida e auxílio na realização dos experimentos.

À Ana Cláudia e Aline, de Farmanguinhos, pelo auxílio na realização das análises cromatográficas.

À Kátia e Celeste, pela confiança na minha capacidade, por terem sido fundamentais na minha transformação e crescimento profissional e pessoal durante este último ano.

A professora Ana Lúcia, pela oportunidade, pelo aprendizado, pelo seu caráter, pela maneira como conduziu a orientação, por seu exemplo de professora e pesquisadora.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPEMA, pelo financiamento para realização deste projeto.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
a.C.	antes de cristo
ATP	trifosfato de adenosina
CC ₅₀	concentração citotóxica 50%
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
cm	centímetro
DAD	detector de arranjos de diodo
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
PGE ₂	prostaglandina 2
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
Sb ^{III}	antimonial trivalente
Sb ^V	antimonial pentavalente

SRB	sulforhodamina B
TNF- α	fator de necrose tumoral beta
TNJ	TAHITIAN NONI [®] Juice
t_r	tempo de retenção
U	unidade
US\$	dólar
UV	ultravioleta
WHO	World Health Organization/Organização Mundial de Saúde

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Página
Figura 1 – Frutos de <i>Morinda citrifolia</i> em diferentes estágios de maturação.	31
Figura 2 – Localização geográfica da ilha de São Luís.	40
Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do extrato bruto liofilizado do fruto de <i>Morinda citrifolia</i> .	49
Figura 3 – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de <i>M. citrifolia</i> dissolvido em água (5 mg.mL ⁻¹) obtido por CLAE-DAD monitorado no comprimento de onda de 240 nm.	50
Figura 4 – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de <i>M. citrifolia</i> dissolvido em água (5 mg.mL ⁻¹) obtido por CLAE-DAD monitorado no comprimento de onda de 360 nm.	51
Figura 5 – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de <i>M. citrifolia</i> dissolvido em água (5 mg.mL ⁻¹) obtido por CLAE-ELSD.	51
Figura 6 – Espectros no UV relativos aos picos obtidos no cromatograma do extrato do fruto de <i>M. citrifolia</i> , λ : 240nm.	52
Figura 7 – Espectros no UV relativos aos picos obtidos nos cromatogramas do extrato do fruto de <i>M. citrifolia</i> . (A-C) comprimento de onda 240 nm. (D-E) comprimento de onda 360 nm.	53
Figura 8 – Gráfico da inibição de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivadas em meio Schneider, a 26°C, e tratadas com extrato bruto do fruto de <i>M. citrifolia</i> nas concentrações de 1,75 a 240 μ g/mL.	54
Figura 9 – Gráfico da inibição de formas amastigotas axenico de <i>L. amazonensis</i> cultivadas em meio Schneider's Insect modificado, a 32°C, e tratadas com extrato do fruto de <i>M. citrifolia</i> nas concentrações de 1,75 a 240 μ g/mL.	55

Tabela 2 –	Concentração inibitória de 50% do extrato bruto do fruto de <i>M. citrifolia</i> , Glucantime [®] e Anfotericina B em formas promastigota e amastigota axenico de <i>L. amazonensis</i> após 72 horas de tratamento.	56
Figura 10 –	Gráfico do efeito do extrato bruto do fruto de <i>M. citrifolia</i> em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> internalizadas em macrófagos de linhagem J774.G8.	57
Figura 11 –	Efeito do extrato bruto do fruto de <i>M. citrifolia</i> na ultraestrutura de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivadas em meio Schneider e incubadas durante 24 horas a 26°C em diferentes concentrações do extrato; (A) promastigota do grupo controle com corpo alongado característico e morfologia normal; (B-D) promastigotas tratadas com extrato do fruto de <i>M. citrifolia</i> nas concentrações 15 µg/mL (B), 30 µg/mL (C) e 60 µg/mL (D).	59
Figura 12 –	Efeito do extrato bruto do fruto de <i>M. citrifolia</i> na ultraestrutura de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivadas em meio Schneider e incubadas durante 24 horas a 26°C em diferentes concentrações do extrato; (A-B) promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com extrato de <i>M. citrifolia</i> na concentração de 60 µg/mL.	60
Figura 13 –	Efeito do extrato bruto do fruto de <i>M. citrifolia</i> na ultraestrutura de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivadas em meio Schneider e incubadas durante 24 horas a 26°C em diferentes concentrações do extrato; (A-D) promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com extrato de <i>M. citrifolia</i> na concentração de 120 µg/mL.	61

ALMEIDA-SOUZA, F. **Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia* (noni)**. [Phytochemical screening and *in vitro* leishmanial activity of crude extract of *Morinda citrifolia*.fruit (noni)]. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

RESUMO

As atuais formas de tratamento da leishmaniose induzem a fortes efeitos colaterais. Vários casos de resistência às drogas utilizadas para o tratamento também já foram registrados. Na busca por novas alternativas de tratamento, a descoberta de propriedades terapêuticas de secundários ativos presentes em extratos vegetais tem despertado o interesse da investigação de novas opções de tratamento da leishmaniose com plantas medicinais. A *Morinda citrifolia*, popularmente conhecida como noni, destaca-se por apresentar diversas substâncias ativas que possuem ação antimicrobiana, antiviral e fungicida, e potencial atividade contra protozoários como os do gênero *Leishmania*. Neste trabalho realizamos o estudo fitoquímico e avaliamos a ação leishmanicida e citotoxicidade *in vitro* do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*. O extrato bruto apresentou rendimento de 6,31%. A prospecção fitoquímica demonstrou a presença de antraquinonas, flavonóides, alcalóides, triterpenóides, esteróides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos, antocianidinas e chalconas. A cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodo e de espalhamento de luz identificou como constituintes majoritários substâncias aromáticas e fenólicas. O extrato demonstrou atividade dose-dependente, e IC₅₀ de 204,1 µg/mL para promastigota, 137,0 µg/mL para amastigota axenico, e 63,6 µg/mL contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Formas promastigotas tratadas por 24 horas com concentrações do extrato entre 15 e 120 µg/mL e observadas em microscopia eletrônica de transmissão apresentaram vacuolização citoplasmática, inclusão lipídica e aumento da atividade exocítica. O ensaio de citotoxicidade mostrou que a ação do extrato é mais específica para o protozoário, e não citotóxica para a célula. O extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* é ativo contra *L. amazonensis* em modelo *in vitro* e promissor para novas pesquisas de opções terapêuticas para leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, estudo fitoquímico, citotoxicidade, microscopia eletrônica.

ALMEIDA-SOUZA, F. **Phytochemical screening and *in vitro* leishmanial activity of crude extract of *Morinda citrifolia* fruit (noni)**. [Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia* (noni)]. 2011. 97p. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

ABSTRACT

The current forms of treatment of leishmaniasis induce strong side effects and several cases of resistance to the drugs used for treatment have been reported. In the search for new alternatives of treatment, the discovery of therapeutic properties of active substances present in plant extracts have attracted the interest of research into new treatment options for leishmaniasis using medicinal plants. *Morinda citrifolia*, commonly known as noni, stands out since it has several active substances that have antimicrobial, antiviral and antifungal and potential activity against protozoa such as the members of *Leishmania* genus. We carried out the phytochemical study and evaluated the antileishmanial activity and *in vitro* cytotoxicity of crude extract of *M. citrifolia* fruit. The crude extract showed a yield of 6.31%. The phytochemical screening showed the presence of anthraquinones, flavonoids, alkaloids, terpenoids, steroids, saponins, coumarins, phenolic compounds, tannins, anthocyanidins and chalcones. The high performance liquid chromatography with diode array detector and light scattering identified phenolics and aromatics compounds as its major constituents. The extract showed a dose-dependent activity, and IC₅₀ of 204.1 µg/ml for promastigotes, 137.0 µmg/mL to axenic amastigotes, and 63.6 µg /mL against intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Promastigotes forms treated for 24 hours with extract concentrations of 15 to 120 µg/mL and observed in transmission electron microscopy presented cytoplasmatic vacuolization, lipid inclusion and increased activity exocyted. The cytotoxicity assay showed that the activity of the extract is more specific for the protozoan and was not cytotoxic to the cell. The crude extract of *M. citrifolia* fruit is active against *L. amazonensis* in the *in vitro* model, and promising for further researches of new treatments for leishmaniasis.

Key words: *Leishmania amazonensis*, phytochemical screening, cytotoxicity assay, electron microscopy.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Leishmaniose e <i>Leishmania</i>.....	17
2.2 Ciclo biológico.....	19
2.3 Patogenia e clínica.....	21
2.4 Tratamento.....	23
2.4.1 Antimoniais pentavalentes.....	23
2.4.2 Anfotericina B.....	25
2.4.3 Pentamidina.....	26
2.4.4 Miltefosina.....	27
2.4.5 Paramomicina.....	27
2.4.6 Outros tratamentos.....	28
2.5 Fitoterápicos e leishmaniose.....	28
2.6 <i>Morinda citrifolia</i>.....	30
2.6.1 A planta.....	30
2.6.2 Principais constituintes químicos.....	32
2.6.3 Farmacocinética e toxicidade.....	33
2.6.4 Legislação.....	34
2.6.5 Propriedades fitoterápicas.....	35
3 JUSTIFICATIVA.....	38
4 OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivo geral.....	39
4.1 Objetivos específicos.....	39
5 MATERIAIS E MÉTODO.....	40
5.1 Material vegetal.....	40
5.1.1 Área de Coleta.....	40
5.1.2 Preparo do extrato de <i>M. citrifolia</i>.....	41
5.2 Análise fitoquímica.....	41
5.2.1 Preparo das amostras para análise dos metabólitos especiais.....	41
5.2.2 Antraquinonas.....	41
5.2.3 Flavonóides.....	42
5.2.4 Alcalóides.....	42

5.2.5	Triterpenóides e esteróides.....	42
5.2.6	Saponinas.....	42
5.2.7	Cumarinas.....	42
5.2.8	Compostos fenólicos.....	43
5.2.9	Taninos.....	43
5.2.10	Antocianidinas e chalconas.....	43
5.3	Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos e evaporativo de espalhamento de luz (CLAE-DAD-ELSD)	43
5.4	Cultura de Parasito.....	44
5.5	Cultivo celular.....	44
5.6	Atividade do extrato de <i>M. citrifolia</i> contra formas promastigotas.....	44
5.7	Atividade do extrato de <i>M. citrifolia</i> contra formas amastigotas.....	45
5.8	Atividade contra formas amastigotas intracelulares em macrófagos.....	45
5.9	Ensaio de citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	46
5.10	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
5.11	Análise estatística.....	47
6	RESULTADOS.....	48
6.1	Obtenção do extrato bruto liofilizado do fruto e prospecção fitoquímica.....	48
6.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD-ELSD)	50
6.3	Atividade do extrato de <i>M. citrifolia</i> contra promastigota, amastigota axênico e amastigota intracelular.....	54
6.4	Citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	57
6.5	Microscopia eletrônica de transmissão.....	58
7	DISCUSSÃO.....	62
8	CONCLUSÕES.....	70
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
	REFERÊNCIAS	
	APÊNDICES	
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. São zoonoses de grande importância na saúde pública e de acordo com a Organização Mundial da Saúde, encontram-se entre as seis maiores endemias consideradas prioritárias no mundo. É predominante em 98 países e em 3 territórios nos 5 continentes, com cerca de 1,3 milhões de novos casos notificados por ano. Mesmo possuindo estatísticas alarmantes, apenas trinta países fazem a notificação compulsória dos casos. No Brasil, a distribuição geográfica da leishmaniose é ampla, com registros da doença em todo o território nacional, especialmente na região nordeste, com os maiores focos endêmicos nos estados do Ceará e Maranhão (BRASIL, 2007, ALVAR et al., 2012).

O tratamento das leishmanioses é feito principalmente, à base de antimoniais pentavalentes (SbV), anfotericina B e pentamidinas, com período de administração prolongado, via parenteral e de alto custo, o que às vezes requer hospitalização, provocando desconforto ao paciente. Está associado a efeitos adversos, como: artralgias, mialgias, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, anorexia, náusea, vômito (HEPBURN et al., 1993; BRUMMIT et al., 1996).

As reações adversas e o crescente número de relatos de resistência ao tratamento atual contra leishmaniose apontam para a necessidade da pesquisa de novas opções de tratamento, mais eficientes e menos tóxicas. Diversas pesquisas têm sido realizadas com novas alternativas de esquemas terapêuticos para os antimoniais, utilizando doses menores e esquemas posológicos alternativos, na tentativa de minimizar os efeitos colaterais (OLIVEIRA-NETO & MATTOS, 2006). A Organização Mundial de Saúde, em virtude do aumento do número de co-infecção de leishmaniose e AIDS, tem dado incentivos a pesquisas com drogas alternativas, já que os

imunodeprimidos não respondem bem ao tratamento convencional (WHO, 2002).

As vantagens de uma nova droga contra leishmaniose devem incluir baixa toxicidade, alta eficácia e preço acessível. Nesse contexto, as formulações provenientes de extratos fitoterápicos têm ganhado bastante evidência. Desde a década de 90 vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar e caracterizar extratos de plantas medicinais com atividade leishmanicida (BRAGA et al., 2007; ESTEVEZ et al., 2007; COSTA-SILVA et al., 2015; COLARES et al., 2013). Compostos como metoxichalconas (TORRES-SANTOS et al., 1999), alcaloides indólicos, cumarinas (FERREIRA et al., 2010) e bioflavonoides (MAI et al., 2015) já foram isolados de diversos extratos vegetais e vem demonstrando elevada atividade leishmanicida, o que revela o grande potencial que as plantas detêm e a viabilidade de estudos com essa finalidade.

A *Morinda citrifolia* é uma planta de pequeno porte originária da Polinésia, popularmente conhecida como Noni, e uma das mais significantes fontes da medicina tradicional nessas comunidades. Estudos comprovam a eficácia do Noni no tratamento da dor e dos processos inflamatórios (BASAR et al., 2010). Dela têm sido isoladas várias substâncias, tais como antraquinonas, bioflavonoides, terpenos, xeronina, escopoletina e damnacantal. Esta última substância é inibidora de células K-ras-NRK, que são células precursoras de tumores (LEVAND & LARSON, 1979; HIRAMATSU et al, 1993).

Diversos estudos têm demonstrado que a *M. citrifolia* possui atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* (KANDASWAMY, et al., 2010), assim como para outras diversas bactérias, devido a componentes como compostos fenólicos, incluindo acubina, L-asperulosida, alizarina, escopoletina e outras antraquinonas (CHAN-BLANCO et al, 2006). Resultados de atividade contra fungos (BARANI et al., 2014) também já foram observados. A avaliação

do extrato de *M. citrifolia* contra *Candida albicans* demonstrou um excelente potencial contra este fungo (JAINCKITTIVONG et al, 2009).

Baseado nos constituintes químicos da *M. citrifolia*, que indicam um potencial efeito anti-*Leishmania*, este trabalho realizou a análise fitoquímica, avaliou a atividade leishmanicida e as alterações ultraestruturais provocadas pelo extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* em *Leishmania amazonensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose e *Leishmania*

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico que atingem várias regiões do mundo. Historicamente, os primeiros relatos remontam à Grécia, onde a leishmaniose visceral era denominada de *ponos* ou *haplopinakon*. O termo *kalaazar* (pele negra), ou *Kala-jwar* (febre negra), são denominações de origem hindu para a leishmaniose visceral, criadas em 1869, devido ao aumento da pigmentação da pele durante o curso desta enfermidade (Marzochi et al., 1981).

O protozoário do gênero *Leishmania*, agente etiológico das leishmanioses, foi descrito pela primeira vez em 1903, na Índia, por William Leishman, durante a necropsia de um soldado. No mesmo ano, em um estudo independente Charles Donovan descreveu o mesmo parasito em fígado de pacientes com suspeita de malária crônica. Em 1904, Bruce, Laveran e Mesnil identificaram o parasito como o agente causador da febre indiana e o denominaram de *Piroplasma donovani*. 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 & Duarte, 1986).

Atualmente, a posição sistemática do gênero, segundo a classificação taxonômica, é: Reino Protista, Haeckel, 1866; Sub-reino *Protozoa*, Goldfuss, 1817; Filo *Sarcomastigophora*, Honiberg & Balamuth, 1963; Subfilo *Mastigophora*, Diesing, 1866; Classe *Zoomastigophorea*, Calkins, 1909; Ordem *Kinetoplastida*, Vickerman, 1976; Subordem *Trypanosomatina*, Kent, 1880; Família *Trypanosomatidae*, Grobben, 1905; Gênero *Leishmania*, Ross, 1903 (Levine, et al., 1980).

Dentro do gênero *Leishmania*, existem três grupos classificados como três subgêneros distintos. Essa classificação depende dos hospedeiros e

do segmento do intestino do flebotomíneo colonizado pelos parasitos, sendo confirmada pelas análises filogenéticas de sequencias de DNA. Nas Américas, o gênero *Leishmania* é subdividido em dois sub-gêneros. Classificam-se no sub-gênero *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987) as espécies que se desenvolvem na porção posterior do intestino, enquanto as que apresentam desenvolvimento na porção anterior e média do intestino são do sub-gênero *Leishmania* (Safjanova, 1982). O terceiro sub-gênero, *Sauroleishmania*, compreende espécies de *Leishmania* que parasitam répteis e recentemente foi incluído dentro do gênero após análise filogenética baseada em sequência de DNA, sendo considerado um grupo de desenvolvimento secundário derivado das espécies de mamíferos (Bates, 2007).

Das pouco mais de 30 espécies conhecidas, cerca de 21 possuem importância veterinária e médica, sendo responsáveis pelas diversas manifestações clínicas observadas na leishmaniose. As diferentes espécies são morfológicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análises isoenzimáticas, métodos moleculares, ou anticorpos monoclonais (Bates, 2007).

Morfológicamente, os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam basicamente duas formas evolutivas: a amastigota e a promastigota. A forma amastigota, com corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2 μm , é imóvel e intracelular. Entre as espécies, há pouca variação morfológica. Do ponto de vista ultraestrutural, o núcleo é grande, arredondado ou ovóide, por vezes ocupando maior parte do corpo do parasito. Próximo ao núcleo encontra-se em forma de bastão, o cinetoplasto, estrutura mitocondrial constituída por estruturas filamentosas, circulares, formadas por DNA, denominadas k-DNA. Uma invaginação da membrana na região anterior do corpo celular forma a bolsa flagelar, onde fica alojado o flagelo, que não é livre. Junto à membrana celular, em conformação regular e equidistante, estão os microtúbulos em número variável. Estes microtúbulos subpeliculares fazem parte do citoesqueleto do parasito. Na bolsa flagelar, área relacionada às atividades de endocitose e exocitose, não são observados microtúbulos

subpeliculares. Entre o flagelo e o cinetoplasto encontra-se o corpo basal, continuação do flagelo. Complexo de Golgi, retículo endoplasmático e outras estruturas pouco diferenciadas também são encontradas no citoplasma. A forma amastigota se desenvolve poucas horas após ser internalizada pelas células-alvo do hospedeiro vertebrado (WEBSTER & RUSSEL, 1993; GULL, 1999; BATES, 2007).

A forma promastigota apresenta corpo alongado, tamanho variando entre 14 e 20 μm e flagelo livre. É extracelular e móvel, encontrando-se no intestino do hospedeiro invertebrado. O flagelo emerge da porção anterior do parasito, com medida igual ou superior ao maior diâmetro do corpo, e é responsável pela mobilidade das formas promastigotas. Estruturalmente, a forma promastigota difere da forma amastigota pelas seguintes características: forma alongada do corpo, presença de flagelo livre, desenvolvimento da mitocôndria, núcleo maior, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático mais evidente. À medida que as formas promastigotas se desenvolvem no intestino do hospedeiro invertebrado, elas sofrem pequenas transformações morfológicas, sendo classificadas em cinco estágios: promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonadas, haptomonadas, e metacíclicas. A forma infectante para o hospedeiro definitivo é a promastigota metacíclica, que se define no final do ciclo intravetorial, e são formas menores, de elevada mobilidade, possuindo um flagelo mais longo (GOSSAGE et al. 2003; BATES, 2007).

