

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

JOSIRENY MARIANO MENDES

**AÇÃO LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE PLANTAS NO
DESENVOLVIMENTO DE PROMASTIGOTAS DE
Leishmania amazonensis E ESTUDO DO PERFIL
METABÓLICO UTILIZANDO A TÉCNICA DE
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).**

Orientador:

Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra

Dissertação de Mestrado

Goiânia - Goiás, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Josireny Mariano Mendes

Ação leishmanicida de extratos de plantas no desenvolvimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e estudo do perfil metabólico utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Orientador:

Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de pós-graduação em Medicina Tropical no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical na área de concentração de Parasitologia.

Goiânia - Goiás, 2006.

Todas as virtudes acumuladas na composição desta tese dedico à pesquisa científica e à paz, no mundo e interna, de todos os seres.

Em homenagem especial aos meus pais, José Carlos e Ireny.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar a oportunidade de crescimento, aprendizado e vida.

Ao professor orientador desta dissertação, Doutor José Clecildo Barreto Bezerra, pela ajuda no crescimento profissional e pessoal, por me fazer acreditar que posso mais do que imaginava ser.

Ao Professor Doutor co-orientador, Milton Adriano Pelli de Oliveira, pela paciência de sempre ensinar e colaborar nos mínimos detalhes.

À Professora Doutora, Heloísa Helena Garcia da Silva, pela coleta e obtenção dos extratos da planta do Cerrado, utilizada neste trabalho.

A Professora Doutora Ana Maria de Castro pelo apoio, incentivo, carinho e atenção constantes nesta trajetória.

A coordenação de pós-graduação do IPTSP/UFG, ao apoio financeiro da CAPES, aos colegas do mestrado, funcionários, profissionais do IPTSP/UFG e todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Aline Araújo, Cirlane Ferreira, Marines Rieth, Marcos Gontijo, Tatiane Luiza, Mariana Félix e Juliana Avelar pelo companheirismo e apoio e a Janayna Roriz pela força mesmo à distância.

Em especial à amiga Marina Clare Vinaud pelo incentivo diário e apoio emocional fundamentais nos momentos de dificuldades profissionais e pessoais e à Carolina Araújo pela colaboração e contribuição prática.

A amiga-irmã Renata Mundim pelo carinho e incentivo e aos meus novos amigos da Pilates Corporale pelo apoio e torcida incondicional.

Ao meu amigo e namorado Lucas Mendonça de Castro, pelo amor, apoio, paciência e companheirismo nos bons e, principalmente, nos momentos de maior dedicação.

Por fim, aos meus pais, José Carlos Mendes e Ireny Mariano Mendes, em conjunto com meus irmãos, Thiago Aires Mendes e Danilo Aires Mendes, a família que nutre meus sonhos e sempre será meu ponto de partida e de chegada. Muito Obrigada!

“O segredo da vitória em todos os setores da vida permanece na arte do aprender e fazer mais um pouco.”

André Luiz

SUMÁRIO

RESUMO	-vi-
ABSTRACT	-vii-
LISTA DE FIGURAS	-viii-
LISTA DE TABELAS	-xi-
LISTA DE ABREVIATURAS	-xii-
INTRODUÇÃO	-1-
1. A doença e o agente	-2-
2. Ciclo biológico	-6-
3. Tratamento e recursos naturais	-7-
4. Metabolismo	-12-
JUSTIFICATIVA	-17-
OBJETIVOS	-20-
ARTIGO 1 – Avaliação do perfil metabólico de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> através da análise de ácidos orgânicos realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	-22-
ARTIGO 2 – Análise por cromatografia líquida de alta eficiência do efeito leishmanicida dos extratos naturais de <i>Magonia pubescens</i> e <i>Glycyrrhiza glabra</i> no desenvolvimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	-43-
CONCLUSÕES FINAIS	-68-
CONSIDERAÇÕES FINAIS	-71-
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	-74-
ANEXOS	-89-

RESUMO

Dois milhões de novos casos de Leishmaniose ocorrem anualmente nas áreas tropicais e subtropicais do globo, com uma estimativa de doze milhões de pessoas atualmente infectadas no mundo e trezentos e cinqüenta milhões sob risco de infecção. O gênero *Leishmania*, responsável pela doença, compreende muitas espécies diversas e complexas que apresentam resistência aos fármacos utilizados no seu tratamento, além das características indesejáveis. A eficácia do controle e tratamento de uma doença parasitária depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia em geral do parasito. A Organização Mundial de Saúde, associada a outros órgãos de pesquisas têm estimulado a investigação de novos extratos de plantas nativas como alternativa para o tratamento e combate das doenças parasitárias. Neste trabalho padronizou-se técnicas de estudos bioquímicos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) avaliando excreção e consumo dos ácidos orgânicos em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e realizou-se bioensaios com *Magonia pubescens* (tingui) e *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1. Foram detectados os seguintes ácidos: lactato, oxalato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato e propionato, demonstrado atividades na via glicolítica, ciclo de Krebs e cadeia respiratória. Ambos os extratos testados apresentaram ação leishmanicida com melhor efeito para *Glycyrrhiza glabra* 100 mg.L-1 e *Magonia pubescens* 25 mg.L-1. A *Glycyrrhiza glabra* teve melhor ação na fase estacionária de crescimento ao contrario da *Magonia pubescens* que melhor agiu na fase logarítmica. Constituintes químicos das plantas podem atuar diretamente ou indiretamente no metabolismo do parasito, afetando vias metabólicas essenciais.

Palavras Chave: *Leishmania*, metabolismo, ácidos orgânicos, plantas leishmanicidas.

ABSTRACT

Two million new cases of Leishmaniose occur annually in the tropical and subtropical areas of the globe, with a estimate of twelve million people currently infected in world and three hundred and fifty million under infection risk. The *Leishmania* sort, responsible for the disease, understands many diverse and complex species that present resistance to the drugs used in its treatment, beyond the characteristics undesirable. The effectiveness of the control and treatment of a parasitic disease depends on the detailed knowledge of the cycle of life, metabolism and biology in general of the parasite. The World Health Organization, associated with other agencies of research has stimulated the extract inquiry new of native plants as alternative for the treatment and combat of the parasitic disease. In this work one standardized techniques of studies biochemists through liquid chromatography high performace (HPLC) evaluating organic acid excretion and consumption of in promastigotes of *Leishmania amazonensis* and became fullfilled biotests with *Magonia pubescens* (tingui) and *Glycyrrhisa glabra* (alcaçuz) in the concentrations of 25, 50 and 100 mg.L-1. The acid had been detected following: lactate, oxalate, citrate, α -Ketoglutarate, succinate, fumarate, malate and propionate, demonstrated activities in the glycolytic pathway, cycle of Krebs and respiratory chain. Both the tested extracts had presented leishmanicid action with better effect for *Glycyrrisa glabra* 100 mg.L-1 and *Magonia pubescens* 25 mg.L-1. The *Glycyrrisa glabra* had better action in the stationary phase of growth to opposes it of *Magonia pubescens* that better acted in the logaritmic phase. Chemical components of plants can act directly or indirectly in the metabolism of the parasite, affecting essential metabolic pathways.

Key words: Leishmania, metabolism, acid organic, antileishmanial plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da Leishmaniose.....	-3-
Figura 2	Distribuição dos casos de leishmaniose no Brasil.....	-5-
Figura 3	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	-6-
Figura 4	Vias de degradação de carboidratos (metabolismo aeróbio) na <i>Leishmania</i>	-14-
Figura 5	Curva de crescimento em triplicata, realizada com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> , em meio de cultura Grace modificado, durante 8 dias consecutivos.....	-33-
Figura 6	Média da taxa de concentração de lactato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-34-
Figura 7	Média da taxa de concentração de oxalato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-34-
Figura 8	Média da taxa de concentração de citrato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-35-
Figura 9	Média da taxa de concentração de α -cetogluturato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-35-
Figura 10	Média da taxa de concentração de succinato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-36-
Figura 11	Média da taxa de concentração de fumarato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-36-
Figura 12	Média da taxa de concentração de malato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-37-
Figura 13	Média da taxa de concentração de propionato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias.....	-37-

Figura 14	Metabolismo da via glicolítica e dos aminoácidos.....	-42-
Figura 15	Ação da <i>Magonia pubescens</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1, na curva de crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	-53-
Figura 16	Ação da <i>Glycyrrhiza glabra</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1, na curva de crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	-53-
Figura 17	Inibição média, em porcentagem, do crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> sob ação da <i>Glycyrrhiza glabra</i> e da <i>Magonia pubescens</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.....	-54-
Figura 18	Inibição média, em porcentagem, do crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> sob ação da <i>Glycyrrhiza glabra</i> e da <i>Magonia pubescens</i> nos sete dias consecutivos de cultura e de exposição aos extratos.....	-54-
Figura 19	Taxa de concentração de lactato na curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com <i>Glycyrrhiza glabra</i> e <i>Magonia pubescens</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.....	-57-
Figura 20	Taxa de concentração de oxalato na curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com <i>Glycyrrhiza glabra</i> e <i>Magonia pubescens</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.....	-58-
Figura 21	Taxa de concentração de citrato na curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com <i>Glycyrrhiza glabra</i> e <i>Magonia pubescens</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.....	-59-
Figura 22	Taxa de concentração de α -cetogluturato na curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com <i>Glycyrrhiza glabra</i> e <i>Magonia pubescens</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.....	-60-
Figura 23	Taxa de concentração de succinato na curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com <i>Glycyrrhiza glabra</i> e <i>Magonia pubescens</i> , nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.....	-61-

-
- Figura 24 Taxa de concentração de fumarato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1..... -62-
- Figura 25 Taxa de Concentração de malato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1..... -63-
- Figura 26 Taxa de concentração de propionato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1..... -64-

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Concentração em mmol x 10 ⁻⁶ dos ácidos orgânicos no meio de cultura e na cultura de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	-33-
Tabela II	Detecção de ácidos orgânicos na cultura de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> testadas com extrato de <i>Glycyrrhiza glabra</i> (alcaçuz) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L ⁻¹	-56-
Tabela III	Detecção de ácidos orgânicos na cultura de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> testadas com extrato de <i>Magonia pubescens</i> (tingui) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L ⁻¹ ...	-56-

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - *Analysis of variation*

ATP – Adenosina tri-fosfato

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CO₂ – Dióxido de carbono

CRF – Conselho Regional de Farmácia

HPLC – *Liquid Chromatography High Performace*

IPTSP – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

LC – Leishmaniose Cutânea

LV – Leishmaniose Visceral

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PPGMT – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

SQR – Substância Química de Referência

UFG – Universidade Federal de Goiás

WHO - *World Health Organization*

INTRODUÇÃO

1) A doença e o agente

As doenças infecciosas têm seu destaque na história da humanidade por constituírem grandes problemas de saúde pública. No Brasil, o quadro epidemiológico atual caracteriza-se pela coexistência de doenças degenerativas e endêmicas, e o retorno de velhas doenças infecciosas. Malária, leishmaniose, hanseníase, tuberculose, entre outras, representaram, e ainda representam, grandes problemas de saúde, particularmente na região amazônica. A melhoria da qualidade de vida nos países do hemisfério norte, bem como os efeitos da revolução Industrial e, particularmente, os fenômenos de urbanização e aceleração tecnológica, restringiram essas doenças às “áreas pobres” do mundo, dentre essas, as zonas tropicais (Sá *et al.* 1992).

Por muitos anos, as Leishmanioses têm sido um problema de saúde pública subestimado, no entanto nos últimos dez anos, regiões endêmicas têm apresentado um aumento significativo nos números de casos da doença. Apesar da declaração ser compulsória, somente trinta e dois dos oitenta e oito países afetados pelas leishmanioses possuem registro substancial de novos casos. Na realidade, dois milhões de novos casos ocorrem anualmente nas áreas tropicais e subtropicais do globo, com uma estimativa de doze milhões de pessoas atualmente infectadas no mundo e trezentos e cinquenta milhões sob risco de infecção (Figura 1). Destes novos casos um milhão e meio são de leishmaniose cutânea e quinhentos mil de visceral. Apesar dos surpreendentes números, somente seiscentas mil infecções são oficialmente registradas a cada ano (ANVISA 2003, WHO 2006).