2.2 Ciclo biológico

Por apresentar o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vertebrado canídeo, roedor, marsupial ou humano, e outro invertebrado (dípteros hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*), os protozoários do gênero *Leishmania* são classificados como parasitos heteroxenos. A principal espécie vetora no Novo Mundo é *Lutzomyia longipalpis* (CHANG, 1990; VASSILIOS, 1993).

No ciclo de vida, a fêmea do flebótomo, durante repasto no hospedeiro mamífero infectado, ingere sangue com células parasitadas, principalmente macrófagos, que são rapidamente destruídos e liberam as formas amastigotas. Nas primeiras 24 horas dentro do inseto, as amastigotas se dividem por fissão binária longitudinal e se diferenciam em promastigotas no aparelho digestório. As formas promastigotas se diferenciam em três estágios intermediários até se transformarem em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes, e se locomovem para a parte anterior do tubo digestório do vetor, acumulando-se na região da cárdia e válvula do estomodeu e degenerando-a. Devido à lesão valvular, o flebotomíneo regurgita as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* juntamente com a saliva (revisado por KILLICK-KENDRICK, 1990; BATES, 2008) na pele do hospedeiro vertebrado, durante os próximos repastos. As promastigotas metacíclicas inoculadas são então internalizadas pelos macrófagos do hospedeiro vertebrado, localizando-se no vacúolo parasitóforo e transformando-se em amastigotas. No vacúolo, elas se multiplicam e são capazes de inibir diversos mecanismos de defesa celular que deveriam causar sua lise, como fusão fagossomo-lisossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de citocinas e óxido nítrico. Em cerca de 24 a 48 horas as amastigotas se multiplicam, podendo haver ruptura dos macrófagos e, novamente, a internalização dos parasitos por outras células, causando sua disseminação pelo organismo, dependendo da espécie de *Leishmania* infectante. Estes macrófagos infectados, quando ingeridos por outro flebótomo, reiniciam o ciclo de vida do parasito (MOLYNEUX & KILLICK-KENDRICK, 1987; CUNNINGHAN, 2002).

As manifestações clínicas e o curso da infecção da doença são influenciados por diversos fatores, ligados ao parasito, ao vetor, e ao hospedeiro. Elas dependem da natureza do agente infectante, sua espécie, infectividade, disseminação hematogênica ou linfática, de fatores da saliva do inseto vetor e da resposta imunológica e susceptibilidade genética do hospedeiro (WILSON & PEARL, 1990; DEDET, 1999; SALMAN et al., 1999).

2.3 Patogenia e clínica

Para que a infecção em hospedeiros mamíferos se estabeleça, é necessário que o parasito, assim que inoculado, penetre na célula hospedeira, que podem ser monócitos, macrófagos teciduais, células dendríticas, neutrófilos, dentre outras (RITTER & KÖRNER, 2002). Uma vez englobado no vacúolo parasitóforo, ele ativa mecanismos intrínsecos, que o capacitam a resistir à ação das enzimas hidrolíticas do lisossoma e dos intermediários reativos do oxigênio (ROI), resultantes da ação das enzimas dependentes de oxigênio, que os macrófagos e neutrófilos possuem (PRESCOTT et al., 2005). O parasito exerce ação lesiva direta sobre estas células, causando, alteração funcional e, posteriormente, a destruição das mesmas (GENARO et al., 2000; CUNNINGHAN, 2002).

O local de inoculação das formas promastigotas pelo flebótomo é a porta de entrada da infecção. O período de incubação pode variar de um mês a anos. Em animais susceptíveis, sua disseminação para o organismo ocorre por via hematogênica e/ou linfática, principalmente no interior de células do hospedeiro, podendo, eventualmente, ser transportado livre. O parasito é encontrado em maior abundância no baço, linfonodos, medula óssea, fígado, rins e pele (CUNNINGHAN, 2002).

As formas amastigotas já foram observadas nos macrófagos dos animais infectados e em várias células de todo o organismo, como monócitos, neutrófilos, eosinófilos, células endoteliais (OLIVEIRA et al., 1993; MARSELLA & GOPEGUI, 1998), fibroblastos (HERVAS-RODRIGUEZ et al., 1996; BOGDAN et al., 2000), humor aquoso (FERRARI, 1990), hepatócitos (TAFURI et al., 2001) e músculo (SILVA-ALMEIDA et al., 2010). Os fibroblastos podem conter a forma amastigota apenas na fase latente ou crônica da infecção (AGA et al., 2002).

Além das lesões causadas pela ação direta do parasito, algumas alterações observadas na leishmaniose visceral são imunomediadas. A infecção em animais susceptíveis resulta em intensa produção de anticorpos.

Ocorre a proliferação de linfócitos B, histiócitos e macrófagos, resultando em linfadenomegalia generalizada e hepato e esplenomegalia. A resposta humoral, expressa pela elevada produção de anticorpos, é ineficiente e provoca efeitos adversos no organismo. As imunoglobulinas, ao opsonizarem o parasito, facilitam a sua entrada em macrófagos, colaborando para a sua sobrevivência. Ainda, anticorpos circulantes formam imunocomplexos, que se depositam nas paredes de vasos sanguíneos e nos rins, podendo causar vasculite, poliartrite e glomerulonefrite (SLAPPENDEL, 1988; CUNNINGHAN, 2002).

A relação parasito-hospedeiro estabelecida entre as leishmânias e o hospedeiro vertebrado é muito complexa, estando ligada a uma grande variedade de fatores que interagem de forma variada. O resultado dessa complexa interação resulta na existência de um amplo espectro de situações distintas, que vão desde a ausência de doença até ao desenvolvimento de manifestações clínicas graves (CAMPILLO et al., 1999).

No homem, a leishmaniose pode se apresentar sob diversas formas: a cutânea, como na leishmaniose tegumentar americana (LTA), a forma visceral, na leishmaniose visceral (LV), a forma cutânea-difusa e a forma mucocutânea. No cão, a doença pode se apresentar de duas formas, a visceral e a cutânea. Dependendo da manifestação clínica do animal, podemos encontrar cães assintomáticos, sem manifestação clínica aparente, cães oligossintomáticos, onde os sinais clínicos presentes estão em número reduzido, ou cães sintomáticos, com presença de um quadro clínico característico (CAMPILLO et al. 1999).

A Leishmaniose Tegumentar Canina apresenta-se semelhante à clínica do homem, com lesões ulceradas, por vezes como dermatite furfurácea, e áreas de alopecia, principalmente encontradas no pavilhão auricular, focinho, face, membro posterior e bolsa escrotal, podendo acometer mucosas, comumente a nasal e oral (MADEIRA et al., 2004).

A Leishmaniose Visceral Canina é a forma mais grave, sendo de evolução crônica, sistêmica e fatal se não tratada (PALATNIK-DE-SOUSA et

al., 2001). Os sinais da doença são amplamente variáveis, sendo as mais freqüentes: linfadenomegalia; alterações dermatológicas como alopecia, lesões ulcerativas, prurido intenso e descamação furfurácea; anorexia; onicogrifose; emaciação; anemia; uveíte; hipertermia; diarréia e melena; quadros de pneumonia, e de epistaxe. Nas fases mais crônicas da doença observa-se aumento do quadro de hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, com diarréia e hemorragia intestinal, atrofia muscular, e insuficiência renal crônica, que acabam ocasionando óbito (FEITOSA, et al., 2000).

2.4 Tratamento

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 da leishmaniose visceral em cães infectados ou doentes, com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (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 (BRASIL, 2008). Portanto, no Brasil, os tratamentos descritos são de uso exclusivo para humanos.

2.4.1 Antimoniais pentavalentes

Historicamente, vários tratamentos contra a leishmaniose já foram utilizados no passado, como o quinino, arsenicais e injeção de aguarrás. Com resultados variáveis, nenhum deles possuía eficácia comprovada (RESS et al., 1985). Em 1912, o médico Gaspar Viana utilizou pela primeira vez com sucesso o tártaro emético, antimonial trivalente (Sb^{III}), na terapia de LTA (VIANNA, 1912). Entre 1920 e 1930, os antimoniais pentavalentes (Sb^V) foram introduzidos no tratamento da LV, fazendo o tratamento cair de 3 a 4 meses para semanas. Na década de 40 surgiram novas formulações de antimoniais

pentavalentes, menos tóxicos e utilizados até hoje: antimoniato de meglumina, Glucantime[®], e o estibogluconato de sódio, Pentostan[®] (MURRAY et al. 2000).

O Pentostan[®] é utilizado nos países de língua inglesa, incluindo os Estados Unidos, enquanto o Glucantime[®] é usado em países da América latina e demais países de língua francesa e espanhola. No Brasil, o tratamento da doença humana faz uso de uma formulação disponível do antimoniato de N-metilglucamina, de distribuição exclusiva do Ministério da Saúde. O esquema terapêutico recomendado para a leishmaniose visceral é de 10 a 20 mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, por vinte a trinta dias. O tratamento deve ser limitado a duas ou três ampolas por dia, alcançando índices de cura de 95%. A resistência crescente tem levado ao emprego de doses de 40mg/kg/dia, e ao questionamento do limite máximo de 850 mg/dia, pela verificação de que a toxicidade foi superestimada no passado (HUEB, 1997; GONTIJO & MELO, 2004).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes permanece incerto. Para se tornar ativo, o Sb^V precisa entrar na célula do hospedeiro, ser convertido em Sb^{III}, e cruzar a membrana fagolisossômica para atuar sobre as formas amastigotas. É pressuposto que esta forma trivalente possa interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito inibindo a enzima fosfofrutoquinase, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; ANVISA, 2011). Na forma amastigota, uma metaloprotease zinco-dependente, essencial para o desenvolvimento do parasito, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima, constituindo uma nova via de ação (Bangs et al. 2001).

Apesar dos poucos avanços com os antimoniais nas últimas décadas, eles ainda hoje são a terapêutica de primeira escolha contra a leishmaniose. O tratamento é longo, com via de administração intramuscular, o que às vezes requer hospitalização, provocando desconforto no paciente, e altos custos para o Estado. É contra-indicado em grávidas, nefropatas,

cardiopatas, pacientes com Doença de Chagas e tuberculose (GRIMALDI & TESH, 1993). Está associado a diversos efeitos adversos, como artralguas, mialgias, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, anorexia, náusea, vômito, neuropatia periférica, nefrotoxicidade, trombocitopenia (CHULAY et al., 1985; HORBER et al., 1991; ANTEZANA et al., 1992; BRACONNIER & MIORNER, 1993; HEPBURN et al., 1993; BRUMMIT et al., 1996) e podem, às vezes, induzir a interrupção do tratamento. Deve-se observar que, mesmo doses menores da droga também podem induzir efeitos colaterais (CASTRO et al., 1990).

Uma nova via de administração dos antimoniais que tem alcançado bons resultados, com a cicatrização total das lesões, é a administração intralesional de Sb^V. Porém, a mesma apresenta os seguintes inconvenientes: administração ininterrupta por mais de um mês; tratamento localizado em cada lesão individual e; infiltração da droga na derme profunda (ASTE et al., 1998).

Quando os antimoniais não se mostrarem efetivos devido aos longos esquemas terapêuticos, reações adversas ou limitações de uso, existem alternativas de tratamento, como a anfotericina B, pentamidinas, miltefosina e imunomediadores, que são utilizados nos serviços de referência no tratamento da leishmaniose visceral (GONTIJO & MELO, 2004).

2.4.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico produzido por cultura de actinomicetos *Streptomyces nodosus* e utilizado no combate de infecções sistêmicas. A anfotericina B lipossomal foi utilizada pela primeira vez no tratamento da LTA por Sampaio & Mardsen (1997). É a droga de eleição em casos de resistência do parasito aos antimoniais (TORRE-CISNEROS et al., 1994).

Ela age ligando-se aos esteróides da membrana celular da célula sensível, especificamente ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e provocando extravasamento dos componentes intracelulares. As leishmânias, assim como os fungos, também possuem ergosterol em sua membrana

plasmática, o que explica a eficácia da anfotericina B frente ao parasito (SUNDAR et al., 2004; ANVISA, 2011b).

Apesar de ser droga de segunda escolha no tratamento da leishmaniose, a anfotericina B apresenta severas reações adversas, como febre, calafrios, cefaléia, hipocalemia, hipomagnesemia, anemia, leucopenia, flebite e nefrotoxicidade, sendo que toda a terapêutica deve ser feita sob vigilância, em serviços especializados e com o paciente hospitalizado (ANVISA, 2011b).

2.4.3 Pentamidina

A pentamidina é droga de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose. Os primeiros relatos de sucesso terapêutico no tratamento de alguns casos de LTA foram descritos em 1952 por Orsini e Silva. É utilizada comercialmente na forma de sais de pentamidina, principalmente isotionato de pentamidina. Provavelmente age interferindo na síntese do DNA, inibindo a topoisomerase II mitocondrial, alterando morfológicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial (CROFT & BRASIL, 1982; BASSELIN et al. 1996).

Na região Norte do Brasil, tem-se obtido sucesso no tratamento da forma cutânea, causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis*, com três aplicações de 4 mg/kg/dia, em dias alternados. Entretanto, constitui um tratamento caro, e o uso terapêutico contra leishmaniose, assim como a anfotericina B, também deve ser feito sob vigilância (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). É contra-indicado para grávidas, pessoas com diabetes, nefropatias, insuficiência renal e cardiopatias. Os efeitos adversos, muito comuns, incluem náuseas, vômitos, cefaléia, hipoglicemia, hipotensão durante a infusão, aumento de uréia e creatinina, síncope, diabetes, leucopenia e pancreatite. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

2.4.4 Miltefosina

A miltefosina é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente como um quimioterápico antineoplásico. Na década de 80, durante a sua avaliação para esta finalidade terapêutica, descobriu-se a sua potente ação contra leishmânias. Em 1992 foi aprovada na Índia como o primeiro tratamento oral para a leishmaniose visceral. Estudos utilizando a miltefosina no tratamento da forma cutânea da doença resultaram em boa eficácia contra *L. (V.) panamensis*, mas para *L. (V.) braziliensis*, não houve eficiência adequada (SOTO et al., 2004). Os mecanismos de ação da miltefosina contra a leishmânia ainda não são bem entendidos. Nos mamíferos, age no metabolismo lipídico das membranas, induzindo alterações de sinalização e apoptose das células. Nas leishmânias altera o metabolismo lipídico e a sinalização celular (PHILIPS & STANLEY, 2006). Além de interferir na formação da membrana plasmática do parasito, age também como imunomodulador, ativando os linfócitos T, leucócitos e plaquetas. (TAVARES, 2001). Ocorrem vômitos e diarreia em até 60% dos pacientes tratados com miltefosina, além de elevação das excretas nitrogenadas e transaminase. São necessários maiores estudos com esta medicação para verificar sua eficiência em relação às espécies de leishmânias existentes no Brasil (PHIPLIPS & STANLEY, 2006).

2.4.5 Paramomicina

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo usado no tratamento da leishmaniose visceral e cutânea. Age afetando a atividade mitocondrial do parasito. Na Índia e no Quênia teve resultado promissor com cura de 90% para LV na dose de 15mg/kg/dia durante 20 dias, incluindo casos resistentes ao Sb^v (THAKUR et al., 2000). O uso em pomada a 15% de paramomicina durante 20 dias apresentou resultados positivos em 77% dos casos na LC experimental provocada por *L. major* (EL-ON, 1992). Apresenta nefro e ototoxicidade.

2.4.6 Outros tratamentos

Diversos ativos têm sido testados contra leishmaniose, como o cetoconazol (SAENZ et al., 1990), o itraconazol (AL-FOUZAN et al., 1991; ALRAJHI et al., 2002), a terbinafina (KHALIL et al., 1996; BAHAMDAN et al., 1997); a azitromicina (PRATA et al., 2003; SILVA-VERGARA et al., 2004; SAMPAIO et al., 2006); e imiquimode (SEEBERGER et al., 2003; MIRANDA-VERASTEGUI et al., 2005), todos com resultados variáveis. Tratamentos térmicos, como a termoterapia (VELASCO-CASTREJON et al., 1997) e a crioterapia (ASILIAN et al., 2004) também foram testados no tratamento de lesões cutâneas, contudo a falta de especificidade e necessidade de profissionais capacitados para a técnica dificultam o avanço do tratamento.

Pesquisas com imunoterapia, principalmente citocinas, também já foram realizadas. Embora o INF- γ não seja ativo o bastante sozinho, a associação entre INF- γ e antimoniato de meglumina mostrou-se bastante eficaz no tratamento de casos de leishmaniose cutânea (BADARO & JOHNSON, 1993) e mucocutânea (FALCOFF et al., 1994). Outras citocinas, como IL-2 (AKUFFO et al., 1990), IL-12 (SCOTT & FARREL, 1996) e GM-CSF, fator estimulante de colônia de granulócitos monócitos, (MURRAY et al., 1995) também foram avaliadas como alternativas de tratamento. Contudo, além dos elevados custos, o tratamento provoca diversos efeitos colaterais, como mialgias, febre, dor de cabeça, fadiga e em alguns casos leucopenia (BERMAN, 1997).

2.5 Fitoterápicos e leishmaniose

A fitoterapia é considerada a forma de medicina mais antiga da civilização humana, com registros do ano 2500 a.C. sobre a utilização de plantas medicinais na China (WANG, et al., 2002). A legislação atual define fitoterápico como medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua

composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2006).

Recentemente, as plantas tornaram-se importante fonte de produtos biologicamente ativos. Cerca de 25% dos medicamentos possuem extratos em sua composição. Com isso, o consumo mundial de plantas medicinais e seus produtos se convertem em grandes volumes de negócios, principalmente devido a vários estudos científicos confirmarem as propriedades das plantas, exercendo algum tipo de ação farmacológica (SIMOES et al., 2007). Os medicamentos fitoterápicos chegam a movimentar o volume de US\$ 43 bilhões por ano no mercado mundial, estabelecendo-se como o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

A descoberta de propriedades terapêuticas de secundários ativos presentes em extratos vegetais tem despertado o interesse da investigação de novas opções de tratamento da leishmaniose com plantas medicinais. O grande número de experimentos que fazem uso desses extratos contra leishmaniose tem levado a pesquisa de metabólitos secundários, como alcalóides, compostos fenólicos, terpenóides, flavonóides e outros (BERGMANN et al., 1997; DESJEUX, 2004).

Kapil et al. (1993), demonstraram em estudos *in vitro* com formas promastigotas *L. donovani*, que o alcalóide piperina, presente em espécies de *Piper spp*, possui atividade leishmanicida comparada a ação da pentamidina, medicamento padrão no tratamento das leishmanioses. Outra fração alcalóide rica em voacangina e coronaridina, isoladas da planta *Tabernaemontana catharinensis*, demonstrou excelente efeito leishmanicida sobre as formas amastigotas da *L. amazonensis*, independente da produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados (SOARES et al., 2007).

O extrato etanólico da espécie *Himatanthus sucuuba* foi testada sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, obtendo IC₅₀ de 20 e 5 µg/mL, respectivamente. Posteriormente, desse extrato foram isolados

dois iridóides que podem ser os responsáveis pela atividade terapêutica do extrato (CASTILLO et al., 2007).

Moreira et al. (2007) em São Luís, ao testarem a fração hidroalcoólica de *Stachytarpheta cayennensis*, planta usada popularmente no tratamento de lesões cutâneas causadas por leishmânia, sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, obteve os valores de IC₅₀ de 73,7 µg/mL e 382,5 µg/mL, respectivamente.

O efeito da substância (3S)-16,17-Didehidrofalcarinol, um oxylipin isolado de *Tridax procumbens*, sobre promastigotas de *L. mexicana* mostrou-se bastante promissora, com IC₅₀ do extrato bruto da planta de 16,52 µg/mL, e do isolado, 0,55 µM (MARTÍN-QUINTAL et al., 2010).

A atividade *in vitro* do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* demonstrou-se mais eficiente que o próprio citral dele extraído. A concentração inibitória das formas amastigota de *L. amazonensis* frente aos dois compostos foi, respectivamente, de 1,7 e 8,0 µg/mL (SANTIN et al., 2009).

As furoquinolonas e cumarinas obtidas da *Helietta apiculata* demonstraram moderada atividade *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, com valores de IC₅₀ variando entre 17 e 450 µg/mL (FERREIRA et al, 2010).

Benzofenóis e extratos de frutos de *Garcinia brasiliensis* apresentaram boa atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*, com IC₅₀ variando, entre 1,43 e 32,5 µg/mL (PEREIRA et al., 2010).

2.6 *Morinda citrifolia*

2.6.1 A planta

Morinda citrifolia é uma planta de pequeno porte originária da Polinésia, que produz o fruto popularmente conhecido como noni. Sua classificação taxonômica é descrita da seguinte forma: Reino *Plantae*, Filo *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Rubiales*, Família *Rubiaceae*,

Gênero *Morinda*, Espécie *Morinda citrifolia* (INBiO, 1997). Três variedades distintas da espécie *Morinda citrifolia* são conhecidas: *Morinda citrifolia* var. *bracteata*, *Morinda citrifolia* var. *Potteri* e *Morinda citrifolia* var. *citrifolia*. Elas diferem entre si principalmente por diferenças morfológicas da folha e do fruto. Das três, a variedade de maior importância econômica e medicinal é a *Morinda citrifolia* var. *citrifolia* (RAZAFIMANDIMBISON et al., 2010).

O noni é uma árvore ou arbusto que pode chegar aos 20 anos medindo de 9 a 10 metros de altura. Cresce tanto em florestas como em terrenos rochosos ou arenosos. Com temperatura e umidade adequadas, produz flores e frutos durante todo o ano. As folhas são largas, simples e opostas com 7 a 25 cm de largura e 20 a 45 cm de comprimento, de coloração verde escura, com veias vincadas e glabra nas duas faces. As flores, pequenas e brancas, são perfeitas, sésseis e se unem na base do capítulo. O fruto é oval e atinge de 4 a 7 cm de tamanho e cerca de 100 a 300 gramas (Figura 3). Ao surgir, apresenta cor verde, mudando para amarela e por fim, quase branca translúcida, altura em que o fruto é colhido. O fruto tem um forte odor, pelo qual é popularmente chamado de fruto do queijo ou fruto do vômito. O odor característico do fruto é atribuído aos ácidos butírico, octanóico e hexanóico. A fruta contém muitas sementes em forma discoidal, chegando ao número de 250 sementes por fruto (MORTON, 1992; DIXON et al., 1999; NELSON, 2001; ROSS, 2001; WANG et al., 2002; WEST et al., 2009a).



Figura 1 – Frutos de *Morinda citrifolia* em diferentes estágios de maturação.

No Estado do Maranhão, a espécie é de recente introdução, em destaque para sua capital São Luís, devido a sua localização geográfica, o clima e o solo dessa região, favorável na amplitude requerida para desenvolvimento dessa espécie, sendo as primeiras mudas plantadas em 2005. Tanto na capital, como em cidades do interior do estado, seus frutos são de fácil acesso, sendo encontrados em diversas feiras e pequenos mercados (SILVA, 2010). Ela tem sido utilizada no tratamento de várias doenças, tais como artrites, hipertensão arterial, úlceras gástricas, diabetes e câncer (WANG et al., 2002).

2.6.2 Principais constituintes químicos

Estudos dos componentes químicos e nutricionais do suco do noni ainda são muito limitados, principalmente sobre o modo de processamento e obtenção do extrato. A composição química do noni é bastante complexa, apresentando mais de 200 compostos fitoquímicos, além de variar de acordo com diversas características, como estado de maturação do fruto, época de colheita, solo e adubação. A composição do noni ainda não foi descrita e apenas informação parcial está disponível (CHAN-BLANCO et al., 2006; SILVA, 2010; YANG et al., 2010).

Além da sua utilidade como alimento, ao noni também é atribuído propriedades medicinais. É considerada uma planta adaptogênica, com propriedades que exercem influência de homeostase no organismo, pela capacidade de ajudar o corpo a fazer o uso de energia mais eficientemente através do aumento da atividade antioxidante, melhorando a resistência física. A caracterização química revela seu poder antioxidante pela presença de beta-caroteno, ácido ascórbico, selênio, terpenóides, alcalóides, polifenóis, flavonóides e rutina. (PRAVEEN & AWANG, 2007; PALU, et al., 2008a; MURALIHARAN & SRIKANTH, 2010).

Heinicke (1985) em estudos com o *Ananás sp.*, descobriu a proxeronina, um alcalóide que se liga a serotonina para se converter em

xeronina, um alcalóide essencial à vida. A ela são atribuídos os vários efeitos benéficos do noni. Entretanto, há ausência de informação sobre a caracterização química deste alcalóide. Heinicke (2001), em seus estudos no Instituto de Pesquisa do Abacaxi no Havaí, utilizou o fruto do noni e isolou um material volátil que o chamou de xeronina. Ao isolar este alcalóide em estado puro, foi capaz de identificar sua exata estrutura química, pois poderia ser reduzida para uma estrutura cristalina seca (SILVA, 2010).

Além da xeronina, os outros compostos presentes no fruto são terpenos, compostos fenólicos, damnacanthal, norepinefrina, escopoletina, antraquinonas, aminoácidos, asperulosido, iridóides, fitonutrientes, selênio, morindona, morindina, acubina, alizarina, ácido caprótico, ácido caprílico, flavonóides e triterpenóides (LEVAND & LARSON, 1979; LAVAUT & LAVAUT, 2003; YANG et al., 2010).

2.6.3 Farmacocinética e toxicidade

Para analisar a farmacocinética do suco de noni, devido a seus inúmeros componentes, Wang et al. (2002) utilizaram a escopoletina como biomarcador. Ratas SD foram tratadas por vi oral com 10 mL/kg de TNJ puro. Através de análises de cromatografia líquida de alta eficiência, observou-se no plasma pico de concentração de 50% em 30 minutos, mantendo-se por duas horas, e meia-vida de quatro horas. Em uma hora ocorre distribuição para diferentes tecidos com pico após três horas da administração, e rápida diminuição desta em seguida.

Poucos estudos foram realizados para garantir a segurança do uso de *M. citrifolia*. Wang et al. (2002) avaliaram a toxicidade aguda e crônica do TNJ em ratos durante 14 dias e 13 semanas respectivamente, com dose de 15000 mg/kg/dia para a toxidade aguda. Ao final, não observou nenhuma alteração clínica ou sinal macroscópico em órgãos necropsiados dos animais tratados por 14 dias. Para a toxicidade crônica, a dose NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) encontrada foi de 80 mL/kg/dia de TNJ. Mais

recentemente, novos estudos, constataram que o consumo de suco de noni não induz a efeitos adversos no fígado (WEST et al., 2009b).

Em estudo de toxicidade reprodutiva em fêmeas de ratos Wistar expostos ao extrato aquoso de noni, foi concluído que a dose de 7,5 mg/kg de extrato são capazes de produz toxicidade reprodutiva (MÜLLER et al., 2009).

2.6.4 Legislação

No Brasil, a Resolução nº 90, de 29 de abril de 2004, determinou a suspensão em todo território nacional do Produto SUCO TAHITIAN NONI, que irá durar o tempo necessário à realização de análises e outras providências requeridas, de toda propaganda com alegações de propriedades terapêuticas e/ou medicinais, veiculadas em todos os meios de comunicação, inclusive na internet (BRASIL, 2004).

Em 29 de maio de 2007 o informe técnico nº 25, referente a área de alimentos “Esclarecimentos sobre a comercialização do suco de fruta noni (*Morinda citrifolia*)”, adverte: com o intuito de proteger e promover a saúde da população, os produtos contendo noni não devem ser comercializados no Brasil como alimento até que os requisitos legais que exigem a comprovação de sua segurança de uso e registro sejam atendidos (BRASIL, 2007).

O suco de noni é aprovado para utilização como alimento seguro na União Européia. Recentemente, a Comissão Européia com base na avaliação científica consultou a Autoridade Européia para a Segurança dos Alimentos (AESA), e concluiu que o purê e o concentrado de frutos de noni são seguros para a população em geral (SILVA, 2010).

Nos Estados Unidos, o noni é considerado seguro para consumo, sendo listado como tal na GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e na FDA (*Food & Drug Administration*) sendo neste país comercializado como um suplemento medicinal (NELSON & ELEVITCH, 2006).

2.6.5 Propriedades fitoterápicas

Estudos científicos têm atribuído várias propriedades terapêuticas do noni à presença de compostos terapeuticamente ativos. A norepinefrina estimula o sistema nervoso simpático; o damnacanthal é uma substância natural, utilizada para combater o câncer, e a xeronina ocasiona reação no núcleo da célula, fazendo que as pessoas se sintam com mais energia física e mental. A escopoletina se une a serotonina, cuja presença está associada com a diminuição da ansiedade e da depressão, com a regulação da temperatura corporal e da atividade sexual, além de ser o precursor da melatonina como regulador do sono, demonstrando atividade anti-hipertensão (LAVAUT & LAVAUT, 2003).

Apesar do grande número de compostos com função orgânica, a literatura ainda é restrita quanto à utilização de extratos de *M. citrifolia*, contudo diversos trabalhos têm demonstrado o seu potencial fitoterápico (SILVA, 2010).

Basar et al. (2010) demonstraram atividade analgésica e antiinflamatória do concentrado puro do fruto de noni, com efetiva diminuição da dor e da destruição das articulações causada pela artrite. A atividade analgésica central dose-dependente do extrato aquoso das raízes do noni já havia sido descrita por Younos et al. (1990).

Atividade antioxidante da *M. citrifolia* foi observada em diversos estudos, como em humanos expostos a fumaça de cigarro e tratados com noni (WANG, 2009), e com extrato de raízes, fruto e folhas da planta (ZIN et al., 2002). Dussossoy et al. (2011) associou as propriedades anti-oxidativas a compostos fenólicos e iridóides, e a atividade anti-inflamatória, associou a ação por meio de NO e PGE2. Chang-Hong et al. (2007) ao analisar os compostos fenólicos separadamente, concluiu que estes são os responsáveis pelos efeitos antioxidantes do extrato metanólico do fruto *M. citifolia*.

Estudos de atividade antitumoral demonstraram resultado positivo, tanto do suco (WANG & SU, 2001), como de substâncias isoladas da *M. citrifolia*. O Noni-ppt, substância rica em polissacarídeos do fruto de noni, apresentou percentual de cura de 25 a 45% dos tumores em camundongos (FURUSAWA, 2003). Antraquinonas isoladas da raiz inibiram o crescimento em células tumorais *in vitro* (KAMYIA et al., 2010).

O efeito sedativo e ansiolítico do extrato metanólico bruto do fruto de *M. citrifolia* foi constatado por Deng et al.(2007), com ação provável pela presença de ligante(s) competitivo(s) no extrato, que podem se ligar a receptores GABA como um agonista.

Harada et al. (2009) observaram efeito preventivo do suco de noni em danos neuronais induzidos por isquemia focal. Mais tarde, Muralihdaran et al. (2010) atribuíram a atividade neuroprotetora do extrato etilacético do fruto de *M. citrifolia* a inibição de atividade contra a acetilcolina esterase e monoamino oxidase, com consequente queda de dopamina e serotonina.

A inibição dos efeitos da gota também foi comprovada através da inibição da enzima xantina oxidase provocada pelo extrato do fruto. (PALU, et al., 2009), assim como a atividade hipoglicêmica e hepatoprotetora de suco de noni fermentado em ratos diabéticos (NAYAK et al., 2010).

O extrato aquoso de fruto, e o biomarcador escopoletina, demonstraram potencial preventivo e terapêutico para doenças inflamatórias gastro-esofágicas, incluindo ação inibitória da serotonina, radical-livre e inflamação mediada por citocinas (MAHATTANADUL et al., 2011).

Os efeitos da *M. citrifolia* no sistema imunológico foram comprovados por Palu et al. (2008b), pela diminuição da produção de IL-4 e aumento da produção de INF- γ , sugerindo modulação da via de ativação de receptores canabinoide 2, e por Hirazumi & Furusawa (1999), com aumento de liberação de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e NO de animais tratados com suco de noni.

Diversos estudos tem demonstrado que a *M. citrifolia* possui atividade antimicrobiana, contra *Enterococcus faecalis* (MURRAY et al., 2008; KANDASWAMY, et al., 2010), assim como para outras diversas bactérias, devido a componentes como compostos fenólicos, incluindo acubina, L-asperulosida, alizarina, escopoletina e outras antraquinonas (CHAN-BLANCO et al, 2006). Resultados de atividade contra vírus e fungos também já foram observados por Bushnell *et al.* (1950) e Locher *et al.* (1995). A avaliação do extrato de *M. citrifolia* contra *Candida albicans* revelou um excelente potencial contra este fungo (JAINCKITTIVONG et al, 2009). Mesia et al. (2008) encontraram concentração inibitória mínima contra *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* maior do que 64 µg/mL.

Além dos trabalhos já publicados, existem ainda aqueles mantidos sob propriedade intelectual. Atualmente existem 58 registros envolvendo a *M. citrifolia* no órgão oficial de patentes dos Estados Unidos, US Patent Trademark Office, 77 registros na União Européia e 5 patentes no Brasil, registradas no INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

3 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são endêmicas em grande parte do mundo constituindo um sério problema de saúde pública, principalmente agora em que cada vez mais tem sido registrado casos de cepas de *Leishmania* resistentes ao tratamento com os antimônios pentavalentes. Além disso, os próprios antimoniais, drogas de primeira escolha no tratamento contra leishmanioses, provocam fortes efeitos colaterais, o que em alguns casos leva a interrupção do tratamento. Na Medicina Veterinária há um problema a mais, pois não é permitido o uso das drogas utilizadas em humanos em cães. A *Morinda citrifolia*, após vários estudos, tem demonstrado um grande potencial contra microorganismos, como bactérias, vírus e fungos, entretanto nenhum estudo contra *Leishmania* foi descrito. Portanto, devido à necessidade de novas formas de tratamento que induzam menos efeitos colaterais, e também como alternativa aos casos de resistência às drogas de eleição hoje utilizadas, o presente trabalho avaliou *in vitro* a ação leishmanicida e realizou o estudo fitoquímico do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização fitoquímica e avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida do extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia*.

4.1 Objetivos específicos

- Identificar as classes de constituintes químicos do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*;
- avaliar a atividade do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* contra formas promastigota, amastigota axênico e amastigota intracelular de *L. amazonensis*;
- avaliar a citotoxicidade do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* em cultura de células;
- avaliar a ação leishmanicida do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* em cultura de células infectadas por *L. amazonensis* e;
- avaliar as alterações ultraestruturais causadas pelo extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* em formas promastigota de *L. amazonensis*.

5 MATERIAIS E MÉTODO

5.1 Material vegetal

5.1.1 Área de Coleta

Frutos de *Morinda citrifolia* foram coletados na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil (Figura 1). A ilha possui área de 1.455,1 km², à 2° ao Sul do Equador, nas coordenadas geográficas latitude S 2°31' longitude W 44°16', estando à 24 metros acima do nível do mar. O tipo predominante de solo é o argissolo, composto por rochas sedimentares com formação na era cenozóica. O clima é tropical, quente e úmido. A temperatura mínima na maior parte do ano fica entre 20 e 23°C e a máxima geralmente fica entre 29 e 32° C. A média pluviométrica é de 2.325 mm (LABMET, 2011).

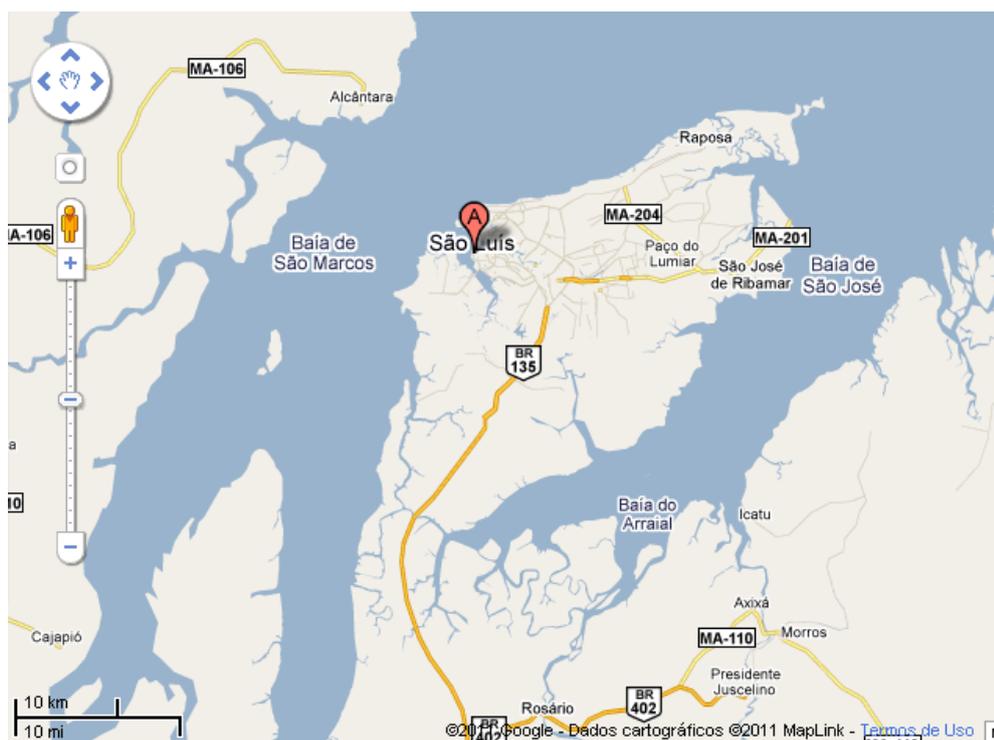


Figura 2 – Localização geográfica da ilha de São Luís. Fonte: Google Maps.

A coleta foi realizada em novembro de 2010, no período da estação seca, com índice médio de precipitação de 10,5 mm e temperatura média de 28°C (WMO, 2010). Os frutos foram identificados e submetidos à classificação botânica realizada pela Professora Ana Maria Maciel Leite, no Herbário

Professor Adalberto Freire Borralho, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. A exsicata foi depositada no Herbário sob o número 2000346.

5.1.2 Preparo do extrato de *M. citrifolia*

No laboratório, os frutos foram lavados com água destilada, secos com papel toalha e acondicionados em frasco de vidro estéril por dois a três dias para que o sumo fosse liberado pelo fruto. O sumo do fruto foi então coletado e centrifugado duas vezes a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi liofilizado e o pó mantido a 4°C. Para a utilização, o liofilizado foi diluído em PBS nas concentrações de uso e essa solução foi filtrada em membrana Millipore® de 0,22 µm (JAINKITTIVONG et al. 2009).

5.2 Análise fitoquímica

Para análise de principais classes químicas de metabólitos especiais, amostra do extrato foi submetida a análise fitoquímica preliminar segundo as técnicas adaptadas de Costa (1982) e Matos (1997).

5.2.1 Preparo das amostras para análise dos metabólitos especiais

Aproximadamente 100 mg do extrato do fruto de *M. citrifolia* foram solubilizados em 5 mL de MeOH e usados para identificação de antraquinonas, flavonóides, alcalóides, triterpenóides e esteróides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos, antocianidinas e chalconas. A composição dos reagentes utilizados no estudo fitoquímico encontra-se no Anexo A.

5.2.2 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.

5.2.3 Flavonóides

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 flavonóides.

5.2.4 Alcalóides

Em uma placa de 96 poços, 150 μL da amostra foram pipetados em 3 poços e adicionados 50 μL de Reativos de Mayer, Bouchardat e de Hager. O aparecimento de precipitado ou turvação branca indica a presença de alcalóides.

5.2.5 Triterpenóides e esteróides

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 esteróides e a cor vermelha, presença de triterpenóides.

5.2.6 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.

5.2.7 Cumarinas

A amostra foi gotejada em tira de papel de filtro e, em seguida, adicionada solução 10% de KOH. O aparecimento de fluorescência de cor azulada sob luz UV 365 nm indica a presença de cumarinas.

5.2.8 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.

5.2.9 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.

5.2.10 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.