Como muitas doenças relacionadas com as desigualdades sociais, nesta também ocorre uma alta morbidade e uma baixa mortalidade, isso porque a leishmaniose se apresenta invisível, visto que a maioria dos infectados vive em áreas afastadas dos centros urbanos, em parte devido ao estigma social, pois as deformidades e as cicatrizes desfigurantes causadas por esta doença mantém os pacientes

escondidos. As inaptidões relacionadas com a doença impõem um grande fardo social, especialmente para mulheres, e prejudicam as produtividades econômicas, impedindo assim, o desenvolvimento socioeconômico das regiões endêmicas (WHO 2006).

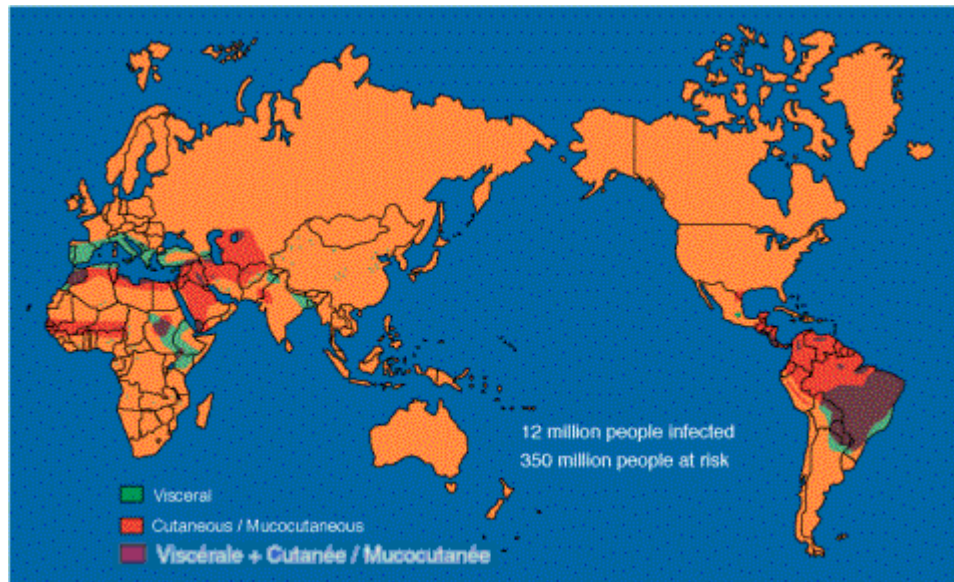


Figura 1: Distribuição mundial da Leishmaniose (Handman 2000)

Em várias áreas do mundo, há um nítido aumento no número de casos e neste contexto também se encontra o Brasil, visto que de 1998 até 2002 ocorreu um aumento de aproximadamente 18.200 casos de leishmaniose cutânea e 4.160 de leishmaniose visceral (Desjeux 2004). No Brasil, a leishmaniose visceral atinge 19 estados, especialmente da região Nordeste, onde estão concentrados mais de 90% dos casos humanos da doença. Há focos importantes também nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, nas duas últimas décadas tem havido um crescente aumento da incidência, com uma média anual nos últimos cinco anos de 3.500 casos (Figura 2). O aumento da incidência da leishmaniose está associado com o desenvolvimento urbano, devastações florestais, mudanças ambientais e migrações de pessoas para áreas onde a doença é endêmica e ainda mudanças na suscetibilidade do hospedeiro humano à infecção como no caso de

imunossupressão e desnutrição (Carvalho *et al.* 2000, Patz *et al.* 2000, Ashford 2000, Silva e Camargo-Neves 2006).

As leishmanioses, em especial a Leishmaniose visceral (LV), tem sido associadas a infecções por HIV. O impacto destas co-infecções pode ser enorme em países como a Índia, Sudão e, possivelmente, no Brasil e região mediterrânea, podendo mudar a epidemiologia da LV. Alguns desses fatores podem ser diminuídos com a aplicação de estratégias de controle, associadas às entidades eco-epidemiológicas e ajustados às mudanças ambientais com auxílio dos novos avanços metodológicos de informação geográfica e da pesquisa científica (Desjeux 2001, Guerin *et al.* 2002).

As manifestações clínicas da doença são variáveis e dependem da associação entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imunológica do hospedeiro (Pearson e Souza 1996). De acordo com as manifestações clínicas, as leishmanioses podem ser classificadas, particularmente, num complexo de três grupos: leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea e difusa. A forma cutânea caracteriza-se por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor e que podem levar meses para cicatrizar. Já a forma mucocutânea causa, no início, úlceras na pele similares aquelas da leishmaniose cutânea que, entretanto, cicatrizam para depois reaparecerem, principalmente, nas mucosas do nariz e da boca, geralmente esta forma é acompanhada por infecções secundárias e destruição de grandes extensões de tecido. A leishmaniose visceral, conhecida como calazar, é uma doença sistêmica muito grave, com migração dos parasitos para o fígado, baço e medula óssea, podendo levar o hospedeiro à morte (Handman 2000, Carvalho 2000).

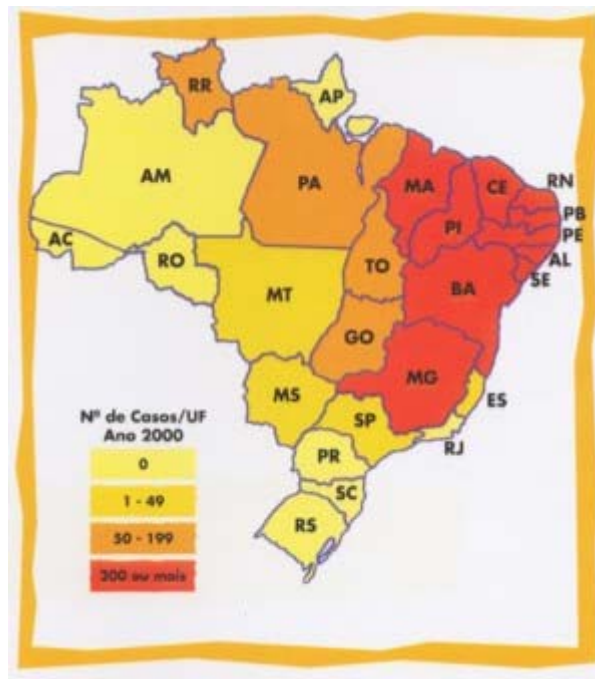


Figura 2: Distribuição dos casos de leishmaniose no Brasil (FUNASA 2001)

Essas doenças infecciosas que acometem humanos e outros vertebrados são causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae) e transmitidas por insetos fêmeas da subfamília Phlebotominae (*Phlebotomus sp* e *Lutzomyia sp*). O gênero *Leishmania* compreende muitas espécies epidemiologicamente diversas e complexas, que podem ser agrupadas, segundo Lainson e Shaw (1987), em dois sub-gêneros, *Leishmania* e *Viannia*, tendo por base o desenvolvimento natural do parasito no seu vetor (Grimaldi e Tesh 1993, Genaro 2000). Até o momento, foram identificadas, no Brasil, seis espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. A principal é *Leishmania (Viannia) braziliensis*, encontrada em todas as zonas endêmicas do país e associada à presença de animais domésticos. As outras são a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (estas espécies predominam na região norte do Brasil) (Gontijo e Carvalho 2003). Os reservatórios primários do parasito são os animais silvestres. Porém, os animais que

convivem diretamente com o homem, como o cão e o cavalo, servem, secundariamente, como reservatórios (Oliveira-Neto *et al.* 2000).

2) Ciclo biológico

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças que apresentam características clínicas, histopatológicas e imunológicas distintas, sendo uma protozoose causada por parasitos intracelulares do sistema fagocítico mononuclear. Essa doença é uma zoonose primariamente de animais silvestres, sobretudo roedores, sendo transmitida por flebotomíneos. Seres humanos possuem uma suscetibilidade variada à doença, embora não faça parte da cadeia de transmissão habitual (Veronesi 1991, Carvalho 2000).

A *Leishmania* é um parasito que, para sua multiplicação no hospedeiro, se apresenta obrigatoriamente na forma intracelular. Durante o ciclo evolutivo (Figura 3), estes protozoários apresentam duas formas básicas, amastigotas e promastigotas. As promastigotas vivem no lúmen do tubo digestivo do inseto vetor e são formas alongadas, flageladas e móveis, enquanto as amastigotas são formas arredondadas sem flagelo aparente e que infectam células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado (Chang, 1990).

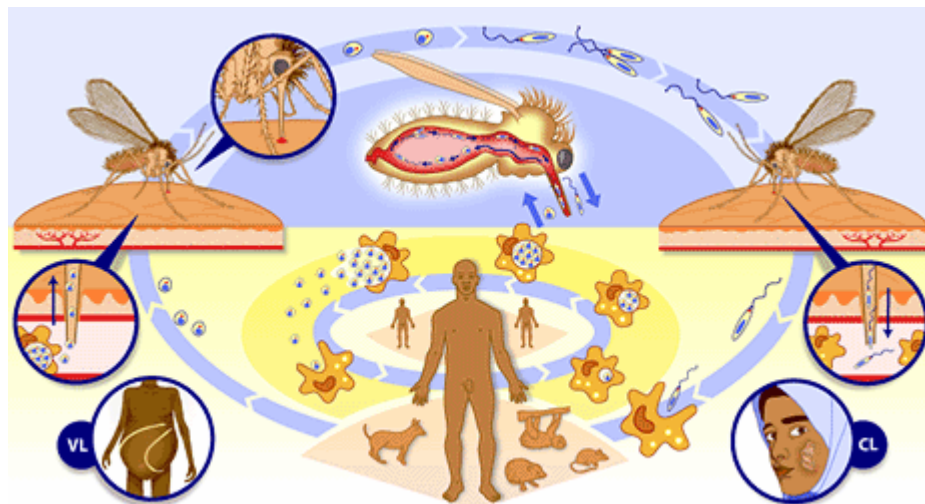


Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania*. Abreviações: VL – Leishmaniose visceral, CL – Leishmania cutânea. (Fonte: WHO 2006)

Uma vez inoculada na pele do hospedeiro, pela picada do mosquito, a forma promastigota metacíclica (infectiva) liga-se por receptores específicos aos macrófagos e é fagocitada, elas são imunes aos ácidos e enzimas dos lisossomos com que os macrófagos tentam digerí-las e transformam-se nas formas amastigotas após algumas horas. Então começam a multiplicar-se por divisão binária, saindo para o sangue ou linfa por exocitose e no momento em que a célula hospedeira está densamente parasitada, há o rompimento de sua membrana e as amastigotas disseminam pelos tecidos, infectando novos macrófagos, exarcebando assim, o quadro de infecção (Russeal 1995).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas que se reproduzem por divisão binária e se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, estas também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As amastigotas ingeridas pelos insetos transmissores demoram oito dias ou mais para se diferenciar em promastigotas. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas fechando, dessa forma, o ciclo biológico de transmissão deste protozoário (Alexander *et al.* 1999, Burchmore e Barrett 2001).

3) Tratamento e recursos naturais

O diagnóstico precoce da leishmaniose é essencial para que a resposta terapêutica seja mais efetiva e sejam evitadas as seqüelas deformantes e/ou funcionais (Oliveira-Neto *et al.* 2000). Entre os fármacos disponíveis para o tratamento, encontram-se o alopurinol, que tem sido explorado clinicamente no tratamento da leishmaniose cutânea

(Martinez *et al.* 1992). Os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina (Glucantine) e o estibogluconato de sódio (Pentostan) formam a “primeira-linha” de fármacos no tratamento das leishmanioses cutâneas (McGreevy *et al.* 1986, Berman 2003). Uma “segunda-linha” de fármacos é empregada no tratamento de leishmaniose visceral (Anfotericina B). A duração da terapia e a resposta clínica variam de região a região e da interação patógeno-hospedeiro.