5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos e evaporativo de espalhamento de luz (CLAE-DAD-ELSD)

Para determinação do perfil cromatográfico foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC, com gradiente, equipado com duas bombas LC-08, controlado por um módulo de interface 10A-CBM. Um injetor automático 10AVP e dois detectores, um detector de arranjos de diodo (DAD) SPD-M10A e o detector evaporativo de espalhamento de luz ELSD-LT, foram utilizados para análise dos extratos brutos. Os solventes foram filtrados por meio de um sistema Millipore® e a análise foi realizada em uma coluna de fase reversa LiChrospher Symmetry C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). Foram dissolvidos 5,0 mg em 1,0 mL de água MiliQ e a amostra foi centrifugada antes de ser analisada. A fase móvel foi água (A) e metanol (B), com o seguinte

gradiente de composição: 100% (A) → 5% (B) por 9 minutos, 20% (B) por 10 minutos, 30 % (B) por 10 minutos, 80% (B) por 10 minutos, 95% (B) por 5 minutos, variando de 0 a 100% em B em 60 minutos. O cromatograma foi adquirido nos comprimentos de onda 240 e 360 nm. O volume de injeção da amostra foi de 10 µL. Um fluxo constante de 1 ml/min foi utilizado durante a análise, com amplitude de 200 a 500 nm. Solventes com grau CLAE e água bidestilada foram utilizados nos estudos cromatográficos.

5.4 Cultura de Parasito

Formas promastigas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) foram mantidas em meio Schneider Insect (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL), a 26°C em estufa BOD (ANEXO B). Formas amastigotas axenico foram obtidas através da transformação da forma promastigota em meio Schneider's Insect Medium (Sigma, USA) modificado, suplementado com 5% de soro fetal equino, penicilina (100U/mL) e pH 5,4 em estufa a 32°C (TEIXEIRA et al., 2002). Para garantir a característica de infectividade, foram utilizadas somente culturas de promastigota com no máximo 10 passagens *in vitro*.

5.5 Cultivo celular

Macrófagos da linhagem J774.G8 foram cultivados em frascos de 25 cm² com meio Eagle Dulbecco modificado, DMEM (Sigma, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (10.000U/mL) e estreptomicina (10.000µg/mL) a 37 °C e 5% de CO₂.

5.6 Atividade do extrato de *M. citrifolia* contra formas promastigotas

Para avaliação da atividade contra promastigota, 100 µL de cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase log (1 x 10⁶ parasitos/mL) cultivados em meio Schneider Insect foram pipetados para poços da placa de 96 poços. Em cada poço com cultura foi adicionado 100 µL da solução de extrato de *M. citrifolia* nas concentrações 960–7,5 µg/mL e incubado em estufa

BOD a 26° C. Foram mantidos poços somente com parasito como controle. A viabilidade das formas promastigotas foi mensurada no final dos intervalos 24, 48 e 72 horas através de ensaio colorimétrico MTT (FERREIRA et al, 2010). A cada poço foi adicionado volume correspondente a 10% do total de MTT, 20 µL. Após 2 horas, em cada poço foi pipetado 50 µL de DMSO. A placa foi levada ao agitador de placas por 30 minutos e em seguida, foi realizada a leitura em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm. Cada experimento foi realizado em triplicata e com três repetições independentes. Os resultados foram expressos pela concentração inibitória do crescimento do parasito em 50% (IC₅₀). Como drogas de referência foram utilizadas a Anfotericina B e o Glucantime[®].

5.7 Atividade do extrato de *M. citrifolia* contra formas amastigotas

Para avaliação da atividade contra amastigota, 100 µL cultura de amastigotas axenico de *L. amazonensis* obtidos da transformação de formas infectivas de promastigota (TEIXEIRA et al, 2002) foram pipetados para poços da placa de 96 poços. Em cada poço com amastigota foi adicionado 100 µL da solução de extrato de *M. citrifolia* nas concentrações 960–7,5 µg/mL. A placa foi mantida em estufa a 32 °C. A viabilidade das formas amastigotas foi mensurada no final dos intervalos 24, 48 e 72 horas através de ensaio colorimétrico MTT (FERREIRA et al., 2010). Cada experimento foi realizado em triplicata e com três repetições independentes. Os resultados foram expressos pela concentração inibitória do crescimento do parasito em 50% (IC₅₀). Anfotericina B e Glucantime[®] foram usados como drogas de referência.

5.8 Atividade contra formas amastigotas intracelulares em macrófagos

Macrófagos J774.G8 foram cultivados em placas de 24 poços, contendo lamínulas, numa densidade de 10⁵ células/poço, infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase exponencial, em proporção 10:1 (parasito/macrófago) e incubados a 37 °C em 5% de CO₂. Após 24 horas, cada poço foi lavado 3 vezes com PBS estéril para remoção dos parasitos não

internalizados. Posteriormente, foram adicionadas diferentes concentrações do extrato de *M. citrifolia* (480–30 µg/mL) nos poços em triplicata e incubados por 24 horas. As lamínulas com as células aderidas foram lavadas 2 vezes em PBS, fixadas em solução de Bouin por 5 minutos, lavadas 2 vezes com álcool 70%, por 30 minutos, para remoção do excesso do fixador e lavadas com água destilada. As lamínulas foram coradas pelo Giemsa por 50 minutos e lavadas em água destilada. Posteriormente foram desidratadas, diafanizadas, montadas e examinadas no microscópio de luz. Foram contados 100 macrófagos por poço para o cálculo da porcentagem do número de amastigotas. A porcentagem de inibição foi calculada usando a fórmula descrita por Guru et al. (1989).

5.9 Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* do extrato de *M. citrifolia* foi realizada através do ensaio colorimétrico baseado no conteúdo de proteína total. As células J774.G8 cultivadas em DMEM foram pipetadas para placas de 96 poços numa densidade de 10^4 células por 100µL. Após 24 horas de incubação a 37 °C em 5% CO₂, o meio de cada poço foi retirado e adicionado meio sem suplemento com diferentes diluições do extrato de *M. citrifolia* e incubada novamente. Como controle, foram mantidos poços somente com células. Após o intervalo de 24 horas, as culturas foram fixadas com ácido tricloroacético a 10% por 1 hora a 4°C, coradas por 30 minutos com solução 0,4% de sulforhodamina B (Sigma, USA) em 1% de ácido acético e em seguida lavadas com solução 1% de ácido acético. O SRB foi então solubilizado em 200µL de solução 10mM de tris-base não padronizada após agitação por 5 minutos e leitura com comprimento de onda de 540nm. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem, sendo determinada a CC₅₀, concentração que inibe 50% do crescimento celular, com o programa GraphPad Prism 5.

5.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para microscopia eletrônica de transmissão, formas promastigota de *L. amazonensis* foram tratadas com extrato bruto de *M. citrifolia* nas

concentrações 240, 120, 60, 30µg/mL por 24 horas. Após este período, foram fixadas com 2,5% de gluteraldeído (Sigma, USA) em solução tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 overnight. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com tampão cacodilato 0,1M e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato 0,1M por 30 minutos. Os parasitos pós-fixadas foram desidratados em acetona e emblocados em Epon. Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas no microscópio de transmissão eletrônica JEM-1011 (JEOL, Japan).

5.11 Análise estatística

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), seguida pelo Teste de Tukey. As análises foram feitas com o software GraphPad Prism 5.0.4 (GraphPad Software Inc.). Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Obtenção do extrato bruto liofilizado do fruto e prospecção fitoquímica

O extrato resultante do processo de liberação natural de líquido do fruto maduro apresentou-se como um líquido de coloração marrom escuro, translúcido, de viscosidade média e odor bem mais suave do que a do fruto *in natura*. O pH verificado foi de 3,94. O liofilizado, de cor marrom e odor suave característico, apresentou-se como uma mistura amorfa altamente higroscópica. O rendimento médio do extrato, a partir do peso do fruto íntegro até o processo de liofilização, foi de 6,31%.

Na Tabela 1 estão os resultados da prospecção fitoquímica realizados com o material liofilizado.

Tabela 1 – Prospecção fitoquímica do extrato bruto liofilizado do fruto de *Morinda citrifolia*.

Classe de constituintes químicos	Reações	Resultados*
Antraquinonas	NaOH	+
Flavonóides	AlCl ₃	+
Alcalóides	Mayer	+
	Bouchardat	+
	Hager	+
Triterpenos e esteróides	Anidrido acético e ácido sulfúrico	+
Saponinas	Índice de espuma	+
Cumarinas	KOH	+
Substâncias fenólicas	FeCl ₃	+
Taninos	Gelatina	+
Antocianidinas	HCl	+
	NaOH	+
Chalconas	HCl	+
	NaOH	-

*: (+) presença; (-) ausência.

6.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD-ELSD)

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD-ELSD do extrato bruto liofilizado do fruto de *M. citrifolia* encontram-se representados nas figuras 3 e 4 (DAD) e na figura 5 (ELSD). Os dados de tempo de retenção, área e área percentual dos sinais dos cromatogramas 3, 4 e 5 encontram-se nos Apêndices A, B e C. As figuras 6 e 7 apresentam os espectros na região do UV dos sinais presentes nos cromatogramas obtidos pelo DAD.

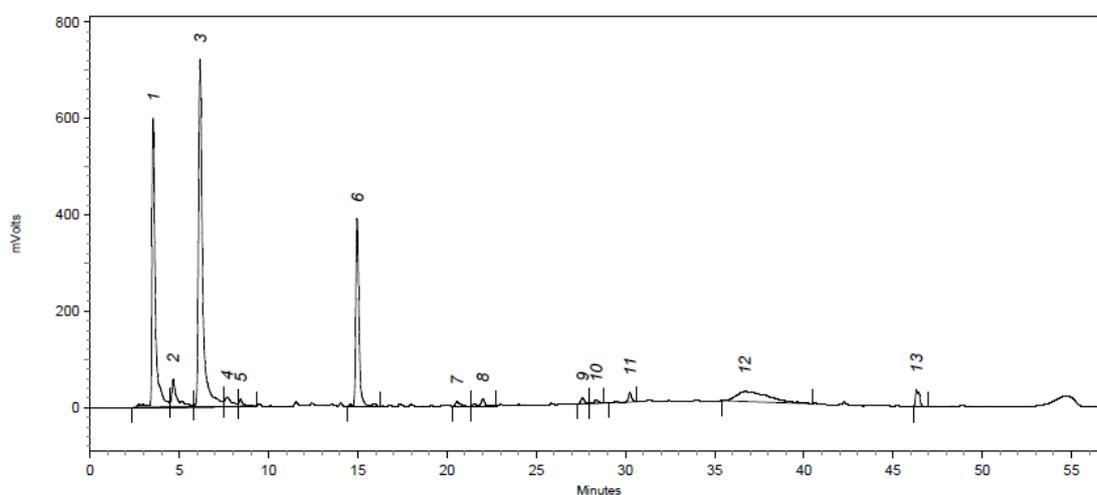


Figura 3 – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de *M. citrifolia* dissolvido em água (5 mg.mL^{-1}) obtido por CLAE-DAD monitorado no comprimento de onda de 240 nm.

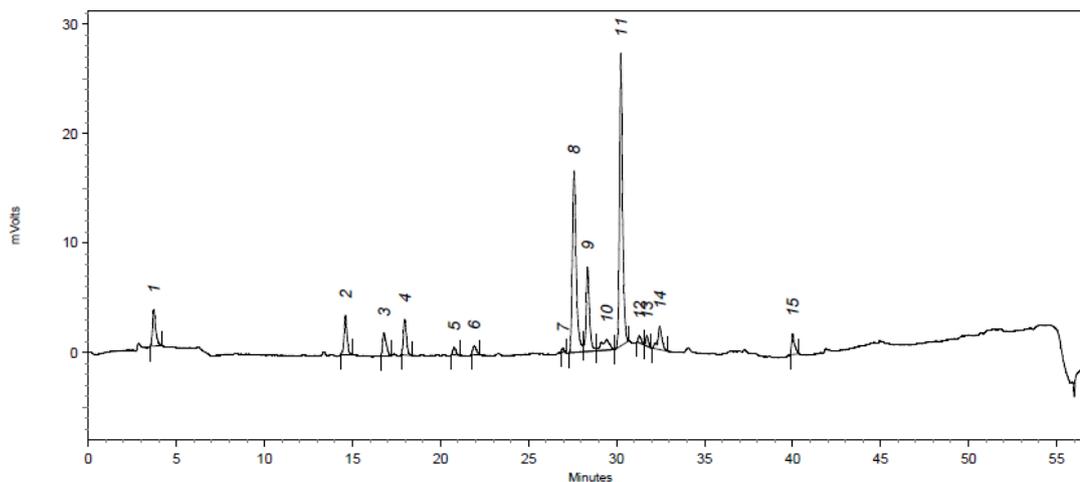


Figura 4 – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de *M. citrifolia* dissolvido em água (5 mg.mL^{-1}) obtido por CLAE-DAD monitorado no comprimento de onda de 360 nm.

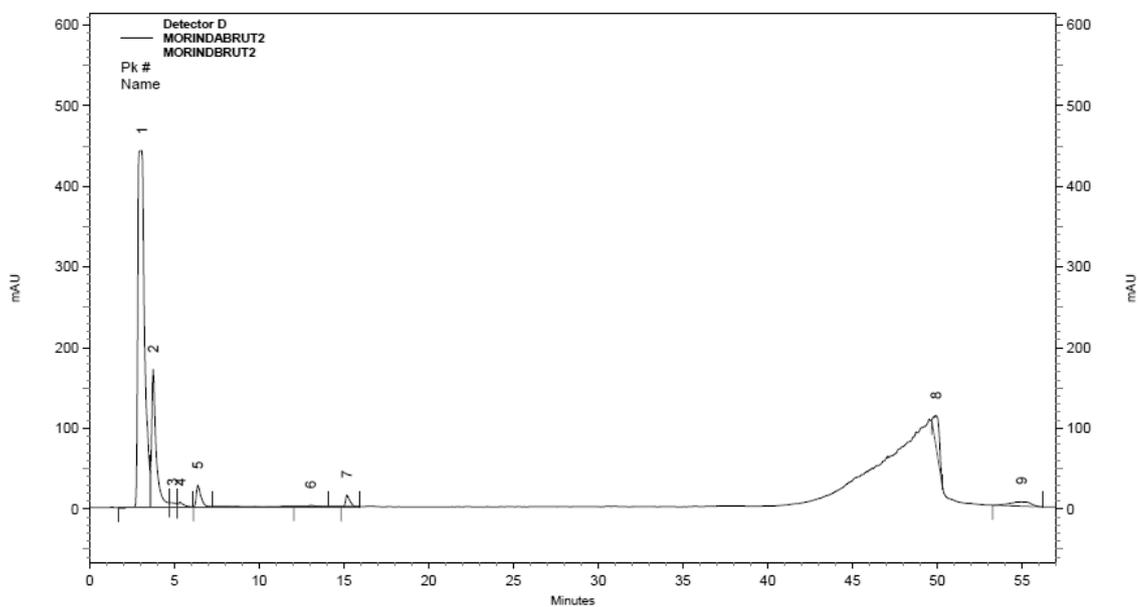


Figura 5 – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de *M. citrifolia* dissolvido em água (5 mg.mL^{-1}) obtido por CLAE-ELSD.

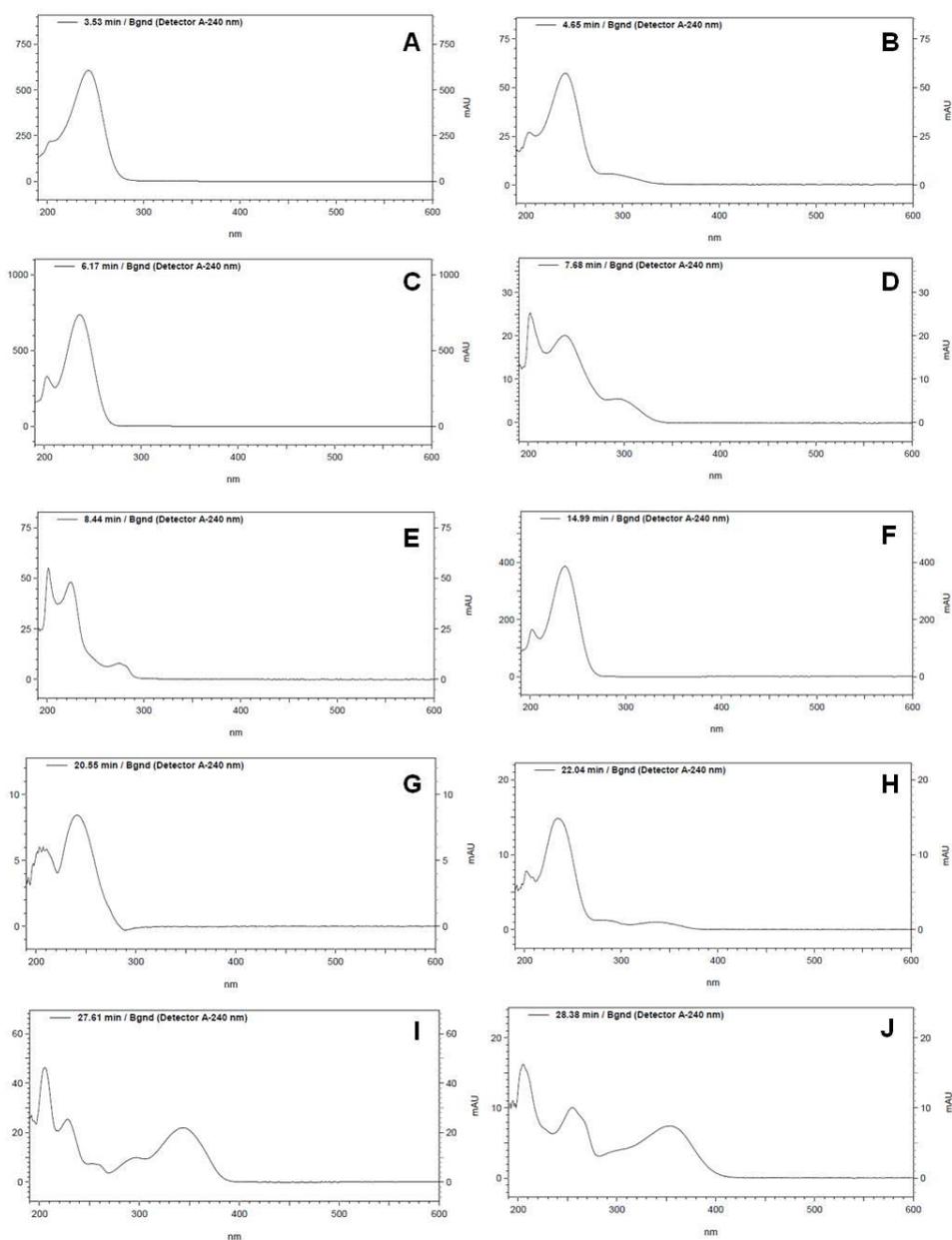


Figura 6 – Espectros no UV relativos aos picos obtidos no cromatograma do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*, λ : 240nm. Espectro **A**, relativo ao pico 1, t_R = 3.53 minutos. Espectro **B**, relativo ao pico 2, t_R = 4.65 minutos. Espectro **C**, relativo ao pico 3, t_R = 6.17 minutos. Espectro **D**, relativo ao pico 4, t_R = 7.68 minutos. Espectro **E**, relativo ao pico 5, t_R = 8.44 minutos. Espectro **F**, relativo ao pico 6, t_R = 14.99 minutos. Espectro **G**, relativo ao pico 7, t_R = 20.55 minutos. Espectro **H**, relativo ao pico 8, t_R = 22.04 minutos. Espectro **I**, relativo ao pico 9, t_R = 27.61 minutos. Espectro **J**, relativo ao pico 10, t_R = 28.38 minutos.