Os antimoniais pentavalentes são indicados para o tratamento de todos os tipos de manifestação clínica de leishmaniose, embora as formas mucosas e mucocutâneas exijam maiores cuidados por apresentarem respostas mais lentas e maior possibilidade residual. As drogas de segunda escolha são a Anfotericina B e a Pentamidina. Recentemente tem-se reportado resistência aos fármacos de primeira escolha requerendo o uso de compostos mais tóxicos como os de segunda escolha (Rocha *et al.* 2005).

Na prática, a aplicação de altas doses por prolongados períodos é comum. A anfotericina B apresenta efeitos colaterais indesejados e até graves como artralgias, inapetência, neuralgia, náuseas entre outros, portanto a necessidade de sua administração em hospitais é uma dificuldade adicional no tratamento, em se considerando as condições de saúde pública prevalentes nas regiões endêmicas (Berman 1997, 2003). Além disso, os fármacos utilizados apresentam alto custo, requerem um regime de tratamento longo e estão se tornando cada vez menos efetivos (Rocha *et al.* 2005).

Esta terapia tem se mostrado pouco eficiente em diversos casos. Em pacientes resistentes ao Glucantine e ao Fungizon não se identificam alternativas eficazes. Tende-se a repetir o tratamento, com doses nos limites da tolerância ou a utilizar o isotionato de pentamidina como uma última alternativa. Aliado a baixa eficácia de tratamento, se observam também diversas reações de toxicidade severa que vão desde náusea, vômitos e mialgia até, nos casos mais graves o choque, alterações eletrocardiográficas, hipersensibilidade, anemia e trombose venosa (Berman 1997).

Além disso, os fármacos possuem uma eficácia variável, pois a administração é feita por via parenteral por períodos prolongados, levando o paciente, muitas vezes, a não completar o esquema terapêutico (Craft 2006). Tais características indesejáveis, associadas ao aparecimento de formas resistentes de *Leishmania* (Geary *et al.* 1989) e a ausência de medidas profiláticas eficientes e de uma vacina efetiva, têm exacerbado a necessidade do desenvolvimento de fármacos antileishmanióticos mais eficazes e menos tóxicos ao paciente. A toxicidade é particularmente severa no tratamento de crianças e idosos ou indivíduos portadores de infecções oportunistas secundárias. Novas estratégias de controle e ou combate à doença devem ser investigadas

Diante disto, sabe-se que os produtos naturais sempre foram procurados pelas indústrias agroquímica e farmacêutica como fonte de novas substâncias ativas com objetivo de extração e síntese de novos compostos químicos ativos, apesar de todo avanço no planejamento racional de fármacos, síntese química e química combinatória (Verdine 1996, Harvey 2000). O uso empírico de plantas medicinais pela população tem demonstrado que caule, raízes, folhas, sementes e frutos de plantas apresentam eficiência na cura de diversos males, suscitando assim grande interesse no estudo científico destas plantas. Nos últimos anos, as plantas tornaram-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, 25% dos medicamentos do mercado farmacêutico possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de fármacos semi-sintéticos (Bergmann *et al.* 1997).

A observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos compostos ativos de várias espécies vegetais. metabólitos secundários tais como alcalóides, terpenóides, flavonóides, considerados no passado como inativos, são hoje ferramentas importantes no tratamento e investigação clínica. Compostos que estimulam o sistema imune são úteis quando usados como adjuvantes no tratamento de certas doenças causadas por fungos, bactérias e protozoários, como na leishmaniose. Neste caso, estudos químicos e

imunofarmacológicos têm sido realizados com o intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis de efeito específico e que reverta a resistência do parasito aos fármacos (Bergmann *et al.* 1997).

Um número grande de extratos de plantas, algumas de uso tradicional, foi mostrado possuir atividade contra espécies de *Leishmania* e em alguns casos as substâncias ativas foram identificadas. Resultados obtidos com extrato de plantas, *in vivo* e *in vitro*, demonstram que a atividade pode ser encontrada numa extensa diversidade de famílias, das quais se destacam Crassulaceae (gênero *Kalanchoe*), Annonaceae (muitos gêneros), Piperaceae (especialmete o gênero *Piper*), Rutaceae (com destaque para o gênero *Galipea*) e Apocynaceae (gênero *Peschiera* entre outros). Classes químicas que se distinguem incluem alcalóides e chalconas que foram demonstrados agir diretamente sobre o parasito, enquanto outras classes que abrangem uma variedade de substâncias fenólicas, terpênicas e polissacarídeos parecem agir sobre o macrófago estimulando-o a produzir óxido nítrico, mediadores de reação imunológica letais ao parasito sem prejudicar o próprio macrófago (Gilbert e Favoreto 2005).

Dentre as numerosas plantas com potencial na modulação da resposta imune na leishmaniose, a *Kalanchoe pinata* tem demonstrado efeito sobre a redução das lesões em camundongos de linhagem susceptível pelo aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (Bergmann *et al.* 1997). Outra espécie *Solanum lyratum* Thunb (Solanaceae), utilizada na medicina Coreana, também aumenta a produção de óxido nítrico produzido por macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos, o que sugere possível atividade terapêutica no tratamento da leishmaniose (Kim *et al.* 1999).

O efeito leishmanicida dos compostos isolados das espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas promastigostas e/ou amastigota de *Leishmania*; dentre eles terpenóides de *Artemisia annua* (Yang *et al.* 1992), de *Peperomia galioides* (Mahiou *et al.* 1995) e de *Guarea rhopalocarpa* (Camacho *et al.* 2000); aminoglicosteróides e

aminosteróides de *Holarrhena curtisii* (Kam *et al.* 1997), naftoquinonas de *Pera benensis* (Fournet *et al.* 1992, Kayser *et al.* 2000), iridóides glicosídicos de *Picrorhiza kurroa* (Mittal *et al.* 1998); flavonóides de *Centrolobium sclerophyllum* (Araújo *et al.* 1998) e neolignananas de *Virola surinamensis* (Barata *et al.* 2000).

Além destes compostos, os alcalóides também têm sido muito estudados quanto ao seu potencial leishmanicida. Muitos destes alcalóides são isolados de espécies vegetais nativas bolivianas, utilizadas pelos indígenas quimane dentre elas: *Cardiopetalum calophyllum*, *Abuta rufescens* e *Abuta pahnii* (revisto por Fournet *et al.* 1992).

Dentre os alcalóides, a isotetrandrina isolada de *Limaciopsis loangensis* da família Menispermaceae tem efeito leishmanicida similar ou maior que o glucantime em modelos experimentais *in vivo* sobre a infecção causada por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania venezuelensis* (Fournet *et al.* 1992). Foram também isolados dois alcalóides quinolínicos da *Galipea longiflora* da família Rutaceae, que apresentam efeito leishmanicida *in vivo* da infecção causada por estas duas espécies de *Leishmania* (Fournet *et al.* 1993).

Além de apresentarem efeito sobre a infecção do Novo Mundo em camundongos, estudos toxicológicos de alguns dos alcalóides sugerem ausência de efeitos tóxicos em doses bioativas, em curto prazo de tempo (Fournet *et al.* 1993). O estudo de compostos ativos de plantas pode se tornar um método alternativo na busca pelo controle e tratamento da doença. Grande parte das drogas antiparasitárias foram desenvolvidas sem um estudo detalhado. O mecanismo de ação e interação em humanos é geralmente descoberto após a liberação do uso destes medicamentos (Davis *et al.* 2004). Por isso, é importante e necessário definir diferenças metabólicas entre parasito e seu hospedeiro.

4) Metabolismo

Vários membros da família Trypanosomatidae geram energia por uma mesma via metabólica, entretanto diferenças fundamentais também existem e não são sempre conhecidas. A *Leishmania* e o *Trypanosoma* são membros da família dos tripanosomatídeos, apresentam ciclos de vida complexos, envolvendo, ambos, hospedeiros vertebrados e o inseto vetor. Durante seu ciclo de vida os parasitos adaptam seu metabolismo com a disponibilidade de alimentos, ou melhor, com os substratos disponíveis. A glicose é a maior fonte de energia pra maioria dos estágios nos hospedeiros vertebrados, no entanto, os estágios no inseto preferem aminoácidos, como a prolina, e não a glicose como fonte de energia, porém a via glicolítica é sempre ativa. A prolina e o glutamato são os dois substratos mais importantes utilizados e são oxidados em α -cetoglutarato e degradados até succinato via ciclo de Krebs e podem ser importantes somente nos estágios onde este ciclo é ativo (Tielens e Van Hellemond 1998).

Os tripanossomatídeos degradam carboidratos pela via glicolítica e em todos os membros desta família a primeira reação ocorre dentro do glicosomo, organela única da ordem Kinetoplastida (Opperdoes 1995, Clayton e Michels 1996). Enzimas glicolíticas como a hexoquinase, fosfofrutoquinase, frutose-1,6-bifosfatase, glicerol-3-fosfato-desidrogenase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, gliceroquinase, fosfoglicerato, estão presentes nessa organela (Galbraith, 1991, Urbina 1994).

O piruvato é o produto final da glicólise e é freqüentemente degradado por uma mitocôndria única, no entanto, a participação mitocondrial na degradação dos carboidratos varia muito, embora todos tripanossomatídeos possuam somente uma mitocôndria durante todo ciclo de vida (Figura 4). As promastigotas de *Leishmania* possuem um metabolismo energético no qual pequena parte do carboidrato é oxidado completamente em CO_2 , via ciclo de Krebs, mas grande parte é oxidado em produtos como acetato, piruvato e succinato que são também produtos finais da glicose (Cazzulo 1992). Uma pequena parte do piruvato é transaminado em alanina que é excretada (Blum 1993).

Nas promastigotas, parte dos produtos finais oxidados são resultados do metabolismo aeróbio envolvendo uma cadeia transportadora de elétrons com um aceptor final de oxigênio como no *Trypanosoma* em condições aeróbias. O succinato produzido durante incubações de promastigotas em condições aeróbias é principalmente produzido via oxidativa envolvendo parte do ciclo de Krebs (de oxalacetato via citrato até succinato) e oxidação de NADH via cadeia respiratória (Van Hellemond *et al.* 1997).

As formas amastigotas são intracelulares e possuem uma mitocôndria reduzida denominada pró-mitocôndria. Isto sugere um metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, semelhante nas promastigotas, porém ambos os estágios são dependentes da atividade do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória semelhante aos mamíferos, embora os ácidos graxos provavelmente sejam os mais importantes substratos para os estágios no inseto, como na *L. mexicana* (Hart e Coombs 1982).

Outra via de degradação de glicose, a pentose fosfato, é também ativa nos tripanossomatídeos. Esta via não é muito utilizada no catabolismo de substratos (glicose), pois são necessários ribose 5-fosfato (biossíntese de nucleotídeos) e NADPH, e não estão disponíveis para o parasito. Assim a atividade da pentose fosfato na *Leishmania* é extremamente dependente de condições de cultura (Barrett 1997).

Metabolismo de Carboidratos - PROMASTIGOTAS

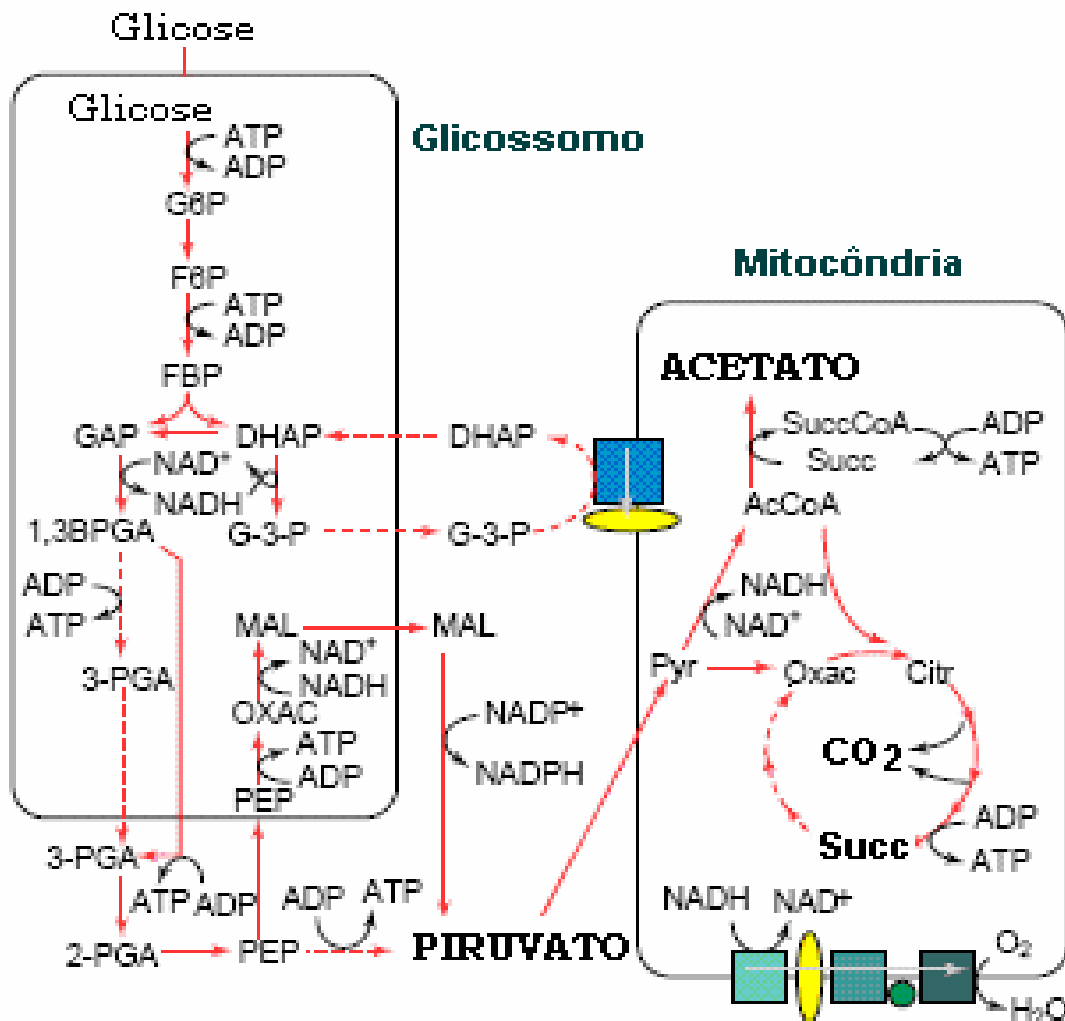


Figura 4: Vias de degradação de carboidratos (metabolismo aeróbio) na *Leishmania*. Os produtos finais estão em negrito e as linhas pontilhadas indicam vias menos utilizadas. O complexo enzimático envolvido no transporte de elétrons são indicados por quadrados verdes e azuis e o complexo ubiquinona/ubiquinol por elipses amarelas. Legenda: AcCoA – acetil-CoA, Citr – citrato, DHAP – diidroxiacetona fosfato, FBP - frutose 2,6 bifosfato, F6P - frutose 6-fosfato, GAP - gliceraldeído 3-fosfato, G3P - glicerol 3-fosfato, G6P - glicose 6-fosfato, F6P - frutose 6 fosfato, MAL – malato, Oxac – oxalacetato, PEP – fosfoenolpiruvato, Pyr – piruvato, Succ – succinato, SuccCoA - succinil-CoA, 1,3BPGA - 1,3 bifosfoglicerato, 2-PGA – 2 fosfoglicerato, 3-PGA - 3-fosfoglicerato. (Adaptado de Tiellens e Van Hellemond 1998)

Durante o ciclo de vida, os tripanossomatídeos encontram grandes variações de viabilidade de oxigênio, visto que as formas sanguíneas possuem muito oxigênio viável, enquanto certos estágios, como no inseto, podem se confrontar com condições de hipóxia. Surpreendentemente existem diferenças na capacidade anaeróbia dos tripanossomatídeos, formas sanguínea de *Trypanosoma brucei* são organismos anaeróbios facultativos e possuem funções adequadas na ausência de oxigênio, enquanto que as promastigotas de *Leishmania* possuem baixa capacidade funcional anaeróbia e utilizam o metabolismo de reserva durante a anóxia (Van Hellemond *et al.* 1997, Van Hellemond e Tielens 1997).

As promastigotas não são resistentes a anóxia, elas começam se mover lentamente ou ficam inertes e não proliferam quando a tensão de oxigênio é baixa (Van Hellemond e Tielens 1997, Hart e Coombs 1981). Elas possuem uma pobre capacidade anaeróbia e dependem principalmente da respiração para gerar energia. Entretanto, embora as promastigotas aparentemente não possuam um metabolismo anaeróbio facultativo como o *T. brucei*, elas são tolerantes a hipóxia por um extenso período e a inibição de sua cadeia respiratória resulta numa reversão das condições no qual o metabolismo é reduzido a níveis mínimos, podendo induzir a uma estivação das promastigotas. Esta habilidade garante a sobrevivência em condições adversas e muitas vezes previne o desenvolvimento durante o estágio no mosquito (Van Hellemond e Tielens 1997).

Quanto à cadeia respiratória existe uma diferença essencial entre os vários estágios de desenvolvimento, pois todas as espécies e estágios possuem muitos tipos de cadeia transportadora com oxidases terminais que usam o oxigênio como aceptor final de elétrons. As promastigotas possuem uma clássica cadeia respiratória, mas carece de uma oxidase alternativa que esta presente em outros tripanossomatídeos (Martin e Mukkada 1979). Isto tem sido apresentado porque as promastigotas são extremamente dependentes desta clássica cadeia respiratória para sua

geração de energia. Isto está de acordo com a observação que as promastigotas possuem um metabolismo energético no qual a maioria dos carboidratos é degradada e parcialmente oxidada até os produtos finais como acetato, succinato e piruvato, um processo que concomitantemente produz NADH que é re-oxidado pela cadeia respiratória (Van Hellemond *et al.* 1997).

Em muitos tripanossomatídeos o succinato é um produto final do metabolismo energético. Tem sido sugerido que este succinato é produzido pela fumarato redutase uma enzima homóloga a succinato desidrogenase do ciclo de Krebs, que catalisa a reação reversa – oxidação do succinato. A fumarato redutase é bem conhecida em bactérias e em helmintos, onde sua função está na absorção de elétrons no metabolismo anaeróbico destes organismos. Entretanto é pouco provável que a fumarato redução ocorra significativamente nos tripanossomatídeos (Ackrell *et al.* 1992, Tielens 1994).

Nas promastigotas o succinato é produzido principalmente por normal funcionamento do ciclo de Krebs. Somente os estágios que possuem ciclo de Krebs ativo produzem succinato, o que indica que estes dois processos são observados no parasito e que a redução de fumarato tem ocorrido ao mesmo tempo em que a oxidação do succinato, bioenergeticamente é um evento improvável em uma mitocôndria única (Tielens e Van Hellemond 1998).

Sendo assim, a compreensão metabólica e o conhecimento aprimorado dos mecanismos metabólicos específicos do parasito e de seu hospedeiro amplia a possibilidade de um combate mais acentuado e eficaz às muitas doenças que atingem o homem. Estabelecer diferenças metabólicas nesta relação possibilita a determinação de medidas terapêuticas de controle e combate dos parasitos através de alvos específicos nos quais o uso de compostos naturais ou sintéticos não propicie danos ao hospedeiro, porém seja letal ao parasito.

JUSTIFICATIVA

A eficácia do controle e tratamento de uma doença parasitária depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia em geral do parasito. No passado, homens eram tratados com produtos extraídos de plantas por administração exclusivamente oral, pois se acreditava que o sítio das infecções fosse o trato intestinal. Os avanços dos conhecimentos anatômicos, bioquímicos e estudos fisiológicos, e o entendimento de quase todos os ciclos de vida dos parasitos no homem, permitem que atualmente se realize um processo de planejamento de tratamento de maneira mais racional, com ênfase no mecanismo de ação (Frayha *et al.* 1997), visando atingir diretamente os alvos específicos e essenciais dos parasitos. Explorando as diferenças entre o metabolismo do hospedeiro e do parasito, pode-se determinar importantes mecanismos de ação de fármacos.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), associada a outros órgãos de pesquisas têm estimulado a investigação de novos extratos de plantas nativas como alternativa para o tratamento e combate das doenças parasitárias (Bodeker e Willcox 2000). Torna-se importante destacar que o Brasil é privilegiado por possuir uma riqueza imensa de espécies vegetais e que esse potencial vem sendo reduzido devido ao avanço da agricultura e devido as queimadas, onde várias espécies de plantas, com potenciais antiparasitários, além de outras importantes propriedades, estão sendo extintas.

Dentro deste contexto está a região Centro-Oeste, formada pela flora do Cerrado, que representa o segundo maior bioma vegetal brasileiro. Esse importante recurso natural carece de estudos mais profundos e aplicados, visando o encontro de formas alternativas para garantir a saúde da população de forma menos onerosa, eficiente e segura, além de chamar atenção para a necessidade de preservação do ecossistema. Assim, várias espécies da flora do cerrado são consideradas plantas taníferas, por apresentarem altos teores de taninos que contribui na defesa das plantas contra ataque de

herbívoros, além de limitar o crescimento de microorganismos patogênicos (Alcanfor *et al.* 1999, Silva *et al.* 1999).

Um fator relevante é a análise de como atuam estas substâncias em hospedeiros ou parasitos, e se destes produtos poderiam ser extraídos componentes específicos ao metabolismo, que pudessem inibir determinada reação metabólica vital (Bezerra e Becker 1994, 1997, 1999, Herzog-Soares *et al.* 1999). Portanto, além dos bioensaios pode-se estabelecer análise com ácidos orgânicos, indicadores do perfil metabólico, frente às situações fisiológicas expostas. Os ácidos orgânicos são essências como indicadores de distúrbios biológicos e importantes componentes no metabolismo intermediário e energético de todos os seres vivos (Scriver *et al.* 1989). A detecção e quantificação de tais ácidos orgânicos são importantes em muitas áreas de biotecnologia.

Estes estudos estão sendo viabilizados utilizando-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), através de uma coluna específica para análise de ácidos orgânicos. Trata-se de um método aplicado em exames de distúrbios fisiológicos, principalmente no campo da medicina para análise de pequenos volumes de urina ou soro de recém-nascidos (Kohlschutter *et al.* 1982, Daish e Leonard 1985, Scriver *et al.* 1989), com comprovada adaptação para o estudo da relação entre hospedeiros e parasitos (Bezerra 1994).

OBJETIVOS

- Avaliar a excreção e o consumo dos ácidos orgânicos em *L. amazonensis* como subsídios ao conhecimento das vias glicolíticas, cadeia respiratória e atividades do ciclo de Krebs.
- Validar técnicas de estudos bioquímicos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o monitoramento do perfil metabólico de parasitos.
- Avaliar a bioatividade de extratos brutos de *Magonia pubescens* (tingui) e de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) em culturas de formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- Estudar a ação de produtos naturais na bioquímica de promastigotas de *L. amazonensis*, avaliando o efeito metabólico dessa interação nos ácidos orgânicos, indicadores metabólicos.