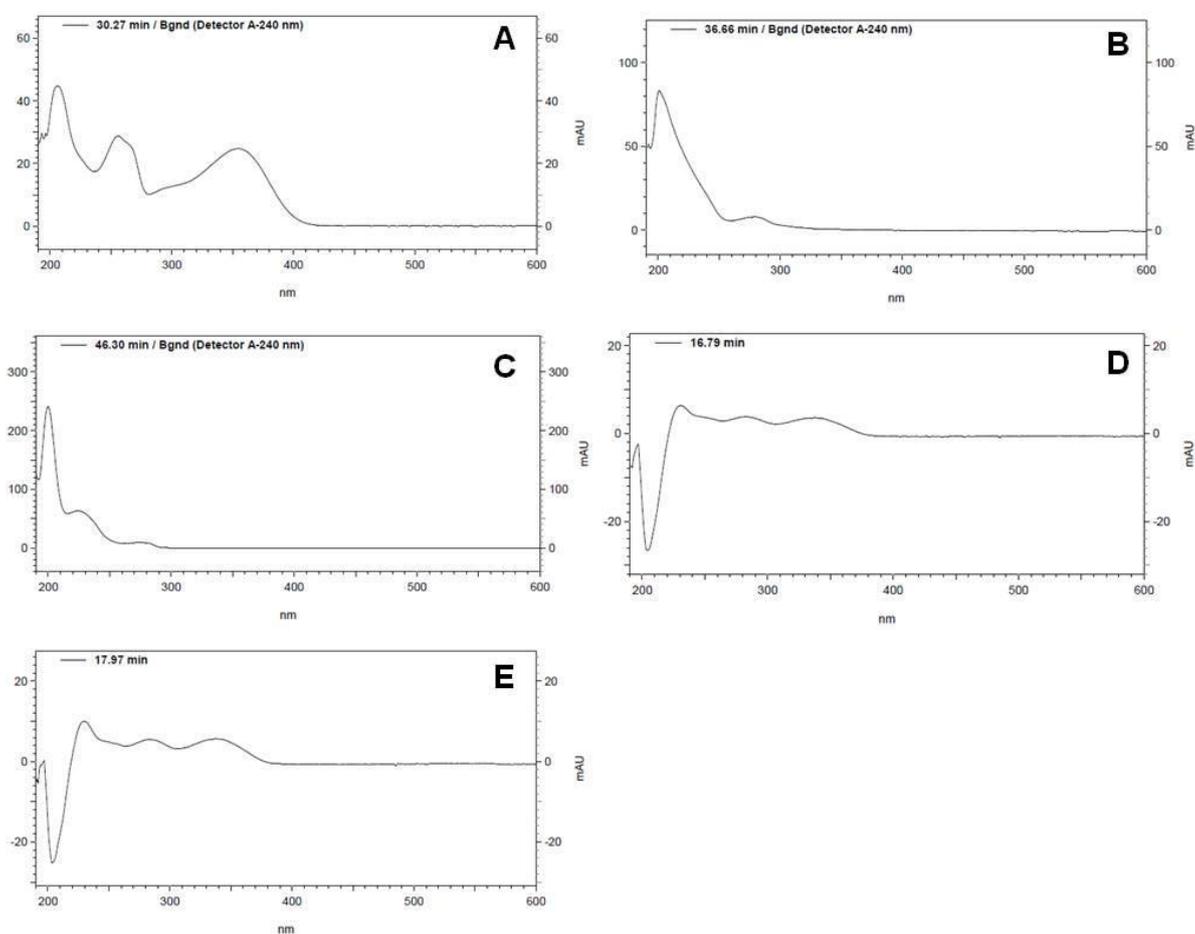


Figura 7 – Espectros no UV relativos aos picos obtidos nos cromatogramas do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*. (A-C) comprimento de onda 240 nm. (D-E) comprimento de onda 360 nm. Espectro A, relativo ao pico 11, $t_R = 30.27$ minutos. Espectro B, relativo ao pico 12, $t_R = 36.66$ minutos. Espectro C, relativo ao pico 13, $t_R = 46.30$ minutos. Espectro D, relativo ao pico 3, $t_R = 16.53$ minutos. Espectro E, relativo ao pico 11, $t_R = 17.97$ minutos.

6.3 Atividade do extrato de *M. citrifolia* contra promastigota, amastigota axênico e amastigota intracelular

A atividade leishmanicida contra promastigota e amastigota axênico foi realizada por meio do ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT. A atividade do extrato nos tempos de 24, 48 e 72 horas, encontra-se representada nas figuras 8 e 9.

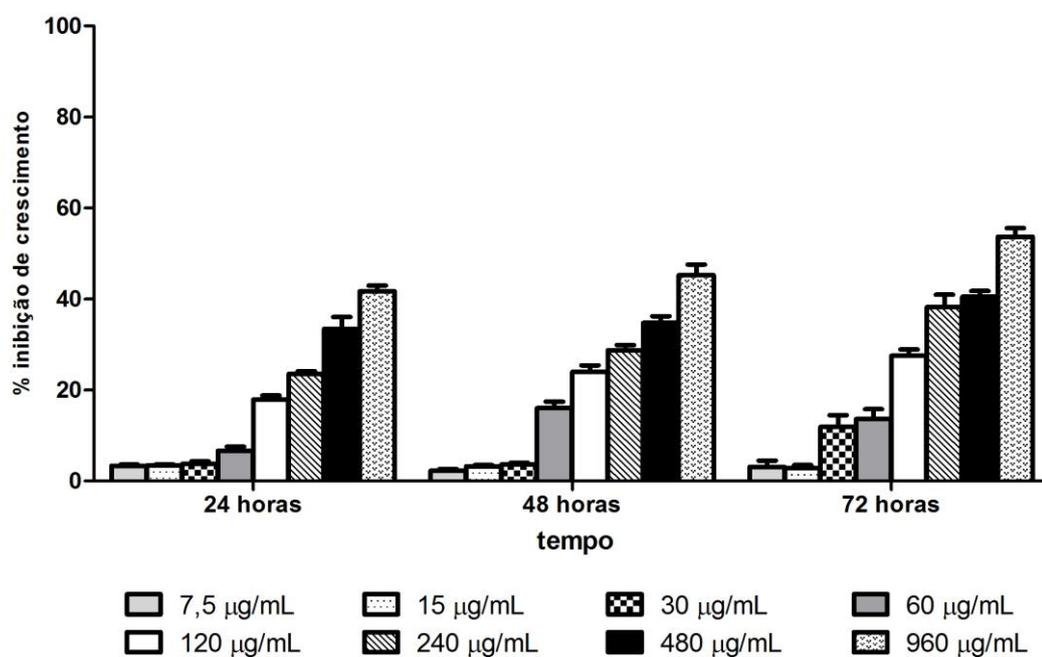


Figura 8 – Gráfico da inibição de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio Schneider, a 26°C, e tratadas com extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* nas concentrações de 7,5 a 960 µg/mL. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

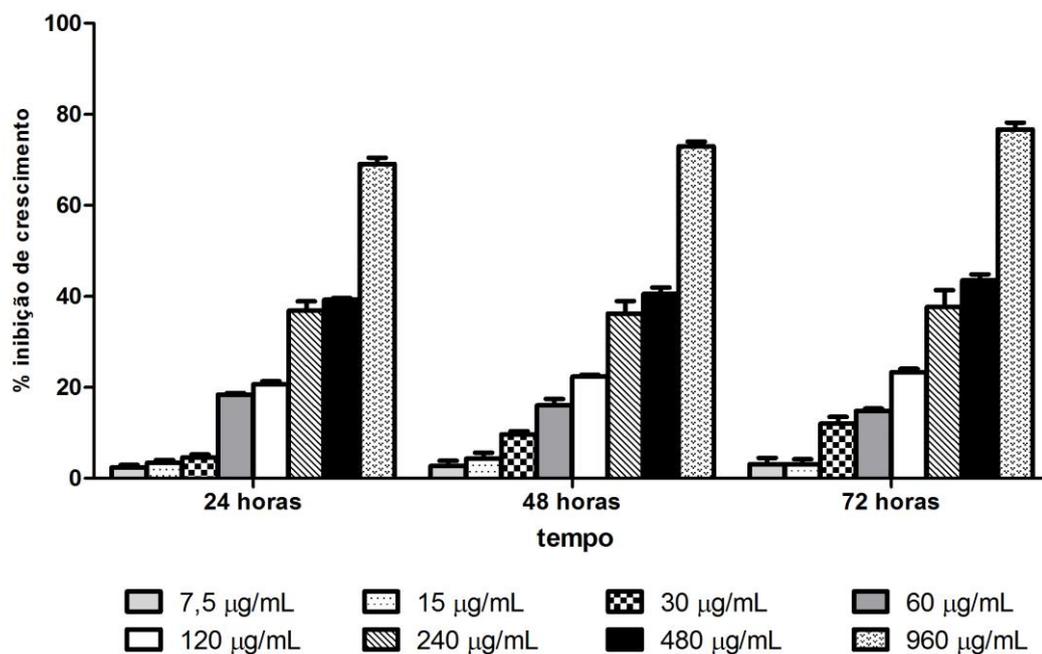


Figura 9 – Gráfico da inibição de formas amastigotas axenico de *L. amazonensis* cultivadas em meio Schneider's Insect modificado, a 32°C, e tratadas com extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* nas concentrações de 7,5 a 960 µg/mL. Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

O efeito do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* sobre as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis* foi monitorado durante três dias consecutivos. Observando as figuras 8 e 9, é possível verificar que os resultados de inibição de crescimento não diferem de maneira estatisticamente significativa quanto ao tempo de tratamento para nenhuma das formas.

O extrato produziu uma redução dose-dependente na proliferação do parasito, com inibição do crescimento de 50 % das formas promastigotas de 275,3µg/mL e da formas amastigotas axenico de 214,9µg/mL (Tabela 2). Entre as drogas de referência utilizadas, o Glucantime® provocou a redução de 50% do número de promastigotas viáveis a uma concentração de 199,5 µg/mL, enquanto o mesmo resultado foi obtido com 3,36 µg/mL da Anfotericina B, coforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração inibitória de 50% do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*, Glucantime[®] e Anfotericina B em formas promastigota e amastigota axênico de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento.

Compostos	Formas	
	promastigota µg/mL	amastigota axenico µg/mL
Extrato fruto <i>M. citrifolia</i>	275,3 ± 0.037	214,9 ± 0,090
Glucantime [®]	199,5 ± 0,371	173,9 ± 0,097
Anfotericina B	3,3 ± 0,422	3,0 ± 0,265

Os valores representam média ± desvio padrão.

A atividade leishmanicida do extrato em culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, assim como em promastigotas e amastigotas axênicos, é dose-dependente, como mostra a Figura 10. Em 24 horas de tratamento das células infectadas, a concentração inibitória de 50% dos parasitas internalizados foi de 208,4µg/mL.

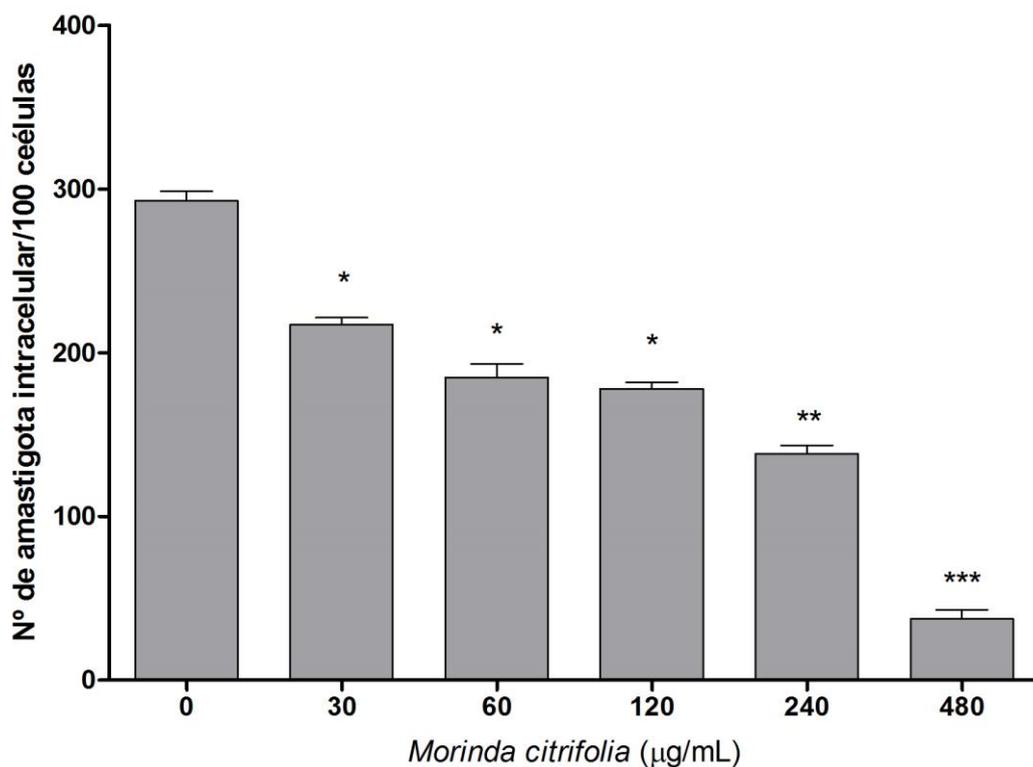


Figura 10 – Gráfico do efeito do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* em amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas em macrófagos de linhagem J774.G8. Comparação com o grupo controle pelo teste de Tukey. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

6.4 Citotoxicidade celular *in vitro*

Foram realizados testes de citotoxicidade celular *in vitro* com macrófagos de linhagem J774.G8 por meio do ensaio colorimétrico Sulforhodamina B. O período de contato entre as células e o extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* foi de 24 horas. Foram realizados cinco experimentos independentes em triplicata e em todos não foi observada ação citotóxica nas concentrações analisadas (2000 – 3,9µg/mL). Dessa forma, não foi possível determinar o valor da CC_{50} .

6.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise da microscopia eletrônica de transmissão das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas e não tratadas com o extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* foi realizada para determinar as mudanças ultraestruturais causadas pelo extrato. As concentrações de extrato utilizadas foram de 240, 120, 60, 30µg/mL. As fotomicrografias das formas promastigotas mostram o grau dos danos após 24 horas de tratamento, e estão representadas nas figuras 11 12 e 13.

Na concentração de 30µg/mL, a forma promastigota apresenta em seu citoplasma vacúolos, alguns com região elétron-densa em sua delimitação (Figura 11 B). Com o tratamento de 60µg/mL foi observada a presença de vacúolos no citoplasma das formas promastigotas, além de vesículas na bolsa flagelar (Figura 11 C) e dilatação da membrana nuclear externa (Figura 11 D). Com 120µg/mL do extrato observam-se mais vacúolos no citoplasma, vesículas na bolsa flagelar e algumas estruturas elétron-densas de grande volume presentes no citoplasma (Figura 12 A e 12 B). O aumento da concentração do extrato para 240µg/mL provocou aumento considerável do número de vacúolos (Figura 13 A). As estruturas elétron-densas, de grande volume, também aumentaram de número (Figura 13 B), sendo encontradas também junto ao complexo de Golgi (Figura 13 C). A bolsa flagelar aumentada de volume apresentou material membranoso e elétron-denso em seu interior (Figura 13 D).

Não foram observadas alterações no núcleo, na mitocôndria, no cinetoplasto e no flagelo, assim como nos microtúbulos subpelícuas. Os parasitos sem tratamento também apresentaram a morfologia normal (Figura 11 A).

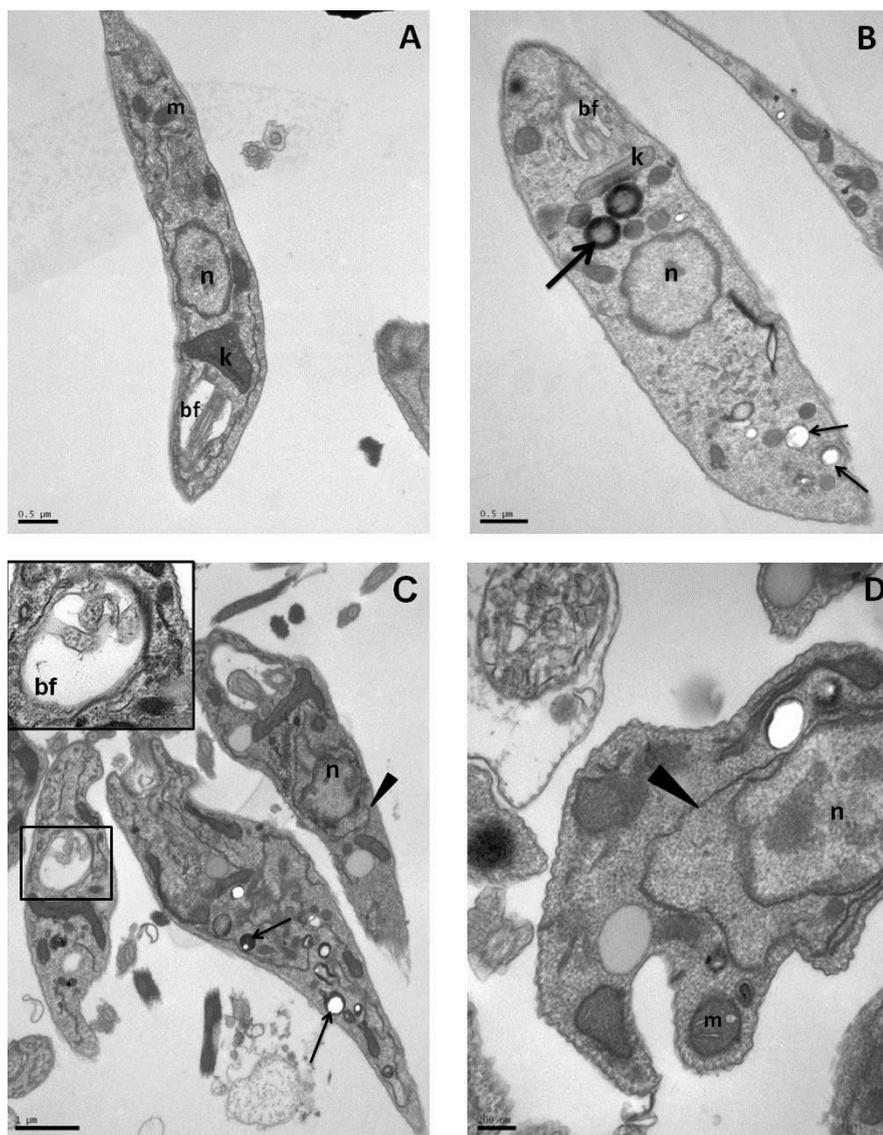


Figura 11 – Efeito do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* na ultraestrutura de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio Schneider e incubadas durante 24 horas a 26°C em diferentes concentrações do extrato; (A) promastigota do grupo controle com corpo alongado característico e morfologia normal; (B-D) promastigotas tratadas com extrato do fruto de *M. citrifolia* nas concentrações 30 µg/mL (B), 60 µg/mL (C) e 120 µg/mL (D). (B) Vacúolos atípicos (*setas menores*) e vacúolo com região elétron-densa em seu interior (*seta maior*) presentes no citoplasma. (C) Vacúolos atípicos no citoplasma (*setas*), membrana externa nuclear dilatada com material granular (*cabeça de seta*), aumento mostrando membranas e vesículas no interior da bolsa flagelar (*inserção*). (D) Detalhe de membrana nuclear externa dilatada com presença de material granular (*cabeça de seta*) e vacúolos no citoplasma (*setas*). *k* – cinetoplasto, *m* – mitocôndria, *n* – núcleo, *bf* – bolsa flagelar.

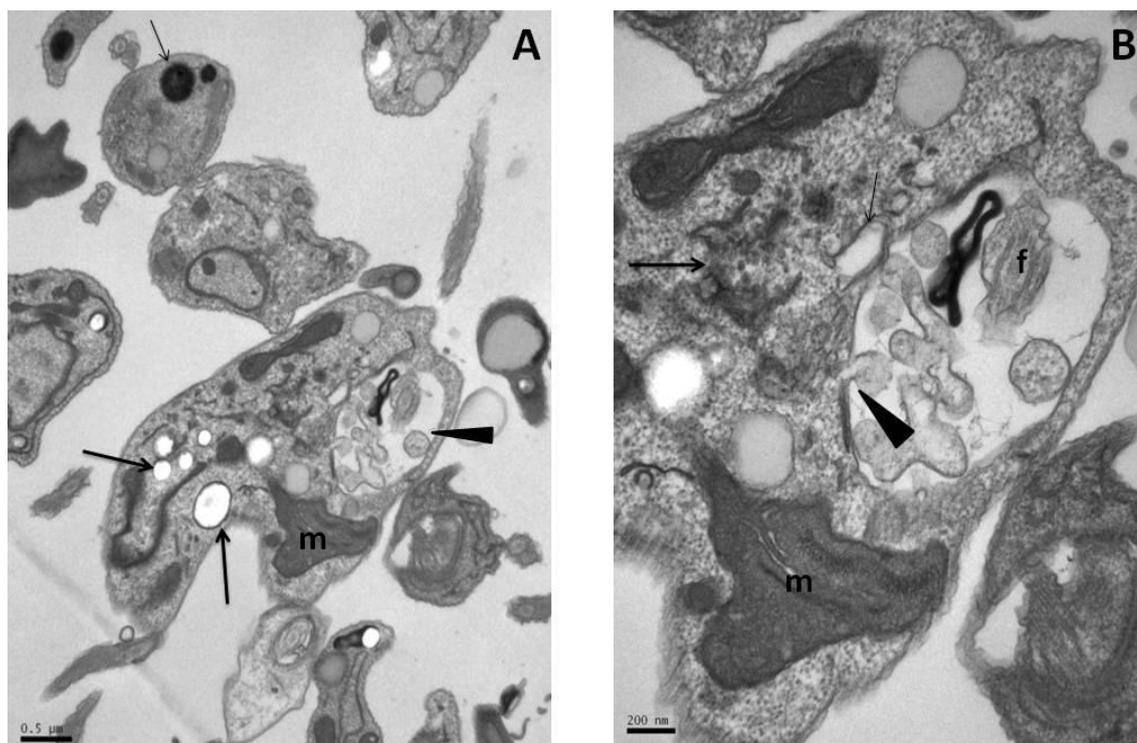


Figura 12 - Efeito do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* na ultraestrutura de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio Schneider e incubadas durante 24 horas a 26°C em diferentes concentrações do extrato; (A-B) promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com extrato de *M. citrifolia* na concentração de 120 µg/mL. (A) Vacúolos atípicos (*setas maiores*); e estrutura elétron-densa no citoplasma (*seta menor*); bolsa flagelar com aumento de volume, membranas e estrutura elétron-densa em seu interior (*cabeça de seta*). (B) Detalhe de vesícula presente na bolsa flagelar (*cabeça de seta*), retículo endoplasmático (*seta maior*) e vacúolo próximo a bolsa flagelar (*seta menor*). *m* – mitocôndria, *f* – flagelo.

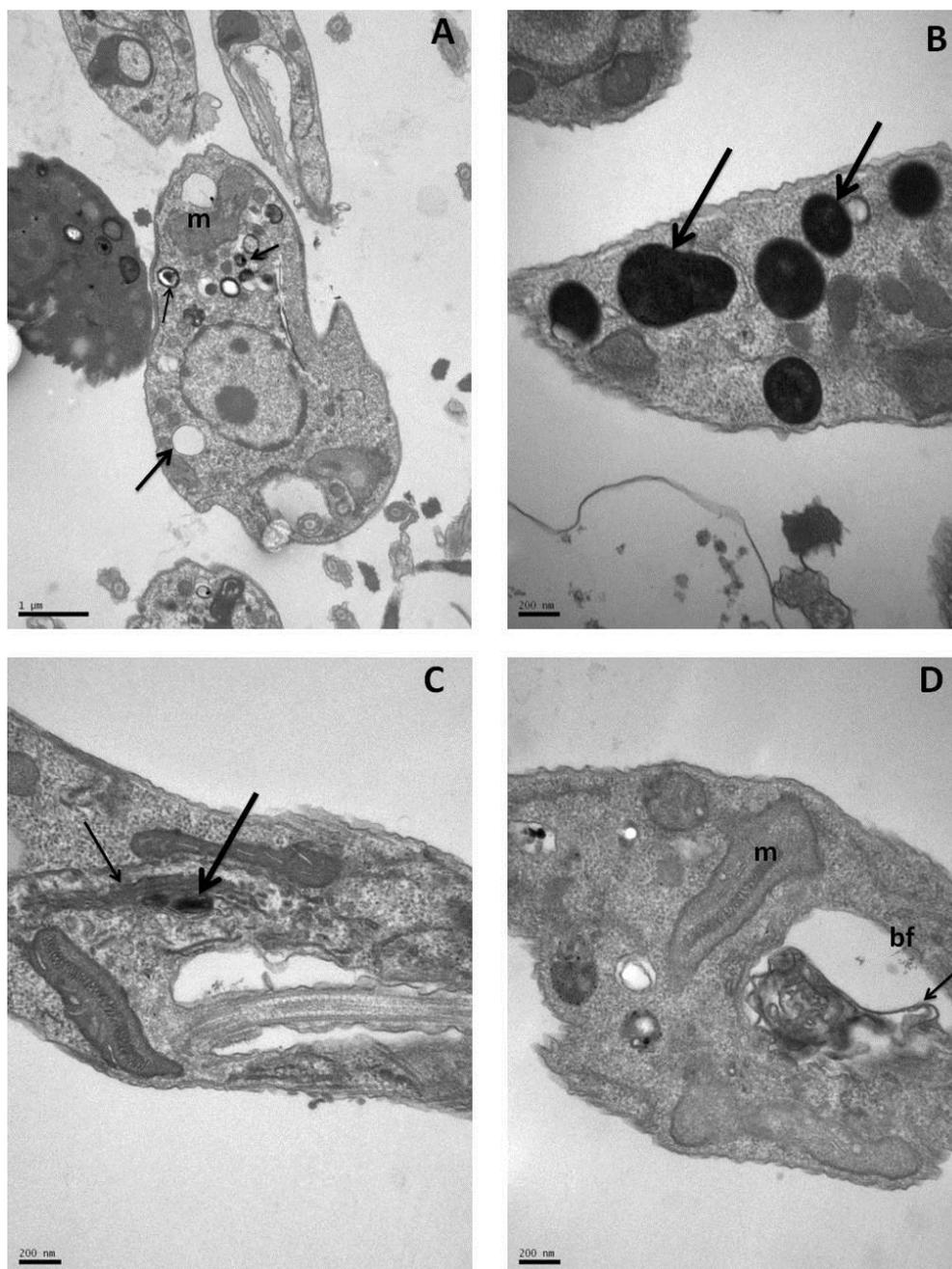


Figura 13 – Efeito do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* na ultraestrutura de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio Schneider e incubadas durante 24 horas a 26°C em diferentes concentrações do extrato; (A-D) promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com extrato de *M. citrifolia* na concentração de 240 µg/mL. (A) Vacúolos presentes no citoplasma (*setas*). (B) Estruturas elétron-densas presentes no citoplasma (*setas*). (C) Estrutura elétron-densa (*seta maior*) e Complexo de Golgi (*seta menor*). (D) Aumento de volume da bolsa flagelar com membranas em seu interior (*seta*). *k* – cinetoplasto, *m* – mitocôndria, *n* – núcleo, *bf* –bolsa flagelar.

7 DISCUSSÃO

Na busca de novos tratamentos para leishmaniose, a pesquisa de substâncias ativas presentes em extratos vegetais tem se mostrado bastante promissora. A *M. citrifolia* possui conhecidas propriedades antiinflamatórias, antitumorais e antioxidantes, e também apresenta bom desempenho frente a microorganismos, apresentando ação bactericida, antiviral e fungicida. Estas propriedades são determinadas pela presença de substâncias ativas que também podem apresentar atividade leishmanicida, o que nos levou a pesquisar a ação anti-leishmânia do extrato bruto de *M. citrifolia*.

Na prospecção fitoquímica preliminar foram identificadas as principais classes de constituintes químicos presentes no extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*. Apesar das reações das análises fitoquímicas apresentarem inúmeras interferências, constituindo-se uma análise de triagem, os resultados confirmaram a presença de substâncias no extrato que já foram descritas na literatura (LEVAND & LARSON, 1979; LAVAUT & LAVAUT, 2003; YANG et al., 2010).

O extrato de *M. citrifolia* possui diferentes constituintes químicos conhecidos, e dentre estes estão substâncias com absorção na região do UV e outras com pouca ou nenhuma absorção no UV (terpenos e alguns polissacarídeos). Dessa forma, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodo e detector evaporativo de espalhamento de luz, para a identificação dos constituintes majoritários do extrato.

A cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos é cada vez mais empregada e cumpre bem as funções de caracterizar por meio do espectro UV característico a classe química de alguns componentes da amostras. No caso do detector evaporativo de espalhamento de luz não há necessidade de constituintes cromóforos, respondendo com eficiência ao fluxo de massa dos analitos não voláteis. Esse detector pode fornecer informações

de componentes da amostra que os detectores de UV perdem, e mostrar uma maior precisão do perfil da abundância relativa de um componente (SOARES, 2001).

Comparando o perfil cromatográfico obtido com o detector evaporativo de espalhamento de luz e os obtidos com o DAD, nas mesmas condições de eluição, foi verificada a presença de sinais de melhor sensibilidade no primeiro do que no segundo indicando a presença de substâncias com baixa absorção na região do UV. De acordo com o descrito na literatura, os primeiros sinais podem estar relacionados aos polissacarídeos presentes nessa espécie botânica e aos quais foram atribuídas várias atividades farmacológicas (WANG, et al., 2009) Os demais podem estar associados a terpenos sem conjugação ou baixa absorção no UV. A intensidade dos sinais, com alta área relativa, mostrou que a massa dessas substâncias presentes no extrato bruto é representativa, assim como a importância do uso de mais de um detector na elaboração do perfil cromatográfico de extratos de produtos naturais ativos.

A classificação dos espectros de acordo com a classe química foi realizada de acordo com Mabry et al. (1970). De acordo com os cromatogramas, na região UV, as substâncias majoritárias apresentaram espectros característicos de constituintes aromáticos e fenólicos. Os sinais menos intensos foram associados por meio de seus espectros característicos a flavonóides e antraquinonas.

Estudos anteriores já revelaram a atividade leishmanicida de alcalóides, como a voacangina e coronaridina (SOARES, et al., 2007); antraquinonas e cumarinas (FERREIRA et al, 2010), e terpenos (ARRUDA et al., 2009). Em taninos, observa-se atividade principalmente sobre macrófagos infectados, no qual 67 taninos foram avaliados com IC₅₀ variando de 1 a 250 µg/mL (KOLODZIEJ & KINDERLEN, 2005).

A presença dessas substâncias demonstra o provável potencial químico do extrato frente a protozoários como os do gênero *Leishmania*. Este potencial foi comprovado por meio dos ensaios *in vitro* de atividade leishmanicida do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* contra *L. amazonensis*. Foram realizados ensaios contra promastigota, amastigota axênico e amastigota intracelular.

Os ensaios *in vitro* de atividade contra promastigota e amastigota axênico, foram realizados por meio do ensaio colorimétrico baseado na redução do MTT, inicialmente descrito por Mosmann (1983). Este ensaio, amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células, tem sua metodologia confirmada pela literatura como a mais adequada para a avaliação da atividade antiparasitária de medicamentos, substituindo a tradicional contagem manual baseada na motilidade dos parasitos (FERREIRA, et al, 2010; GUPTA et al., 2010).

O MTT é um sal tetrazólico de cor amarelo ouro que, quando incubado com células vivas, é reduzido pela enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias, formando cristais de formazan. Estes cristais de cor violeta e baixa solubilidade são posteriormente solubilizados pela adição de DMSO. A variação de coloração é diretamente proporcional a atividade mitocondrial, e é medida em leitor de ELISA, o que o torna um método colorimétrico rápido e sensível (MOSMANN, 1983).

A atividade contra formas promastigotas do extrato bruto do fruto de *M citrifolia* revelou IC₅₀ de 275,3µg/mL para tratamento de 72 horas. Os valores são elevados quando comparados com os da Anfotericina B, que apresentou mesma atividade com 3,3 µg/mL para promastigota. Entretanto, este resultado é comparável ao resultado obtido com o Glucantime[®], que apresentou IC₅₀ de 199,5 µg/mL.

Considerando-se que a substância analisada é um extrato bruto de fruto, com os compostos ativos juntos a um grande número de componentes

inativos, os valores são considerados razoáveis, quando comparados com outros extratos brutos. O extrato bruto do fruto de *Momordica charantia*, o popular melão-de-são-caetano, por exemplo, um dos poucos extratos brutos de fruto avaliados contra leishmânia, em estudo realizado por Gupta et al. (2010) na Índia, apresentou concentração inibitória *in vitro* de 50% das formas promastigotas de *L. donovani* de 600 µg/mL.

Os resultados da atividade leishmanicida para as formas amastigotas axênico, obtidas a partir da transformação de cultivo de promastigotas, apresentaram valores menores que os resultados contra promastigota, tanto pra o extrato como para as drogas de referência.

As diferenças entre as formas promastigota e amastigota não são apenas morfológica. Estudos mostram que há diferenças metabólicas entre as duas formas. As formas amastigotas, quando mantidas em cultivo *in vitro*, apresentam consumo maior de ácidos graxos do meio de cultura do que as promastigotas na fase logarítmica de crescimento (BERMAN, 1998). Essas diferenças entre as formas podem explicar o motivo de determinadas substâncias serem mais ativas contra uma forma e menos ativa contra outra.

Embora a atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas seja utilizada por muitos pesquisadores como um ensaio de triagem para a busca de novas drogas para o tratamento da leishmaniose, o resultado positivo obtido neste teste não pode ser considerado como único indicativo de ação da droga. É necessário que esta seja ativa principalmente contra as formas amastigotas, e mesmo apresentando atividade em cultivo axenico de formas amastigotas *in vitro*, a eficácia da droga ainda não está garantida. As formas amastigotas encontram-se nos vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados, e a droga só será eficaz contra *Leishmania* spp se for capaz de atravessar a membrana da célula hospedeira e atuar sobre a amastigota no interior do vacúolo. Dessa forma, o ensaio de atividade contra

amastigota intracelular é a forma mais eficaz de relacionar a atividade *in vitro* de uma possível substância com a sua efetividade no tratamento *in vivo*.

Para avaliar a atividade do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* em amastigotas intracelulares, macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram tratados por 24 horas com diferentes concentrações do extrato com os resultados representados na Figura 10. Observa-se um aumento da atividade do extrato contra amastigota intracelular, com valor de IC₅₀, para 208.4µg/mL.

A diferença de atividade contra culturas puras de formas de leishmânias para culturas mistas com formas intracelulares pode estar associada a vários aspectos, mas principalmente ao mecanismo de ação da substância em estudo, que pode ser por ação direta no parasito ou por ação indireta, através da ativação de mecanismos celulares.

Para agir diretamente no parasito, algumas substâncias precisam ser concentradas pelo macrófago, por apresentarem baixa atividade contra formas promastigotas. Outras, para se tornarem ativas, precisam ser metabolizadas pelo hospedeiro antes de atuarem no parasito. Estas substâncias são conhecidas como pró-drogas. Um exemplo clássico de pró-droga são os antimoniais pentavalentes, que para se tornarem ativos precisam entrar na célula do hospedeiro, ser convertidos em antimoniais trivalentes, cruzarem a membrana fagolisossômica, para somente então atuarem sobre as formas amastigotas (SILVA et al., 2008).

Uma droga pode agir ainda de forma indireta, por meio de mecanismos de ativação de macrófagos, como aumento de produção de citocinas, principalmente INF-γ, e aumento da liberação de óxido nítrico. O NO possui um potente efeito microbicida enquanto o INF-γ é considerado a principal citocina que participa da resposta imunológica do hospedeiro contra as leishmânias, ativando mecanismos microbicidas dependentes e independentes de oxigênio.

O papel imunomodulador da *M. citrifolia* foi demonstrado por diversos trabalhos, como pela diminuição da produção de IL-4 e aumento da produção de INF- γ , TNF- α , IL-1 β e NO (HIRAZUMI & FURUSAWA, 1999; PALU et al., 2008b). Componentes do extrato bruto identificados pelo estudo fitoquímico também indicaram a presença de substâncias imunomoduladoras como os taninos, que demonstraram atividade sobre as formas amastigotas em macrófagos com estimulação da produção de NO, IL-1, IL-12, INF- γ e TNF- α (KOLODZIEJ & KINDERLEN, 2005).

Os resultados da atividade contra promastigota, e amastigota axênico revelam a ação direta do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* sobre o parasito. Contudo, os resultados excelentes obtidos na atividade contra amastigota intracelular, em conjunto com a presença da classe de substâncias imunomoduladoras identificadas no extrato por meio das análises fitoquímicas e cromatográficas, pode ser resultado da ação do extrato pela ativação de mecanismos de ativação de macrófagos, o que deve ser mais aprofundado em pesquisas posteriores.

Para assegurar a seletividade do extrato do fruto de *M. citrifolia* em atuar apenas nas formas amastigotas intracelulares, sem causar danos à célula hospedeira, foi investigada a citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774.G8 por meio do método da Sulforhodamina B. Este método colorimétrico, originalmente desenvolvido por Skehan et al. (1990), é baseado na quantificação de proteína total através da ligação eletrostática do cristal aniônico SRB com as proteínas celulares.

Foram realizados cinco ensaios independentes em triplicata e não foi observada citotoxicidade nas concentrações analisadas demonstrando a baixa citotoxicidade do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia*. Este resultado indica que o extrato pode se difundir através das membranas biológicas e ser citotóxico apenas para os parasitos intracelulares, e não para a célula hospedeira.

A análise ultraestrutural revelou que a concentração de extrato de 480 µg/mL, concentração inibitória de 50% das formas promastigotas para 24 horas de tratamento, induziu a danos celulares severos que se traduzia principalmente em extravasamento de conteúdo citoplasmático, evidenciando que o extrato tem ação direta sobre os parasitos mesmo em baixa concentração. Na análise em microscópio invertido, observou-se que em 30 minutos o extrato provocava paralisação flagelar, o que pode explicar as alterações ultraestruturais observadas no tratamento de 24 horas.

A observação das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o extrato mostrou a intensa vacuolização do citoplasma, que se torna mais evidente com o aumento da concentração. Alterações estruturais similares também foram descritas em *Trypanosoma cruzi* e *L. amazonensis* tratados com óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2009). Nestes, os vacúolos estão associados a entrada de substâncias por difusão simples, provocada pelo aumento da permeabilidade da membrana provocada pelos compostos do óleo.

A progressão das alterações ultraestruturais de acordo com o aumento da concentração da droga também foi descrita por Santin et al. (2009), que da mesma forma verificou a destruição do parasito em concentrações maiores.

Em conjunto ao aumento do número de vacúolos, as promastigotas também apresentaram alterações em membranas internas, como a dilatação da membrana nuclear externa, e do complexo de Golgi, com estrutura elétron-densa.

Com o aumento da concentração do extrato, além dos vacúolos, observam-se numerosas e volumosas inclusões lipídicas citoplasmáticas, com conteúdo elétron-denso, delimitadas por uma camada simples de fosfolipídios. Estas inclusões podem ser resultado do acúmulo de precursores de lipídios devido a interferência direta de componentes do extrato sobre vias de biossíntese lipídica (OLIVEIRA et al., 2009).

Uma importante alteração nas promastigotas tratadas foi o aumento de tamanho da bolsa flagelar, com a presença de membranas, por vezes elétron-densas, e vesículas em seu interior. Brenzan et al., (2007) relataram alterações semelhantes ao avaliarem a atividade do extrato bruto e cumarinas de folhas de *Calophyllum brasiliense* contra *L. amazonensis*. Esses achados indicam uma intensa atividade exocítica na região da bolsa flagelar. Estas alterações também foram relatadas em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com inibidores de síntese de ergosterol como o 22-26 azasterol (RODRIGUES et al., 2002).

O aumento da atividade exocítica na região da bolsa flagelar pode ser o resultado da secreção de lipídios anormais, que se acumulam como consequência da ação da droga ou indicam um processo de exacerbação da produção de proteínas pelas células como tentativa de sobrevivência (TIUMAN et al., 2005).

8 CONCLUSÕES

O extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia* produzido em São Luís apresentou rendimento de 6,31%. A prospecção fitoquímica preliminar mostrou que o extrato possui alcalóides, terpenos e esteróides, substâncias fenólicas, flavonóides, antraquinonas, saponinas cumárias, antocianidinas, chalconas e taninos. As análises cromatográficas permitiram identificar as substâncias fenólicas e aromáticas como substâncias majoritárias, e flavonóides e antraquinonas como minoritárias.