Artigo 1

**AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis* ATRAVÉS
DA ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS REALIZADA POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).**

RESUMO

O conhecimento aprofundado e detalhado do metabolismo gera novas oportunidades terapêuticas tendo como alvo vias essenciais do parasito que não afete o hospedeiro. As vias bioquímicas ausentes em humanos podem ser aquelas que controlam a virulência do parasito, e as suas atenuações podem reduzir a gravidade da doença. O metabolismo energético dos parasitos do gênero *Leishmania* é baseado, praticamente, em carboidratos e aminoácidos. As promastigotas usam preferencialmente aminoácidos para obtenção de energia, que são oxidados em α -cetogluturato e degradados até succinato via ciclo de Krebs e podem ser importantes somente nos estágios onde este ciclo é ativo. As promastigotas de *Leishmania* possuem um metabolismo energético no qual pequena parte do carboidrato é oxidado completamente em CO_2 , via ciclo de Krebs, mas grande parte é oxidado em produtos como acetato, piruvato e succinato que são também produtos finais da glicose. É interessante ressaltar que a eficácia do controle e tratamento de uma doença parasitária depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia em geral do parasito. O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi viabilizado neste trabalho como alternativa para estudo e monitoramento do perfil metabólico das promastigotas de *L. amazonensis*. Foi detectado na cultura de promastigotas lactato, oxalato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato e propionato, sendo que destes ácidos somente o succinato não foi constatado como constituinte do meio de cultura demonstrando ser excretado pelos parasitos a partir do quarto dia. As promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram glicólise, ciclo de Krebs, metabolismo de ácidos graxos e cadeia respiratória ativos, pois os ácidos orgânicos encontrados são produtos de tais vias enzimáticas.

Palavras chave: metabolismo, ácidos orgânicos, promastigotas, CLAE.

ABSTRACT

The knowledge deepened and detailed of the metabolism generates new therapeutical chances having as white essential pathways of the parasite that does not affect the host. The pathways absent biochemists in human beings can be those that control the virulence of the parasite, and its attenuations can reduce the gravity of the disease, the energy metabolism of the parasites of the *Leishmania* sort are based, practically, in carbohydrates and amino acids. Promastigotes referential uses amino acids for energy attainment, that are oxidated in α -ketoglutarate and degraded until succinate it saw cycle of Krebs and only can be important in the periods of training where this cycle is active. Promastigotes of *Leishmania* possess an energy metabolism in the which small part of the carbohydrate is oxidated completely in CO_2 , saw cycle of Krebs, but great part is oxidated in products as acetate, piruvate and succinate that are also end products of the glucose. It is interesting to stand out that the effectiveness of the control and treatment of a parasitic disease depends on the detailed knowledge of the cycle of life, metabolism and biology in general of the parasite. The liquid chromatography high performace method (HPLC) was made possible in this work as alternative for study and monitorament of the metabolic profile of *L. amazonensis* promastigotes. It was detected in the culture of promastigotes lactate, oxalate, citrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate and propionate, being that of the this acid only succinate it was not only evidenced as constituent of the way of culture demonstrating to be excreted by the parasites from the fourth day. Promastigotes of *L. amazonensis* had presented glycolyse, cycle of Krebs, active metabolism of fatty acid and respiratory chain, therefore the organic acid founded are products of such enzymatic pathways.

Key words: metabolism, organic acid, promastigotes, HPLC.

INTRODUÇÃO

Recentemente tem ocorrido um aumento significativo nos casos de leishmanioses em áreas peri-urbanas de grandes cidades, particularmente no país. As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades que atingem o homem, causadas por diferentes espécies morfológicamente semelhantes pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, sendo diferenciadas apenas por métodos bioquímicos, imunológicos ou mesmo patológicos, são zoonoses classificadas em oito diferentes grupos segundo a sintomatologia e espécie de parasito envolvido, afetando o sistema fagocítico mononuclear (Lainson and Shaw 1987).

Características indesejáveis, quanto à terapêutica, associadas ao aparecimento de formas resistentes de *Leishmania* (Geary *et al.* 1989), têm destacado a necessidade do desenvolvimento de fármacos antileishmanióticos mais eficazes e menos tóxicos ao paciente. A abordagem moderna de desenvolvimento racional de drogas se baseia na identificação de vias metabólicas indispensáveis à sobrevivência do parasito. Após seleção dos alvos biológicos, o objetivo passa a ser a caracterização detalhada dos componentes da via enzimática envolvida. Enzimas chave podem ser exploradas para o desenvolvimento de inibidores da reação enzimática, sem afetar o hospedeiro (Kayser *et al.* 2000, Khabnadideh *et al.* 2000).

O bloqueio de vias essenciais ao parasito gera novas oportunidades terapêuticas. No caso de uma enzima não essencial ao parasito e que não está presente no hospedeiro, pode ser desenvolvida um fármaco com um composto ativo sobre o parasito e não sobre o hospedeiro. As vias bioquímicas ausentes em humanos podem ser aquelas que controlam a virulência do parasito e suas atenuações podem reduzir a gravidade da doença (Davis *et al.* 2004).

O metabolismo energético dos parasitos do gênero *Leishmania* é baseado, praticamente, em carboidratos e aminoácidos (Cazzulo *et al.* 1985). A glicose é a principal fonte de energia, sendo o catabolismo de

aminoácidos o mais utilizado pelas formas intracelulares amastigotas. Os estágios no inseto (promastigotas) preferem aminoácidos, como a prolina como fonte de energia, porém a via glicolítica é sempre ativa. A prolina e o glutamato são os dois substratos mais importantes utilizados e são oxidados em α -cetoglutarato e degradados até succinato via ciclo de Krebs e podem ser importantes somente nos estágios onde este ciclo é ativo (Tielens e Van Hellemond 1998).

As promastigotas de *Leishmania spp.* possuem um metabolismo energético no qual pequena parte do carboidrato é oxidado completamente em CO_2 , via ciclo de Krebs, mas grande parte é oxidado em produtos como acetato, piruvato e succinato que são também produtos finais da glicose (Cazzulo 1992). Parte dos produtos finais oxidados são resultados do metabolismo aeróbio envolvendo uma cadeia transportadora de elétrons com um acceptor final de oxigênio. O succinato produzido durante incubações de promastigotas em condições aeróbias é principalmente produzido via oxidativa envolvendo parte do ciclo de Krebs (de oxalacetato via citrato até succinato) e oxidação de NADH via cadeia respiratória (Van Hellemond *et al.* 1997).

É interessante ressaltar que a eficácia do controle e tratamento de uma doença parasitária depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia em geral do parasito (Frayha *et al.* 1997). Baseado na necessidade de se conhecer melhor a atividade metabólica do parasito, testes de análises dos ácidos orgânicos excretados e presentes em culturas de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram viabilizados por meio do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como alternativa do estudo e monitoramento do perfil metabólico, visando encontrar futuros alvos terapêuticos.

Este trabalho tem por objetivo validar técnicas de estudos bioquímicos através do CLAE avaliando excreção ou consumo dos ácidos orgânicos em promastigotas de *L. amazonensis*, estudando vias enzimáticas, cadeia respiratória ou atividades do ciclo de Krebs.

MATERIAL E MÉTODOS

Os parasitos utilizados no presente trabalho foram formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), cuja cultura original foi, gentilmente, cedida pelo Laboratório de citocinas e imunobiologia das leishmanioses do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública -UFG, de responsabilidade do Professor Doutor Milton Adriano Pelli de Oliveira. Os parasitos de fase logarítmica (promastigotas pró-cíclicas) e de fase estacionária (promastigotas metacíclicas) foram isolados e criopreservados em nitrogênio líquido ou em freezer -70°C até o uso.

As amostras de formas promastigotas foram mantidas em estufa à 26°C através de cultivo *in vitro* em placas ou frascos de plástico de 75 cm^2 (BECTON-DICKINSON) e repicadas a cada dois dias a partir de 1×10^5 promastigotas/ml em um meio líquido de cultura Grace, suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sartori *et al.* 1997).

A criopreservação foi realizada, preferencialmente, com parasitos na fase logarítmica (log) de crescimento, visto que os parasitos nesta fase estão no início do desenvolvimento e apresentam maior multiplicação. As promastigotas foram centrifugadas a 1169g a 10°C por 15 minutos e foram ressuspensas e conservadas com 50% de meio de cultura completo, juntamente com meio de congelamento (DMSO 10%), acrescido de 70% de soro bovino fetal, e levadas para congelamento a -70°C . O descongelamento foi realizado uma vez a cada um mês para cultivo em meio de cultura Grace completo.

A curva de crescimento das promastigotas foi estabelecida pela metodologia descrita por Brener (1961) adaptada para microscópio binocular. O número de parasitos foi quantificado em intervalos de 24 horas por sete dias consecutivos, quando se inicia a morte das formas promastigotas. A quantificação foi realizada em Câmara de Neubauer e as promastigotas foram diluídas com formoldeido para contagem.

A avaliação do crescimento dos parasitos na fase log, na qual ocorre a presença de formas promastigotas pró-cíclicas, foi definida entre o primeiro e o terceiro dia. A fase estacionária, considerada mais infectante devido a maior concentração de formas promastigotas metacíclicas, ocorre a partir do quarto dia, com declínio iniciando no quinto dia, quando os parasitos começam a morrer. A avaliação do desenvolvimento e multiplicação das promastigotas foi realizada através de uma curva de crescimento resultante dessa quantificação durante sete dias de crescimento.

As amostras foram extraídas do meio de cultura contendo as formas promastigotas no início, no segundo, quarto e sexto dias da cultura, totalizando quatro amostras por cultura avaliada. Foram retiradas amostras de 250 μ L de cada cultura realizada e estas foram extraídas com auxílio de uma bomba de vácuo através de uma coluna Varian de extração denominada Bond Elut (SAX-anion exchange-quaternary amine, Analytichem International, Harbor city, USA), adequada para separação em fase sólida, como descrito por Bezerra *et al.* (1997, 1999). O meio de cultura sem cultivo de formas promastigotas também foi submetido à extração como forma de controle na análise dos ácidos orgânicos e produtos finais do metabolismo dos parasitos.

As colunas de extração foram ativadas na caixa de vácuo com 1 mL de ácido clorídrico a 0,5 mol/L, 1 mL de metanol e 2 mL de água ultrafiltrada (tipo I). Neste momento com a coluna já ativada e ainda sob vácuo, adicionou-se 250 μ L da amostra biológica (meio de cultura com ou sem as promastigotas) seguido de 2 mL de água ultrafiltrada (tipo I). Logo após, as colunas foram retiradas do vácuo e com a finalidade de eluir os ácidos orgânicos retidos na coluna, foi adicionado 250 μ L de ácido sulfúrico a 0,5 mol/L e em seguida as mesmas foram centrifugadas a 520g durante 5 minutos à 2°C. A amostra resultante da centrifugação (amostra biológica) foi congelada e, conseqüentemente, submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência para análise dos ácidos orgânicos.

O aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado, CLAE - Varian ProStar, possui uma bomba, um injetor, uma coluna de separação (BIORAD –Aminex Íon Exclusion HPX-87H 300x7,8mm), um detector ultravioleta e um sistema de dados (computador e impressora). Esta coluna é preparada com material específico para separação de ácidos orgânicos e é protegida por uma pré-coluna (Aminex HPX-85, Fa. BIORAD).

As condições para análise foram: fluxo de 0,8 mL/minuto da fase móvel (0,5 mM H₂SO₄) à uma temperatura de 30°C, detecção na fase móvel ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm e volume injetado da amostra de 20 µL. A separação dos ácidos orgânicos ocorre à medida que a amostra e a fase móvel são bombeadas através da coluna. Estes componentes que eluem da coluna são demonstrados por picos no programa de análise.

A validação do aparelho foi realizada através de uma mistura de ácidos orgânicos (substância química de referência - sqr) injetados em concentrações variadas e, posteriormente, analisados pelo programa e avaliados de acordo com o tempo de retenção e de fatores de calibração para conseqüente desenvolvimento de um programa de análise e banco de dados. O tempo de retenção dos ácidos orgânicos e a área do pico destas substâncias foram representados por gráficos, integrados por software próprio, fornecendo e calculando, deste modo, as devidas concentrações. Estes foram os parâmetros utilizados nos estudos avaliatórios dos ácidos e, por conseguinte, do perfil metabólico dos organismos estudados.

As sqr foram compostas pelos seguintes ácidos: piruvato, lactato, oxalato, citrato, α-cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, acetato e propionato. Utilizaram-se concentrações isoladas de cada ácido e também associados entre si, identificando, dessa forma, os tempos de retenção específicos, bem como, a concentração referente dos ácidos, finalizando, assim, a validação do aparelho.

A curva de crescimento da *Leishmania* juntamente com as análises dos ácidos orgânicos no CLAE foram realizadas em triplicata. O teste ANOVA realizado pelo programa Sigma Pro Stat, foi o utilizado na análise estatística comparando-se as concentrações dos ácidos orgânicos no controle (meio de cultura sem as formas promastigotas) e na cultura de *Leishmania* no início do repique, no segundo, quarto e sexto dias. As concentrações foram expressas em média ou mediana de acordo com a normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Considerou-se estatisticamente significativo o valor de p menor que 0,05.

RESULTADOS

Para realização e observação da curva de crescimento, as culturas das formas promastigotas foram realizadas em triplicata. A fase logarítmica (até o quarto dia) e estacionária (entre o quarto e sétimo dias) puderam ser observadas. O declínio, ou morte dos parasitos ocorreu a partir do sétimo dia (Figura 5). Não houveram diferenças significativas no crescimento dos parasitos comparando-se as três curvas realizadas, confirmando a confiabilidade do estudo e possibilitando um delineamento do perfil comportamental do parasito estudado.

Nas amostras obtidas das culturas, após análise pelo CLAE, foram detectados oito dos dez ácidos previamente calibrados no aparelho, característicos do metabolismo e excreção dos parasitos, sendo estes, lactato, oxalato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato e propionato (Tabela I). No entanto, destes ácidos encontrados, somente o succinato não estava presente no controle realizado com o meio de cultura Grace sem cultivo do parasito.

Houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações do citrato comparando-se o controle, o início (tempo zero), o segundo, quarto e sexto dias de cultura, demonstrando um significativo aumento da excreção do mesmo no decorrer da cultura (Figura 8). Em relação ao oxalato, o fumarato e o lactato, não foram

detectadas diferenças significativas quantos as variações das concentrações (Figuras 6, 7 e 11).

Comprovou-se, ainda, a excreção do succinato pelos parasitos no quarto e sexto dias (fase estacionária), visto que tal ácido estava ausente no controle, no início e no segundo dias de cultura, porém não houve diferença significativa comparando-se as concentrações obtidas entre o quarto e sexto dias (Figura 10).

Quanto ao propionato, observou-se diferença significativa entre a concentração no sexto dia em relação ao controle, o início e o segundo dia, mas comparando-se com o quarto dia tal diferença não foi significativa (Figura 13). Tal fato sugere uma excreção significativa do ácido em questão somente no sexto dia de cultura.

Já o α -cetogluturato (Figura 9), ao contrário dos outros ácidos que apresentaram aumento de suas taxas de concentração, ou melhor, excreção no decorrer do crescimento das promastigotas, observou-se consumo a partir do segundo dia, visto que houve estatisticamente diferença entre a taxa de concentração encontrada no início da curva e os dias seguintes. A concentração do α -cetogluturato no controle e no início do crescimento dos parasitos mostrou-se sem diferença significativa, marcando alteração deste ácido a partir do segundo dia.

Por fim, o resultado da análise do malato demonstrou diferença significativa comparando-se com o controle, na verdade ocorreu aumento da sua concentração, se tornando mais significativa no sexto dia (Figura 12).

Tabela I: Concentração em $\text{mmol} \times 10^{-6}$ dos ácidos orgânicos detectados pelo CLAE no meio de cultura (controle) e na cultura de promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Ácidos Orgânicos	Meio de cultura	Cultura de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>			
		Início (0)	2 dias	4 dias	6 dias
Oxalato	3,03	3,42	3,39	3,45	4,20
Citrato	21,81	31,77	41,26	53,43	80,14
Propionato	205,63	225,76	272,78	345,37	422,66
Succinato	nd	nd	nd	9,52	19,24
α -cetoglutarato	11,39	14,55	9,28	9,34	9,08
Acetato	nd	nd	nd	nd	nd
Malato	55,23	76,56	74,08	88,03	115,76
Fumarato	4,73	5,66	5,48	6,29	6,88
Piruvato	nd	nd	nd	nd	nd
Lactato	0,78	1,08	0,96	1,13	1,16

Legenda: nd - ácido não detectado.

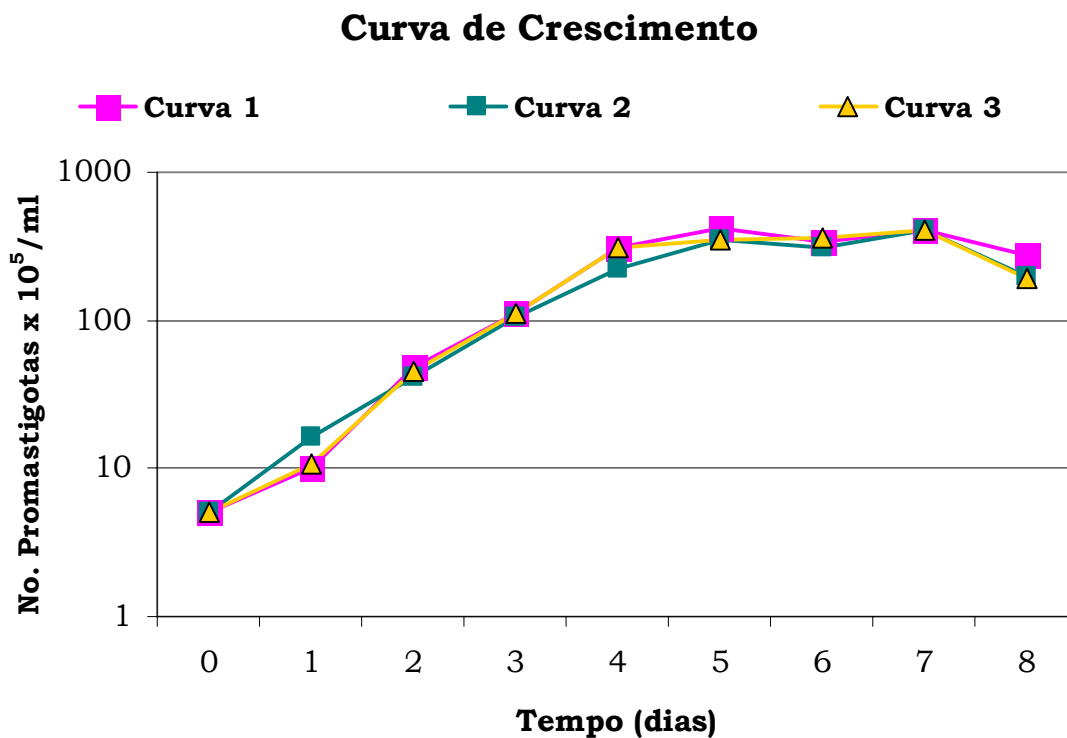


Figura 5: Curva de crescimento em triplicata, realizada com promastigotas de *Leishmania amazonensis*, em meio de cultura Grace modificado, durante 8 dias consecutivos.

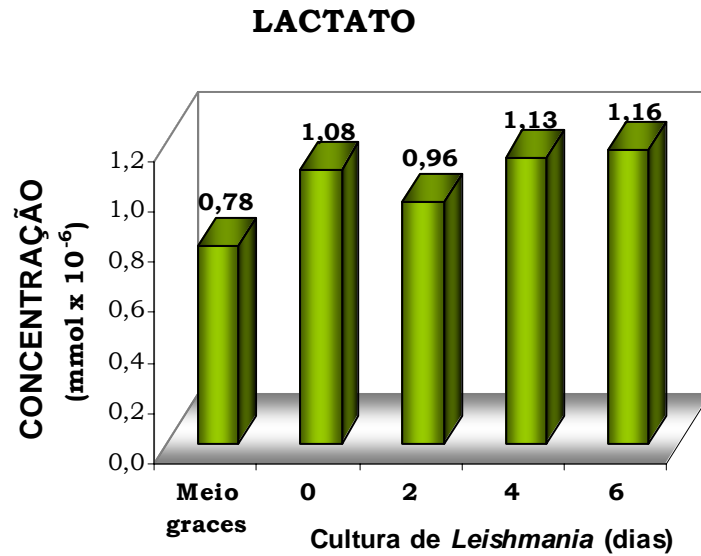


Figura 6: Média da taxa de concentração de lactato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias.

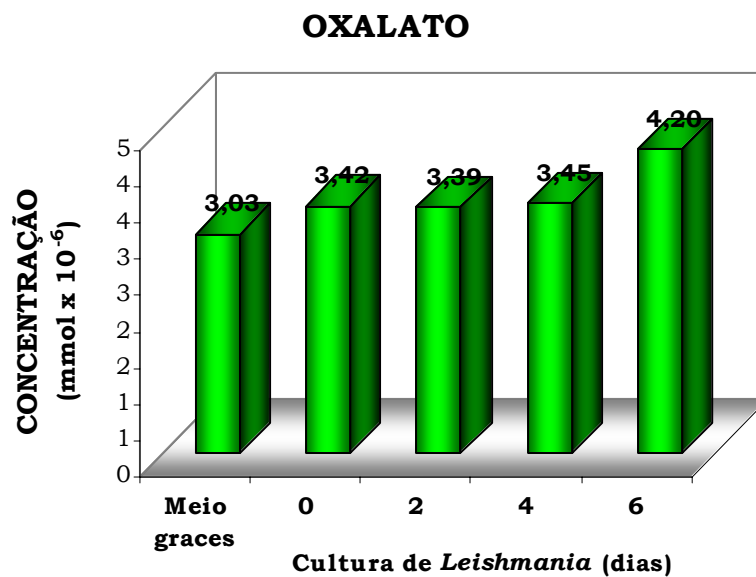


Figura 7: Média da taxa de concentração de oxalato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias.

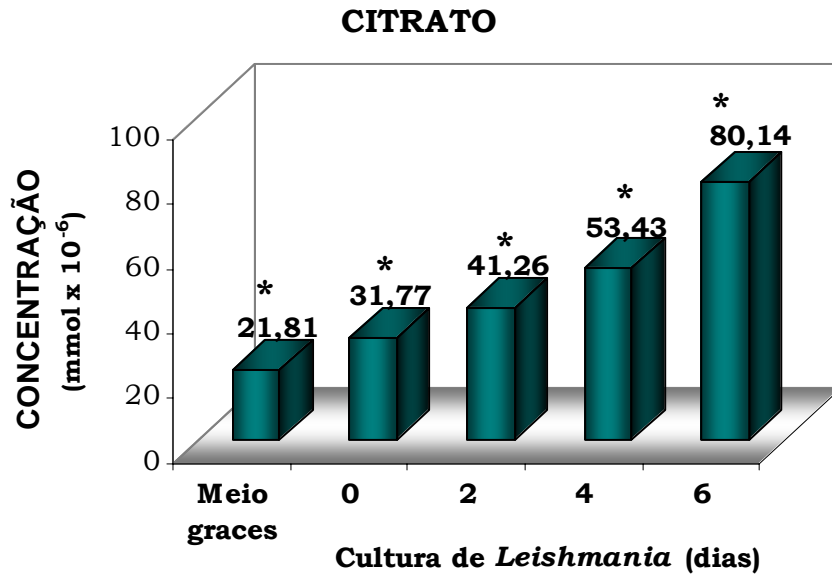


Figura 8: Média da taxa de concentração de citrato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias. (*)Diferença estatisticamente significativa.