O extrato demonstrou atividade contra formas promastigota (275,3µg/mL), amastigota axênico (214,9µg/mL) e amastigota intracelular (208,4µg/mL), apresentando melhor desempenho para esta última.

A citotoxicidade avaliada frente a macrófagos de linhagem J774.G8 revelou a baixa citotoxicidade do extrato.

A análise da ultraestrutura das formas promastigotas de *L. amazonensis*, revelou como principais alterações morfológicas a vacuolização citoplasmática, a inclusão lipídica e o aumento da atividade exocítica das promastigotas tratadas com o extrato.

Os resultados confirmam o efeito *in vitro* do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* em *Leishmania amazonensis*, abrindo perspectivas para futuros estudos.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar o fracionamento do extrato do fruto de *M. citrifolia* para obtenção de fração mais eficaz contra *Leishmania* spp.

Identificar e caracterizar substâncias puras responsáveis pela atividade do extrato por meio de técnicas espectrométricas.

Avaliar o efeito *in vitro* das frações e substâncias puras obtidas do extrato contra *Leishmania* spp.

Avaliar a citotoxicidade das frações e substâncias puras obtidas do extrato em culturas de células *in vitro*.

Avaliar o efeito do extrato bruto do fruto de *M. citrifolia* sobre a produção de citocinas e NO em macrófagos e frente a *Leishmania* spp.

Realizar o ensaio *in vivo* de atividade do extrato, frações e substâncias isoladas contra a *Leishmania* spp.

REFERÊNCIAS

AGA, E., KATSCHINSKI, D.M., ZANDBERGEN, G.V., LAUFS, H., HANSEN, B., MÜLLER, K., SOLBACH, W., LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 898-905, 2002.

ALVAR, J., VELEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., DEN BOER, M., et al. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 7, 5, e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.

ANVISA/MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2011. Bulário Eletrônico – Glucantime, antimoniato de meglumina. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B26429-1-0%5D.PDF>> Acesso em: 02 de fevereiro de 2011.

ANVISA/MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2011b. Bulário Eletrônico – Anfotericina B. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25531-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25531-1-0].PDF)> Acesso: em 02 de fevereiro de 2011.

AKUFFO, H; KAPLAN, G; KIESSLING, R; TEKLEMARIAM, S; DIETZ, M; MCEL RATH, J; COHN, Z.A. Administration of recombinant interleukin-2 reduces the local parasite load of patients with disseminated cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 775-780, 1990.

AL-FOUZAN, A.S.; AL SALEH, Q.A.; NAJEM, N.M.; ROSTOM, A.I. Cutaneous leishmaniasis in Kuwait. Clinical experience with itraconazole. **Int. J. Dermatol.**, v. 30, p. 519-21, 1991.

ALRAJHI, A.A.; IBRAHIM, E.A.; DE VOL, E.B.; KHAIRAT, M.; FARIS, R.M.; MAGUIRE, J.H. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 891-895, 2002.

ANTEZANA, G.; ZEBALLOS, R.; MENDOZA, C.; LYEVRE, P.; VALDA, L.; CARDENAS, F.; NORIEGA, I.; UGARTE, H.; DEDET, J.P. Electrocardiographic alterations during treatment of mucocutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate and allopurinol. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.86, p.31-3, 1992.

ARRUDA, D.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.; KATZIN, A.M.; ULIANA S.R. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. **Biomed. Pharmacother.**, v. 63, n. 9, p. 643-9, 2009.

- ASILIAN A.; SADEGHINIA A.; FAGHIHI G.; MOMENI A. Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v. 43, p. 281-3, 2004.
- ASTE, N.; PAU, M.; FERRELI, C.; BIGGIO, P. Intralesional treatment of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Braz. J. Dermatol.**, v. 138, n. 2, p.370-371, 1998.
- BADARÓ, R. & DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar). **J. Bras. Med.**, v. 97, p. 1234-1255, 1986.
- BADARO R. & JOHNSON, J.W.D. The role of interferon-gamma in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis**, v. 167, n. 1, p. 13-17, 1993.
- BAHAMDAN, K.A.; TALLAB, T.M.; JOHARGI, H.; NOURAD, M.M.; IBRAHIM, K.; EL SHERBINI, A.H.; KARKASHAN, E.; KHARE, A.K.; NAURI, M.M. Terbinafine in the treatment of cutaneous leishmaniasis: a pilot study. **Int. J. Dermatol.**, v. 36, p. 59-60, 1997.
- BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, p. 435–443, 1998.
- BANGS, J.D.; RANSOM, D.M.; NIMICK, M.; CHRISTIE, G.; HOOPER, N.M. *In vitro* cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 114, p. 111-117, 2001.
- BARANI, K.; MANIPAL, S.; PRABU, D.; AHMED, A.; ADUSUMILLI, P.; JEEVIKA, C. Anti-fungal activity of *Morinda citrifolia* (noni) extracts against *Candida albicans*: An *in vitro* study. **Indian J Dent Res**. v. 25, p. 188-190, 2014.
- BASAR, S.; UHLENHUT, K.; HÖGER, P.; SCHÖNE, F.; WESTENDORF, J. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (noni) fruit. **Phytother. Res.**, v. 24, n. 1, p. 38-42, 2010.
- BASSELIN, M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Biochem. J.**, 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.
- BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S.; MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Braz. J. Assoc. Advanced Science.**, v. 49, p. 395-402, 1997.

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

BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, n. 3, p. 560-686, 1998.

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

BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M.G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v.191, n.12, p.2121-30, 2000.

BRACONNIER, J.H. & MIORNER, H. Recurrent episodes of thrombocytopenia during treatment with sodium stibogluconate [letter]. **J. Antimicrob. Chemother.** v.31, p.187-8, 1993.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 9, de 29 de abril de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 de abril de 2004. Disponível em:<<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2011.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 de junho de 2006. Disponível em:<<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf>>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2011.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico nº 25, de 29 de maio de 2007. **Esclarecimentos sobre a comercialização do suco de fruta noni (*Morinda citrifolia*)**. Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/25_290507.htm>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2011.

_____. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 1.426, de 11 de agosto de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, 14 de junho de 2008.

BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; PRADO DIAS FILHO, B.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.C.; APARÍCIO GARCIA CORTEZ, D. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol. Res.**, v. 101, n. 3, p. 715-22, 2007.

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.

CAMPILLO, M.C.; VAZQUEZ, F.A.R.; FERNANDEZ, A.R.M.; ACEDO, M.C.S.; RODRIGUEZ, S.H.; LOPEZ-COZAR, I.N.; BAÑOS, P.D.; ROMEROM H.Q.; VARELA, M.C. **Parasitología Veterinaria**. 1 ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1999. p. 651-665.

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

CASTRO, C.; SAMPAIO, R.N.R.; MARSDEN, P.D. Severe arthralgia, not related to dose, associated with pentavalent antimonial therapy for mucosal leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v.84, p. 362, 1990.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **J Food Compos. Anal.**, v. 19, p. 645 – 654, 2006.

CHANG, K. P. **Modern Biology: Cell Biology of Leishmania**. 2.ed. New York: Farman and Company, 1990. p.79-89.

CHANG-HONG, L.; YA-RONG, X.; YOUNG-HANG, Y.; FENG-FENG, Y.; JUN-YAN, L.; JING-LEI, S. Extraction and Characterization of Antioxidant Compositions From Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Agric. Sci. China**, v. 6, n. 12, p. 1494-1501, 2007.

CHULAY, J.D.; SPENCER, H.C.; MUGAMBI, I.M. Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Am J Trop Med Hyg.**, v. 34, p. 702-9, 1985.

- COLARES, A.V.; ALMEIDA-SOUZA, F.; TANIWAKI, N.N.; SOUZA, C.S.F.; COSTA, J.G.M.; CALABRESE, K.S.; ABREU-SILVA, A.L. In Vitro Antileishmanial Activity of Essential Oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker, **J. Evidence-Based Complementary Altern. Med.** 2013 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/727042>.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Guibenkian. 1982, v. 3. 1032 p.
- COSTA-SILVA, T.A.; GRECCO, S.S.; SOUSA, F.S.; LAGO, J.H.; MARTINS, E.G.; TERRAZAS, C.A.; VARIKUTI, S.; OWENS, K.L.; BEVERLEY, S.M.; SATOSKAR, A.R.; TEMPONE, A.G. Immunomodulatory and Antileishmanial Activity of Phenylpropanoid Dimers Isolated from *Nectandra leucantha*, **J. Nat. Prod.** v. 78, p. 653-657, 2015
- CROFT, S.L.; BRAZIL, R.P. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, p. 37-43, 1982.
- CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. **Exp. Molec. Pathol.**, v.72, p.132-141, 2002.
- DEDET, J.P.; PRATLONG, F.; LANOTTE, G.; RAVEL Ç. The Parasite. **Clin. Dermatol.**, v. 17, p. 261-268, 1999.
- DENG, S.; WEST, B.J.; PALU, A.K.; ZHOU, B-N.; JENSEN, C.J. Noni as an anxiolytic and sedative: A mechanism involving its gamma-aminobutyric acidergic effects. **Phytomedicine**, v. 14, p. 517–522, 2007.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immun. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DIXON, A.R.; MCMILLEN, H.; ETKIN, N.L. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, *Rubiaceae*). **Ecol. Botany**, v. 53, p. 51–68, 1999.
- DUSSOSSOY, E.; BRAT, P.; BONY, E.; BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **J. Ethnopharmacol.** v. 133, p. 108–115, 2011.
- EL-ON, J. Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study. **J Am Acad Dermatol.**, v. 27, p. 227-31, 1992.
- ESTEVEZ, Y.; CASTILLO, D.; PISANGO, M.T.; AREVALO, J.; ROJAS, R. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by *Peruvian Chayahuita* ethnic group. **J Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 254–9, 2007.

- FALCOFF, E.; TARANTO, N.J.; REMONDEGUI, C.E.; DEDET, J.P.; CANINI, L.M.; RIPOLL, C.M.; DIMIER-DAVID, L.; VARGAS, F.; GIMÉNEZ, L.A.; BERNABÓ, J.G.; BOTTASSO, O.A. Clinical healing of antimony-resistant cutaneous or mucocutaneous leishmaniasis following the combined administration of interferon- γ and pentavalent antimonial compounds. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, n. 1, p. 95-97, 1994.
- FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 36-44, 2000.
- FERRARI, T. C.A.; GUEDES, A.C.M.; ORÉFICE, F.; GENARO, O.; PINHEIRO, S.R.A.; MARRA, M.A.; SILVEIRA, I.L.N.; MIRANDA, M.O. Isolation of *Leishmania* sp. from aqueous humor of a patient with cutaneous disseminated leishmaniasis and bilateral iridocyclitis (preliminary report). **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 32, n. 4, p 296-298, 1990.
- FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; YALUFF, G.; BILBAO, N.V.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; SCHININI, A.; GUY, I.; HEINZEN, H.; FOURNET, A. Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. **Phytomedicine**, v. 17, p. 375–378, 2010.
- FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY S.; JENSEN, J. Antitumor Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180 Ascites Tumor in Mice. **Phytother. Res.**,v. 17, n. 10, p. 1158 – 1164, 2003.
- GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, L. A.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 10^a ed., São Paulo, Atheneu, cap.8, p.36-53, 2000.
- GONÇALVES DA COSTA, S.C.; LAGRANGE, P.H. Development of cell mediated immunity to flagelar antigens and acquired resistant to infection by *Trypanossoma cruzi* in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, p. 367-381, 1981.
- GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 1027–1034, 2003.
- GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: Quadro atual,desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epid.** ,v. 7, n. 3, 2004.
- GRIMALDI, G.J. & TESH, R.B. 1993. Lesihmaniasis of the New World – current conceptions and implications for future-research. **Clin. Microbiol. Rev.** 6:230-250.

- GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 629–55, 1999.
- GUPTA, S.; RAYCHAUDHURI, B.; BANERJEE, S.; DAS, B.; MUKHOPADHAYA, S.; DATTA, S.C. Momordicatin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent antileishmania agent. **Parasitol Int.**, v. 59, n. 2, p. 192-7, 2010.
- GURU, P.Y.; AGARWAL, A.K.; SINGHA, U.K.; SINGHAL, A.; GUPTA, C.M. Drug targeting in *Leishmania donovani* infections using tuftsin bearing liposomes as drug vehicles. **FEBS Lett.**, v. 245, p. 204–208, 1989.
- HARADA, S.; HAMABE, W.; KAMIYA, K.; SATAKE, T.; YAMAMOTO, J.; TOKUYAMA, S. Preventive Effect of *Morinda citrifolia* Fruit Juice on Neuronal Damage Induced by Focal Ischemia. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 3, p. 405—409, 2009.
- HEINICKE, R. M. The pharmacologically active ingredient of noni. **Bull. Pac. Trop. Bot. Gard.**, v. 15, p. 10-14. 1985.
- HEINICKE, R. M. **The Xeronine System: A new Cellular Mechanism That Explains the Health Promoting Action of Noni and Bromelain.** Direct Source Publishing, Orem, Utah, 2001.
- 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.
- HERVAS-RODRIGUEZ, J.; MOZOS, E.; MENDEZ, A.; PEREZ, J.; GOMEZ-VILLAMANDOS, J.C. *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. **Vet Pathol.**, v. 33, n. 4, p. 469-73, 1996.
- HIRAMATSU, T.; IMOTO, M.; KOYANO, T.; UMEZAWA, K. Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by damnacanthal from *Morinda citrifolia*. **Cancer Lett.**, v. 73, p. 161-6, 1993.
- HIRAZUMI, A. & FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. **Phytother. Res.**, v. 13, n. 5, p. 380 – 387, 1999.
- HORBER, F.F.; LERUT, J.; JAEGER, P. Renal tubular acidosis, a side effect of treatment with pentavalent antimony. **Clin Nephrol.**, v. 36, p. 213, 1991.
- HUEB, M. Treatment of leishmaniasis: preliminary observations of the use of stibogluconate in Mato Grosso, Brazil. **Acta Parasitol. Tur.**, v. 21, n. 1, p. 173, 1997.

INBiO. 1997. Instituto Nacional de Biodiversidade. Costa Rica. Disponível em: <<http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0142/f01359/g008903/s028172.htm>> Acesso em: 20 de fevereiro de 2011.

JAINKITTIVONG, A.; BUTSARAKAMRUHA, T.; LANGLAIS, R.P. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 108, p. 394-398, 2009.

KAMIYA, K.; HAMABE, W.; TOKUYAMA, S.; HIRANO, K.; SATAKE, T.; KUMAMOTO-YONEZAWA, Y.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 725-730, 2010.

KANDASWAMY, D.; VENKATESHBABU, N.; GOGULNATH, D.; KINDO, A.J. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, *Morinda citrifolia* juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 43, p. 419-423, 2010.

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

KHALIL, E.A.; NUR, N.M.; ZIJLSTRA, E.E.; EL-HASSAN, A.M.; DAVIDSON, R.N. Failure of a combination of two antifungal drugs, terbinafine plus itraconazole, in Sudanese post kala-azar dermal leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 90, p; 187-8, 1996.

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

LABMET - Laboratório de Meteorologia da Universidade Estadual do Maranhão. Disponível em <http://www.nemrh.uema.br/>. Acesso em: 03 de Fevereiro de 2011.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. **The leishmaniasis in biology and medicine: Evolution, classification and geographical distribution**. London: Academic Press Inc., 1987. p.1-120.

LAVAUT, N.G. & LAVAUT, J.G. *Morinda citrifolia* Linn.: potencialidades para su utilización en la salud humana. **Rev. Cubana Farm.**, v. 37, n. 3, 2003.

LEVAND, O. & LARSON, H.O. Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. **Planta Med.**, v. 36, p.186-7, 1979.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B.M.; LIEEDALE, G.F.; LEOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.;

WALLACE, F.G. A newly revised classification of the PROTOZOA. **J. Protozoology**, v. 27, p. 37-58, 1980.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; TROMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin, Springer, 1970.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; LEAL, C.A.; MARZOCHI, M.C.A. Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* Isolated from Healthy Skin of Symptomatic and Asymptomatic Dogs Seropositive for Leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Infec. Dis.**, v. 8, p. 440-444, 2004.

MAHATTANADUL, S.; RIDTITID, W.; NIMA, S.; PHDOONGSOMBUT, N.; RATANASUWON. P.; KASIWONG, S. Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 134, n. 2, p. 243-250, 2011.

MAI, L.H.; CHABOT, G.G.; QUENTIN, P.G.L.; DUMONTET, V.; POULAIN, C.; ESPINDOLA, L.S.; MICHEL, S.; VO, H.T.B.; DEGUIN, B.; GROUGNET, R. Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Caledonian *Gardenia* species (Rubiaceae). **Eur. J. Med. Chem.** v. 93, p. 93-100, 2015.

MARSELLA, R. & GOPEGUI, R.R. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. **Int. J. Dermatol.**, v.37, p. 801-14, 1998.

MARTÍN-QUINTAL, Z.; GARCÍA-MISS, M.R.; MUT-MARTÍN, M.; MATUS-MOO, A.; TORRES-TAPIA, L.W.; PERAZA-SÁNCHEZ, S.P. The Leishmanicidal Effect of (3S)-16,17-Didehydrofalcarinol, an Oxylipin Isolated from *Tridax procumbens*, is Independent of NO Production. **Phytother. Res.**, v. 24, n. 7, p. 1004-8, 2010.

MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.; AMENDOEIRA, M.R. Leishmaniose visceral (calazar). **J. Bras. Med.**, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.

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

MESIA, G.K.; TONA, G.L.; NANGA, T.H.; CIMANGA, R.K.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; PIETERS L.; VLIETINCK, A.J. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, p. 409–415, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Controle de Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília. 62p. 2000.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção Leishmania-HIV**. Brasília-DF, 2004.

MIRANDA-VERASTEGUI, C.; LLANOS-CUENTAS, A.; AREVALO, I.; WARD, B.J.; MATLASHEWSKI, G. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin Infect Dis.**, v. 40, p. 1395-403, 2005.

MOLLYNEUX, D.H. & KILLICKKENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine: Morphology, ultrastructure and life cycles.** London: Academic Press Inc., 1987. p. 122-168.

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

MORTON, J.F. The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its “colourful” relatives. **Ecol. Botony**, v. 46, p. 241–256, 1992.

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

MÜLLER, J. C.; BOTELHO, G.G.K.; BUFALO, A.C.; BOARETO, A.C.; RATTMANN, Y.D.; MARTINS, E.S.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F.; DALSENTER, P.R. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): *In vivo* and *in vitro* reproductive toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, p. 229–233, 2009.

MURALIDHARAN, P.; RAVI KUMAR, V.; BALAMURUGAN, G. Protective Effect of *Morinda citrifolia* Fruits on β -Amyloid (25–35) Induced Cognitive Dysfunction in Mice: An Experimental and Biochemical Study. **Phytother. Res.**, v. 24, p. 252–258, 2010.

MURALIDHARAN, P. & SRIKANTH, J. Anti Epileptic Activity of *Morinda Citrifolia* Linn. Fruit Extract. **J. Chem.**, v. 7, n. 2, p. 612-616, 2010.

MURRAY, H.W.; CERVIA, J.S.; HARIPRASHAD, J.; TAYLOR, A.P.; STOECKLE, M.Y.; HOCKMAN, H. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. **J Clin Invest.**, v. 95, n. 3, p. 1183–1192, 1995.

MURRAY, H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (kal-azar): a decade of progress and future approach. **Int. J. Inf. Dis.**, v. 4, n. 3, p. 158-177, 2000.