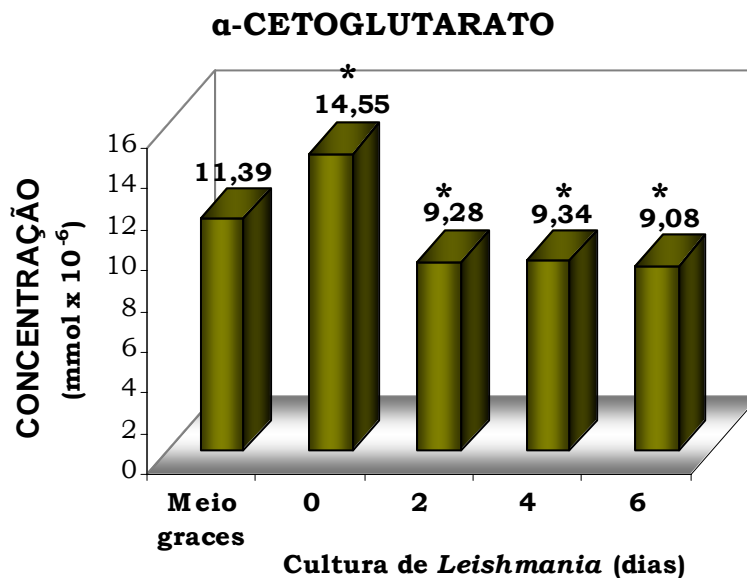


Figura 9: Média da taxa de concentração de α -cetogluturato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias. (*) Diferença estatisticamente significativa.

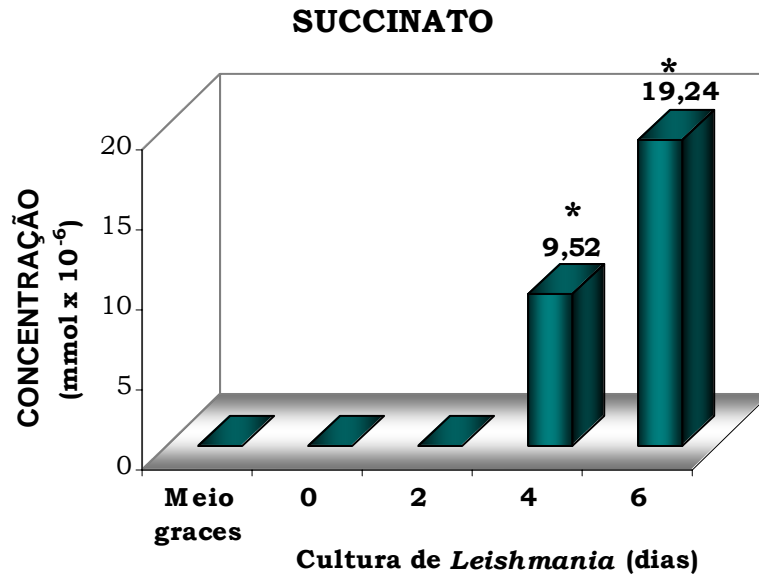


Figura 10: Média da taxa de concentração de succinato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias. (*) Diferença estatisticamente significativa.

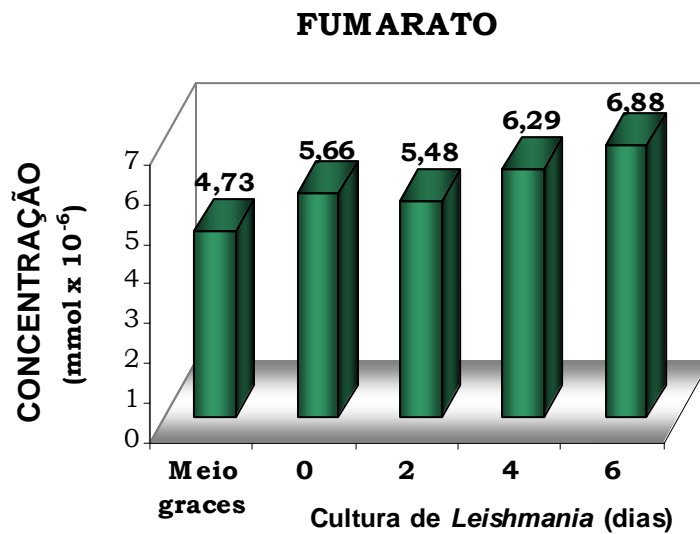


Figura 11: Média da taxa de concentração de fumarato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias.

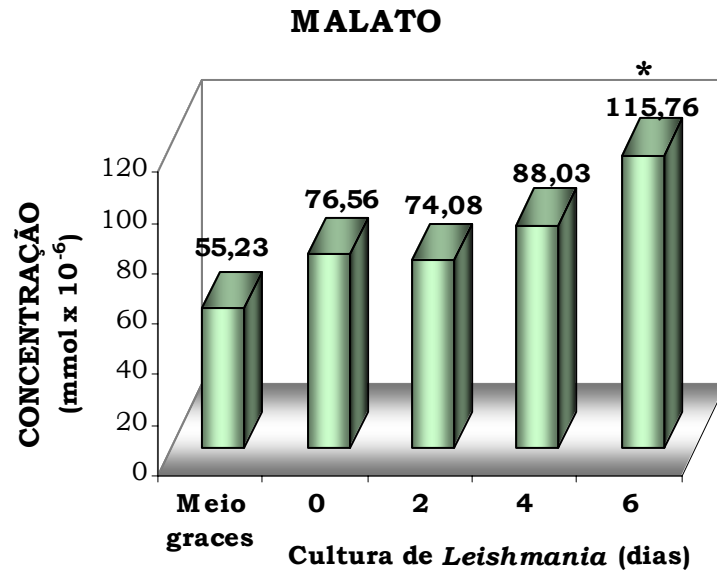


Figura 12: Média da taxa de concentração de malato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias. (*) Diferença estatisticamente significativa.

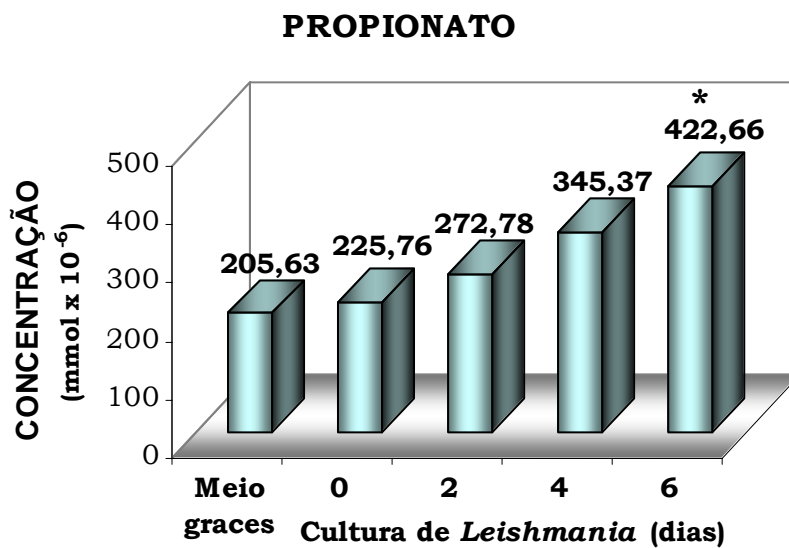


Figura 13: Média da taxa de concentração de propionato no meio de cultura e nas curvas de crescimento de promastigotas *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias. (*) Diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

No presente trabalho as promastigotas *L. amazonensis* apresentaram fase logarítmica de crescimento até o quarto dia e partir deste até o sexto dia, fase estacionária (Figura 5). Os parasitos iniciaram a morte a partir do sétimo dia. Existem três estágios de *Leishmania* sp envolvidos no seu ciclo de vida: amastigotas, promastigotas pró-cíclicas e promastigotas metacíclicas. As fases de crescimento logarítmica ou exponencial e estacionária são, freqüentemente, utilizadas como sinônimo para promastigotas pró-cíclica e metacíclica, respectivamente, apesar de que outros estágios existem (Gossage *et al.* 2003). As fases do crescimento do parasito estão intimamente relacionadas com sua capacidade de divisão (Killick-Kendrick 1990).

A fase log corresponde à intensa reprodução do parasito, porém com baixa motilidade, são em geral mais arredondadas, ao contrário das promastigotas metacíclicas (fase estacionária), consideradas as formas infectivas para o hospedeiro mamífero, que apresentam baixa divisão, porém maior motilidade, se apresentado mais afiladas na sua estrutura (Killick-Kendrick 1974 a).

O gênero *Leishmania* e os membros da família *Trypanosomatidae*, realizam metabolismo anaeróbico da glicose, tendo como principais produtos finais succinato, acetato, lactato e traços de piruvato (Chatterjee e Datta 1974, Cannata e Cazzulo 1984). Esta preferência metabólica depende de vários fatores tais como a concentração dos substratos e sua natureza química, pH e aeração do meio de cultura e alterações nas enzimas de células inoculadas (Cazzulo *et al.* 1985). A Figura 14 esquematiza o metabolismo da via glicolítica e dos aminoácidos, para melhor visualizar a origem dos produtos finais.

Dos ácidos orgânicos detectados no presente estudo, somente o succinato não foi detectado no meio, demonstrando ser resultado da excreção dos parasitos a partir do quarto dia. Os ácidos tiveram variações de concentração, porém fica claro que o metabolismo da *L.*

amazonensis depende das condições de cultivo e dos substratos do meio de cultura. A composição do meio de crescimento dos parasitos pode influenciar diretamente na análise das vias bioquímicas em estudo (Barret 1997). Um exemplo disto é a transformação de *L. mexicana* de amastigota para promastigota influenciada por fatores exógenos como a presença de ácidos graxos não-esterificados ou a tensão de oxigênio no meio (Galbraith, 1991).

Estudos do metabolismo de tripanossomatídeos têm apresentado que a *L. mexicana* prefere aminoácidos para geração de energia, utilizando glicose somente no final da fase log e no início da fase estacionária, produzindo succinato, em menor quantidade acetato, pequenas quantidades de piruvato e nenhum L-lactato ou malato (Cazzulo *et al* 1985). No entanto, observou-se que a *L. amazonensis* não apresentou detecção de piruvato e acetato, mas houve detecção de malato. O lactato não apresentou diferença significativa de sua concentração em relação ao que já continha no meio.

As promastigotas de *L. panamensis* tendo glicose como única fonte de energia produz glicerol, succinato, acetato, piruvato, alanina e D-lactato, juntamente com CO₂, mas não L-lactato. Células incubadas com glicerol como única fonte de carbono produzem acetato, succinato, D-lactato e CO₂. Ambos alanina e glutamato são oxidados via ciclo de Krebs com proporção comparável ou maior que a oxidação da glicose. Em condições anaeróbias com a glicose como substrato, mais D-lactato, glicerol, piruvato succinato e alanina e menos acetato foram produzidos como principais produtos finais, enquanto o consumo de glicose na ausência de CO₂ diminuiu. O CO₂ foi restaurado em níveis aeróbios indicando que a fixação de CO₂ em anaeróbios é essencial para manter o alto fluxo glicolítico (Keegan *et al.* 1987, Darling *et al.* 1987, 1989).

A prolina e o glutamato são os dois substratos mais importantes utilizados no metabolismo energético de promastigotas e são oxidados em α-cetoglutarato e degradados até succinato via ciclo de Krebs e podem ser importantes somente nos estágios onde este ciclo é ativo

(Tielens e Van Hellemond 1998), entretanto na cultura realizada nesta pesquisa houve consumo significativo de α -cetogluturato desde o início da cultura, com excreção de succinato no quarto e sexto dias.

Em muitos tripanossomatídeos o succinato é um produto final do metabolismo energético. Tem sido sugerido que succinato é produzido pela fumarato redutase, uma enzima homóloga a succinato desidrogenase do ciclo de Krebs, que catalisa a reação reversa – a oxidação do succinato. A fumarato redutase é bem conhecida em bactérias e em helmintos, onde sua função está na absorção de elétrons no metabolismo anaeróbio destes organismos (Ackrell *et al.* 1992, Tielens 1994).

Nas promastigotas de *Leishmania sp* o succinato é produzido principalmente por normal funcionamento do ciclo de Krebs. Somente os estágios que possuem ciclo de Krebs ativo produzem succinato, o que indica que estes dois processos são relacionados e que também implica que a redução de fumarato tem ocorrido ao mesmo tempo em que a oxidação do succinato (Tielens e Van Hellemond 1998).