MURRAY, P.E.; FARBER, R.M.; NAMEROW, K.N.; KUTTLER, S.; GARCIA-GODOY, F. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. **J. Endod.** v. 34, p. 66-70, 2008.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade

- antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 16, n. 1, 2006.
- NAYAK, B.S.; MARSHALL, J.R.; ISITOR, G.; ADOGWA, A. Hypoglycemic and Hepatoprotective Activity of Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in Diabetic Rats. **Evid. Bas. Complement. Alternat. Med.**. 2011, Article ID 875293, 5 pages doi:10.1155/2011/875293.
- NELSON, S.C. Noni cultivation in Hawaii. **Fruit and Nuts**, v. 4, p. 1–4, 2001.
- NELSON, S. C. & ELEVITCH, C. R. Workshop manual to supplement Noni: The Complete Guide for Consumers and Growers for Noni Processing, Marketing, and Field Training Workshop for YAP. Permanent Agriculture Resources, Holualoa, Hawaii, 2006.
- OLIVEIRA, G.G.S.; SANTORO, F.; SAGIDURSKI, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, p.243-48, 1993.
- OLIVEIRA, V.C.; MOURA, D.M.; LOPES, J.A.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; FIGUEIREDO, R.C. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitol Res.** 2009 Apr;104(5):1053-9. Epub 2008 Dec 16.
- OLIVEIRA-NETO, M.P. & MATTOS, M.S. Um esquema antimonial alternativo para ser empregado na leishmaniose cutânea quando altas doses de antimônio são indesejáveis. **Rev. Soc Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 4, p.323-326, 2006.
- ORSINI, O. Tratamento da Anfotericina B pela Lomidine. **Public. Méd.**, v. 22, p. 3-8, 1952.
- PALATNICK-DE-SOUSA, C.B., Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v. 26, p. 1709-1724, 2008.
- PALU, A. K.; SEIFULLA, R. D.; WEST, B.J. *Morinda citrifolia* L. (noni) improves athlete endurance: Its mechanisms of action. **J. Med. Plants Res.**, v. 2, n.7, p. 154-158, 2008a.
- PALU, A.K.; KIM, A.H.; WEST, B.J.; DENG, S.; JENSEN, J.; WHITE, L. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, p. 502–506, 2008b.
- PALU, A.K.; DENG, S.; WEST, B.; JENSEN, J. Xanthine Oxidase Inhibiting Effects of Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Juice. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 1790–1791, 2009.

- PEREIRA, I.O.; MARQUES, M.J.; PAVAN, A.L.R.; CODONHO, B.S.; BARBIERI, C.L.; BEIJO, L.A.; DORIGUETTO, A.C.; D’MARTIN, E.C.; DOSSANTOS, M.H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, p. 339–345, 2010.
- PESSÔA, S.B & MARTINS, A.V. 1982. **Parasitologia médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan.
- PHILLIPS, M.A.; STANLEY, S.L. Quimioterapia de infecciones por protozoos. En: Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 11ª Edición. JG Hardman, LE Limbird, AG Gilman Eds. Mc Graw Hill México. 2006; Cap. 40. pp.: 1049-1071.
- PRATA, A.; SILVA-VERGARA, M.L.; COSTA, L. Efficacy of azithromycin in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 36, p. 665-9, 2003.
- PRAVEEN, K. R.; AWANG, B. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. **J. Eng. Sci. Technol.** v. 2, n. 1, p. 70-80, 2007.
- PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. Microbiology. 6 ed. New York: McGrawHill Higher Education. 2005. p 681-758.
- RAZAFIMANDIMBISON, S.G.; McDOWELL, T.D.; HALFORD, D.A.; BREMER, B. Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (*Rubiaceae*): coments on its distribution range and circumscription. **J. Biogeography**, n. 37, p. 520-529, 2010.
- RESS, P.H.; KAGER, P.A.; OGADA, T.; EEF TINCK SHATTENKERK, J-KM. The treatment kala azar: review with comments draw from experience in Kenia. **Trp. Geog. Medicine**, v. 37, p. 37-46, 1985.
- RITTER, U. & KÖRNER, H. Divergente expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 24; p. 295-301, 2002.
- RODRIGUES, J.C.F.; ATTIAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA. J.A.; SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22, 26-Azasterol, a delta 24(25)-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 487–499, 2002.
- ROSS, I.A., 2001. Medical Plants of the World. Chemical Constituents, Traditional and Modern Medical Uses. Humana Press, New Jersey.

- SAENZ, R.E.; PAZ, H.; BERMAN, J.D. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. **Am J Med.**, v. 89, p. 34-4, 1990.
- 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.
- SALMAN, S.M.; RUBEIZ, N.G.; KIBBI, A.G. Cutaneous Leishmaniasis: Clinical Features and Diagnosis. **Clinics in Dermatology**, v.17, p. 291-296, 1999.
- SAMPAIO, R.N.R.; LUCAS, I.C.; VELLOSO, A. Estudo comparativo entre azitromicina e N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania amazonensis* em camundongos. **An Bras Dermatol.**, v. 81, n. 2:S116, 2006.
- SAMPAIO, R.N. & MARSDEN. P.D. Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucantime with liposomal amphotericin B. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 125-128, 1997.
- SANTIN, M.R.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.F.; FERREIRA, I.C.P.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citrates* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res.**, v. 105, p. 1489–1496, 2009.
- SCOTT, J.L.P. & FARREL, J.P. *In vivo* alterations in cytokine production following interleukin-12 (IL-12) and anti-IL-4 antibody treatment of CB6F1 mice with chronic cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immunol.**, v.64, n. 12, p. 5248-5254, 1996.
- SEEBERGER, J.; DAOUD, S.; PAMMER, J. Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with imiquimod. **Int J Dermatol.**, v. 42, p. 576-9, 2003.
- SILVA, YP. Lomidine no tratamento leishmaniose tegumentar. **O Hospital**, v. 42, p. 261-268, 1952.
- SILVA, D.G. Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas. 2008. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina-SC.
- SILVA, J.J.M. Adubação Orgânica e Mineral de Noni: Desempenho Agrônomo, Nutrição da Planta, Qualidade de Fruto e de Suco. Areia: 2010. 104f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L.O.P.; ABREU-SILVA, A.L.; d'ESCOFFIER, L.N.; CALABRESE, K.S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection Muscular involvement in BALBc and C3H.HeN mice. **Experiment. Parasitol.**, v. 124, p. 315–318, 2010.

SILVA-VERGARA, M.L.; SILVA, L.A.; MANEIRA, F.R. Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, p. 175-7, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. Ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1104p.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDEIRO, D.; MONKS, A.; MCMAHOIN, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Nat Canc Inst.**, v. 82, p. 1107, 1990.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. **Veterinary Quartely**, v. 10, n. 1, p. 74-80, 1988.

SOARES, L.M.V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 2001.

SOARES, A.M.; TICLI, F.K.; MARCUSSI, S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A.H.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, O.S. Medicinal Plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr Med Chem.**, v. 12, p. 2625-41, 2005.

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

SOTO, J.; ARANA, B.A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEJA, J.C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J.D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. Miltefosine for new world cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p. 1266-1272, 2004.

SUNDAR, S.; MEHTA, H.; SURESH, A.V.; SINGH, S.P.; RAI, M.; MURRAY, H.W. Amphotericin B treatment for Indian visceral Leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. **Clin Infect Dis.**, v. 38, p. 377-83, 2004.

TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**, 3ª ed., São Paulo, Atheneu, 2001.

- TEIXEIRA, M.C.A.; SANTOS, R.J.; SAMPAIO, R.B.; PONTES-DE-CARVALHO L.; DOS-SANTOS, W.L.C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitol Res.**, v. 88, p. 963–968, 2002.
- THAKUR, C.P.; KANYOK, T.P.; PANDEY, A.K.; SINHA, G.P.; MESSICK, C.; OLLIARO, P. Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-II clinical study. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 94, p. 432-3, 2000.
- TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 176–182, 2005.
- TORRE-CISNEIROS, J., PRADA, J.L.; VILLANUEVA, J.L.; VALVERDE, F.; SANCHEZ-GUIJO, P. Successful treatment of antimony-resistant cutaneous leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Clin. Inf. Dis.**, v.18, n.6, p. 1024-1025, 1994.
- TORRES-SANTOS, E.C.; RODRIGUES, J.M.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 29,69-dihydroxy-49-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-Lactide) nanoparticles. **Antimicrob Agents Chemoter.**, v. 47, p. 1776-8, 1999.
- TUROLLA, M.S.R. & NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc Farm.**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.
- VASSILIOS, J.K. Old world canine leishmaniasis. **Compend. Cont. Ed. Pract. Vet.**, v.15, p.941-49, 1993.
- VELASCO-CASTREJON, O.; WALTON, B.C.; RIVAS-SANCHEZ, B.; GARCIA, M.F.; LAZARO, G.J.; HOBART, O.; ROLDAN, S.; FLORIANI-VERDUGO, J.; MUNGUÍA-SALDANA, A.; BERZALUCE, R. Treatment of cutaneous leishmaniasis with localized current field (radio frequency) in Tabasco, Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 309-12, 1997.
- VIANNA, G. Sociedade Brasileira de Dermatologia. 4ª Seção Ordinária. **Arch. Brasil. Med.**, v.2, p. 422, 1912.
- WANG, M.Y. & SU, C. Cancer Preventive Effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 952, p. 161-168, 2001.
- WANG, M.Y.; WEST, B.J.; JENSEN, C.J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A.K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (noni): a literature review and recent advances in noni research. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 23, p. 1127-41, 2002.

WANG, M.Y.; LUTFIYYA, M.N.; WEIDENBACHER-HOPER, V.; ANDERSON, G.; SU, C.X.; WEST, B.J. Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. **Chem. Cent. J.**, v. 6, p. 3-13, 2009.

WMO. Weather Information for Sao Luis/ Meteorologia em São Luís (em inglês). < <http://www.worldweather.org/136/c01082.htm>> Acesso em: 03 de fevereiro de 2010.

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

WEST, B.J.; DENG, S.; PALU, A. K.; JENSEN, C.J. *Morinda citrifolia* Linn. (*Rubiaceae*) leaf extracts mitigate UVB-induced erytrema. **J. Nat. Med.**, n.3, p. 351-354, 2009a.

WEST, B.J.; DENG, S.; JENSEN, C.J. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **J. Toxicol. Sci.**, v. 34, n. 5, p. 581-585, 2009b.

WHO. The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/em/>>. Acessado em: 23/01/2011.

WHO. Control of the leishmaniasis. Executive board. 118th Session. Provisional agenda item 5.1. EB118/4. 11 May 2006. Disponível em: <http://www.emro.who.int/afghanistan/Media/PDF/Leishmaniasis_EB118_4.pdf>. Acesso em: 23/01/2011.

WILSON, M.E. & PEARSON, R.D.; Immunology of Leishmaniasis. In: WYLER DJ (Ed). Modern parasite biology: cellular, immunological aspects. New York: WH Freeman, 1990. p. 200-221.

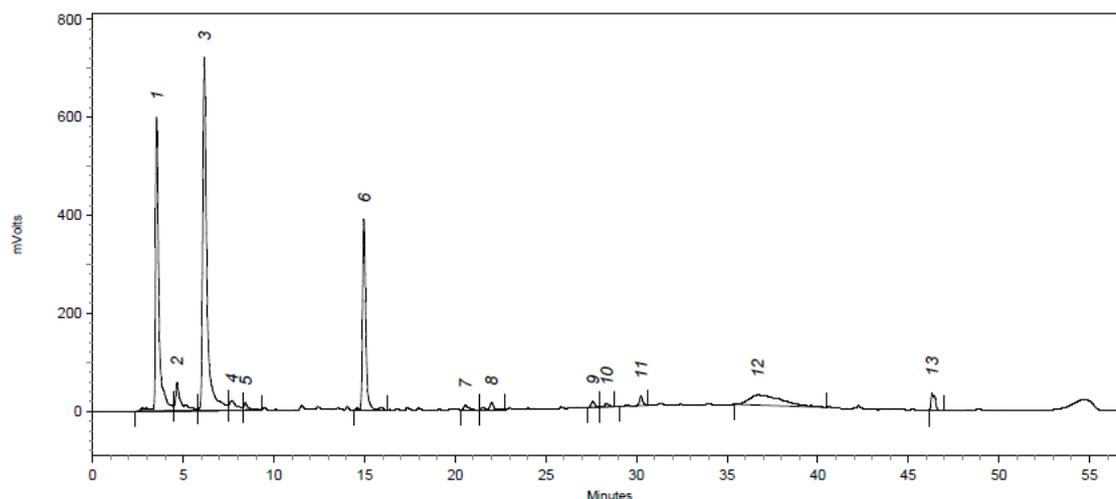
YANG, J.; GADI, R.; PAULINO, R.; THOMSON, T. Total phenolics, ascorbic acid, and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder as affected by illumination during storage. Western Pacific Tropical Research Center, College of Natural and Applied Sciences, University of Guam, UOG Station, Mangilao, GUAM, USA, 2010.

YOUNOS, C.; ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M.C.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Analgesic and Behavioral effects of *Morinda citrifolia*. **Planta Med.**, v. 56, p. 430-434, 1990.

ZIN, Z.M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**, v. 78, p. 227-231, 2002.

APÊNDICES

Apêndice A – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de *M. citrifolia* dissolvido em água (5 mg.mL⁻¹) obtido por CLAE-DAD monitorado no comprimento de onda de 240 nm, com os respectivos dados de tempo de retenção, área e área percentual dos sinais detectados.

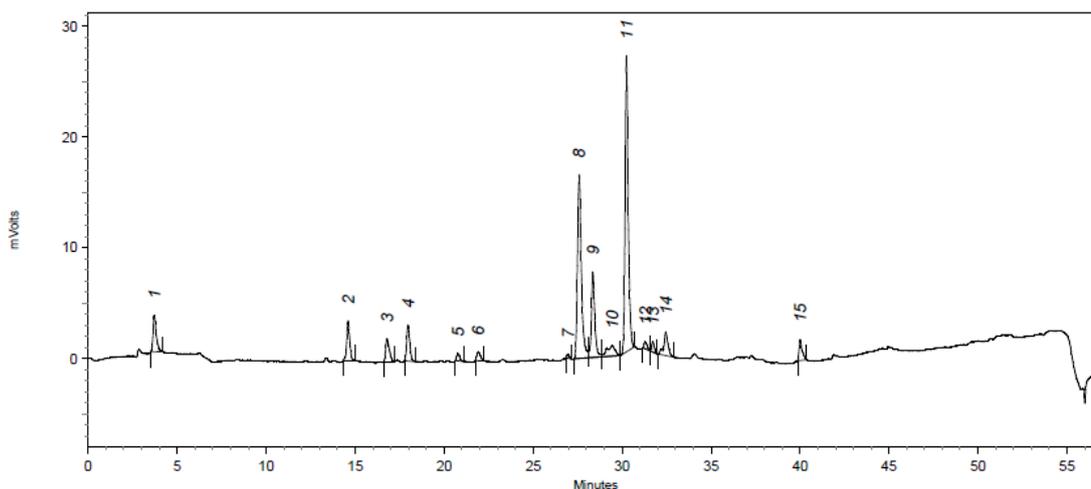


Detector A-240 nm

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	3.531	7844351	25.7
2	4.651	1220775	4.0
3	6.155	11658330	38.2
4	7.659	520268	1.7
5	8.427	244474	0.8
6	14.965	4854708	15.9
7	20.555	153421	0.5
8	22.005	269908	0.9
9	27.595	171675	0.6
10	28.363	102645	0.3
11	30.240	258681	0.8
12	36.672	2684146	8.8
13	46.304	545258	1.8

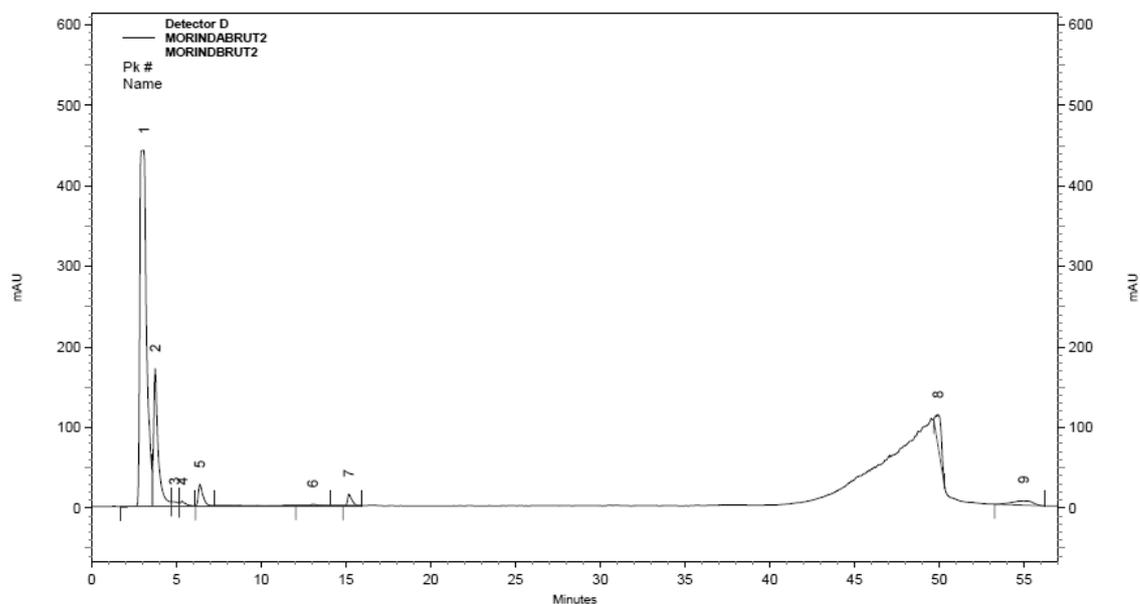
Totals		30528640	100.0
--------	--	----------	-------

Apêndice B – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de *M. citrifolia* dissolvido em água (5 mg.mL⁻¹) obtido por CLAE-DAD monitorado no comprimento de onda de 360 nm, com os respectivos dados de tempo de retenção, área e área percentual dos sinais detectados.



Detector A-360 nm				
Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	
1	3.712	41672	4.4	
2	14.603	40648	4.2	
3	16.789	29271	3.1	
4	17.973	39709	4.1	
5	20.768	7909	0.8	
6	21.909	11467	1.2	
7	26.955	3608	0.4	
8	27.584	251475	26.3	
9	28.363	101706	10.6	
10	29.440	30903	3.2	
11	30.240	323772	33.8	
12	31.307	7704	0.8	
13	31.723	9565	1.0	
14	32.448	34888	3.6	
15	40.000	22568	2.4	
Totals		956865	100.0	

Apêndice C – Cromatograma do extrato bruto liofilizado do fruto de *M. citrifolia* dissolvido em água (5 mg.mL⁻¹) obtido por CLAE-ELSD, com os respectivos dados de tempo de retenção, área e área percentual dos sinais detectados.



Detector D Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	Width	Name
1	3.083	12258249	67.555	442030	62.009	1.88	
2	3.750	3196379	17.615	171458	24.053	1.13	
3	4.875	142929	0.788	5706	0.800	0.46	
4	5.333	154990	0.854	6331	0.888	0.96	
5	6.375	537135	2.960	27076	3.798	1.08	
6	13.042	128796	0.710	2185	0.307	2.04	
7	15.167	270102	1.489	14614	2.050	1.08	
8	49.917	989500	5.453	38062	5.339	0.67	
9	54.958	467448	2.576	5383	0.755	3.00	
Totals		18145528	100.000	712845	100.000		

ANEXOS

ANEXO A – Soluções e reagentes utilizados no estudo fitoquímico (COSTA, 1983; MATOS, 1997).

Solução de NaOH 0,5M

- Hidróxido de sódio 20 g
- Água destilada qsp 100 mL

Solução de HCl 0,5M

- Ácido clorídrico 1,544 mL
- Água destilada qsp 100 mL

Reativo de Mayer

- Cloreto de mercúrio 1,35 g
- Iodeto de potássio 5 g
- Água destilada qsp 100 mL

Misturar o cloreto de mercúrio com 60 mL de água; dissolver o iodeto de potássio em 20 mL de água; misturar as soluções e completar o volume para 100 mL com água. Filtrar após completa homogeneização.

Reativo de Bouchardat (Wagner)

- Iodo 1 g
- Iodeto de potássio 2 g
- Água destilada qsp 100 mL

Reativo de Hager

- 2 g de ácido pícrico
- Água destilada qsp 100 mL

Hidróxido de potássio a 10%

- Hidróxido de potássio 10 g
- Água destilada qsp 100 mL

Cloreto férrico a 5%

- Cloreto férrico 5 g
- Água destilada qsp 100 mL

Gelatina a 2,5%

- Gelatina 2,5 g
- Água destilada qsp 100 mL