O citrato é um ácido orgânico gerado a partir da reação de condensação do oxaloacetato com a Acetil CoA, catalisada pela enzima citrato sintase. Este ácido orgânico é importante, quanto à sua disponibilidade e volume de produção, durante o ciclo de Krebs. Possui propriedades como capacidade de acidificar o meio, funcionando como tampão e ainda como quelante de íons metálicos, gerando uma ação anti-oxidante e preservante (Karaffa *et al.* 1997). As promastigotas apresentaram excreção significativa no decorrer da curva de crescimento, sugerindo a necessidade de manutenção de condições ideais de sobrevivência.

Resultante do metabolismo de ácidos graxos, o propionato é ainda um dos principais produtos do metabolismo do lactato (Marounek *et al.* 1999). É relatado como produto final do metabolismo de bactérias e outros invertebrados. Muitas vezes sua produção ocorre em função de um acúmulo da produção de succinato, observado no presente

trabalho. Como ácido graxo, sua via metabólica produz ATP, além de ser um ácido volátil de fácil excreção celular (Van Hellemond e Tielens 1998). A combinação da produção de succinato a partir do quarto dia e de propionato significativamente no sexto dia, revela uma seqüência metabólica que permite à *L. amazonensis* sobreviver no meio de cultura por mais tempo, atribuindo-se a estas vias metabólicas a estratégia para sua manutenção.

Resta a observação de que para a manutenção do sistema fumarato redutase faz-se necessário que parte do malato seja transformado em piruvato. O piruvato não foi detectado no presente trabalho, mas sabe-se que é substrato para a formação de acetato ou alanina, com produção de ATP. Os resultados obtidos se confirmam com o registro na literatura do aumento da taxa de concentração do aminoácido alanina no meio (Darling *et al.* 1987, 1989, Keegan *et al.* 1987). Os produtos finais registrados, como succinato e propionato indicam uma passagem para o metabolismo parcialmente anaeróbio, podendo significar uma preparação fisiológica para o próximo passo biológico que seria a transformação na forma intracelular amastigota ou a morte celular.

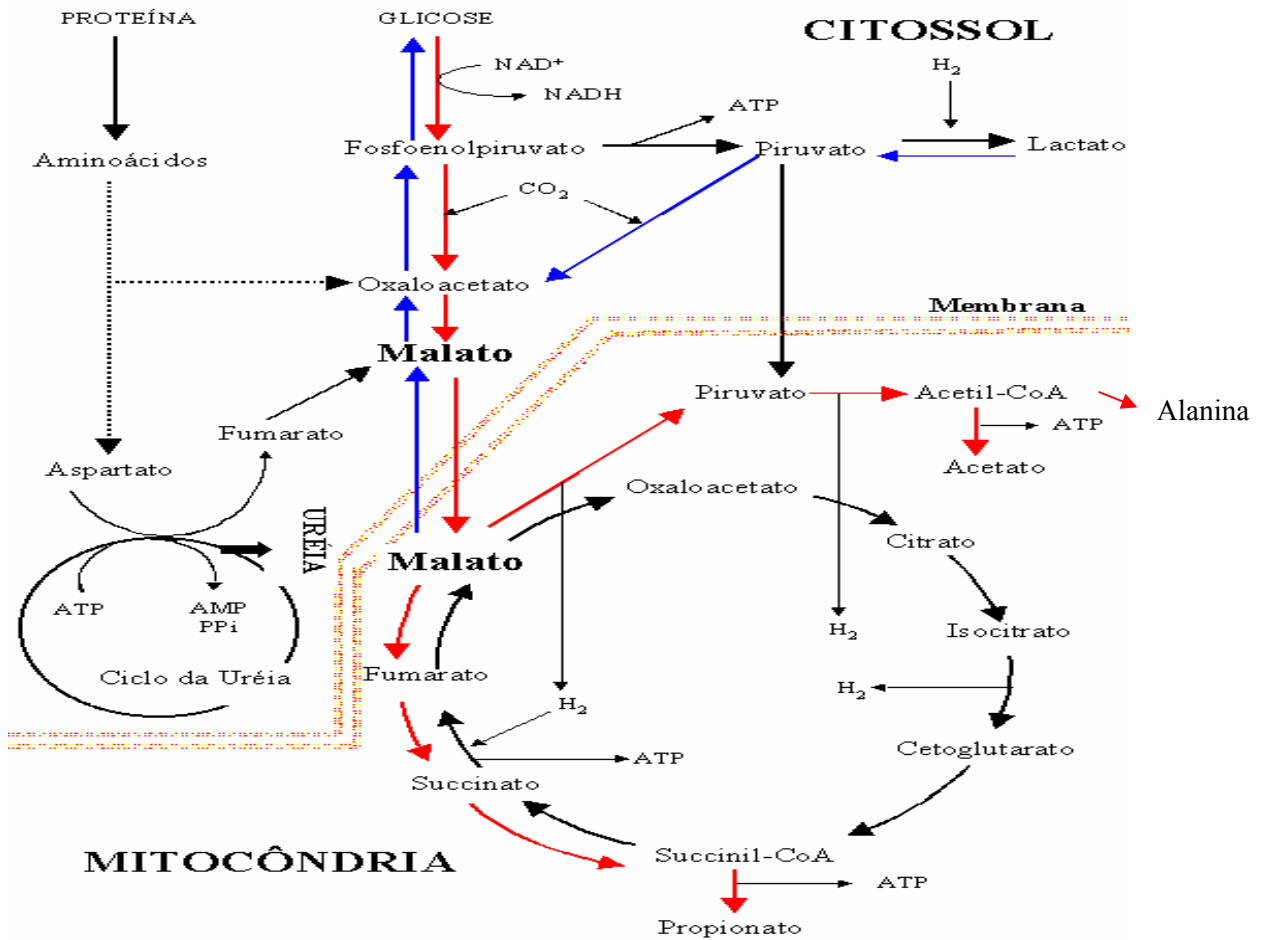


Figura 14: Metabolismo da via glicolítica e dos aminoácidos (Bezerra *et al* 1997). Legenda: seta em azul - gliconeogênese, seta em vermelho - catabolismo do malato.

Artigo 2

**EFEITO LEISHMANICIDA DE EXTRATOS NATURAIS DE
Magonia pubescens E *Glycyrrhiza glabra* NO
DESENVOLVIMENTO DE PROMASTIGOTAS DE
Leishmania amazonensis E ANÁLISE POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).**

RESUMO

O alto índice de mortalidade e morbidade da leishmaniose associado com a dificuldade do tratamento e a resistência do parasito estimulam a investigação e pesquisa de novos extratos de plantas nativas, como alternativa para o tratamento e combate de doenças parasitárias. Existem princípios ativos que podem atacar diretamente o parasito como as chalconas, alcalóides e taninos, encontrados em diversas plantas, que muitas vezes são utilizadas na medicina popular. Porém, um fator relevante é a análise de como atuam estas substâncias em hospedeiros ou parasitos, e se destes produtos poderiam ser extraídos componentes específicos ao metabolismo, que pudessem inibir determinada reação metabólica vital ao parasito sem afetar o hospedeiro. Neste trabalho realizou-se bioensaios com *Magonia pubescens* (tingui) e *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L⁻¹ em culturas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* com conseqüente detecção de ácidos orgânicos com o cromatógrafo líquido de alta eficiência. Os ácidos orgânicos são importantes indicadores de distúrbios biológicos e importantes componentes no metabolismo intermediário e energético de todos os seres vivos. Ambos os extratos testados apresentaram inibição do crescimento dos parasitos, porém a *G. glabra* foi mais efetiva na fase estacionária de crescimento e a *M. pubescens* na fase logarítmica. A *M. pubescens* foi mais eficaz na concentração de 25 mg.L⁻¹ e a *G. glabra* na de 100 mg.L⁻¹, apesar de que todas as concentrações foram efetivas. As alterações encontradas nas taxas de concentração dos ácidos orgânicos comprovaram a dependência da atividade do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória e que as condições de substrato e oxigênio são essenciais para a sobrevivência do parasito, no entanto o que garante sua sobrevivência em condições adversas é sua capacidade e habilidade de alterar o metabolismo reduzindo a níveis mínimos ou mesmo revertendo vias metabólicas.

Palavras chave: plantas leishmanicidas, metabolismo, ácidos orgânicos.

ABSTRACT

The high index of mortality and morbidity of leishmaniasis associated with the difficulty of the treatment and the resistance of the parasite stimulate the inquiry and search of new extracts of native plants, as alternative for the treatment and combat of parasitic diseases. There are active principles that can attack the parasite directly as chalcones, alkaloids and tanins, found in diverse plants, that many times are used in the popular medicine. However, an relevant factor is the analysis of as these substances in hosts or parasites act, and if of these products could be extracted specific component to the metabolism, that could inhibit determined vital metabolic reaction to the parasite without affecting the host. In this work realized biotests with *Magonia pubescens* (tingui) and *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), in the concentrations of 25, 50 and 100 mg.L⁻¹, in the cultures of *Leishmania amazonensis* promastigotes with consequent detection of organic acid with liquid chromatography high performance. The organic acids are important pointers of biological disorders and important components in the intermediate and energetic metabolism of all human beings. Both tested extracts had presented inhibition of the parasites growth, however the *G. glabra* was more effective in the stationary phase of growth and *M. pubescens* in the logarithmic phase. *M. pubescens* was more efficient in the concentration of 25 mg.L⁻¹ and the *G. glabra* in the 100 mg.L⁻¹ concentration, although all the concentrations has been effective. The alterations founded in the concentration taxes of the organic acids had proven the dependence of the activity of the cycle of Krebs and the respiratory chain and that the substrat conditions and oxygen are essential for the survival of the parasite, however what guarantees its survival in adverse conditions is its capacity and ability to modify the metabolism, reducing the minimum levels or same reverting the metabolic pathways.

Keywords: Antileishmanial plants, metabolism, organic acids.

INTRODUÇÃO

A *Leishmania* é um protozoário parasito endêmico em várias partes do mundo e é responsável por um sério problema de saúde pública em inúmeros países. Várias espécies estão envolvidas com a manifestação da doença (Enserink 2000). Estima-se que dois milhões de novos casos de leishmaniose ocorram anualmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo, estando mais de 12 milhões de indivíduos contaminados e 350 milhões sob risco de infecção (ANVISA 2003, 2006). No Brasil estudos apresentam a ocorrência de cerca de vinte mil novos casos por ano (Ashford 2000).

Esses alarmantes números retratam um alto índice de mortalidade e morbidade da doença, estimulam a investigação e pesquisa de novos extratos de plantas nativas, como alternativa para o tratamento e controle das doenças parasitárias (Bodeker e Willcox, 2000). O tratamento da leishmaniose é muito difícil devido à localização das formas infectivas, bem como o aparecimento de formas resistentes de *Leishmania*, além disso, o tratamento terapêutico utilizado envolve características indesejáveis como a utilização de medicamentos injetáveis (Geary *et al.* 1989) e isso têm exacerbado a necessidade do desenvolvimento de drogas antileishmanióticas mais eficazes e menos tóxicas ao paciente. A toxicidade é particularmente severa no tratamento de crianças e idosos ou indivíduos portadores de infecções oportunistas secundárias.

No passado, homens eram tratados com produtos extraídos de plantas por administração exclusivamente oral, pois se acreditava que o sítio das infecções fosse o trato intestinal. Os avanços dos conhecimentos anatômicos, bioquímicos e estudos fisiológicos, e o entendimento de quase todos os ciclos de vida dos parasitos no homem, exigem que atualmente se realize um processo de planejamento de tratamento de maneira mais racional, com ênfase no mecanismo de ação (Frayha *et al.* 1997), visando atingir diretamente os alvos específicos e essenciais dos parasitos.

A flora do Cerrado representa o segundo maior bioma vegetal brasileiro. Esse importante recurso natural carece de estudos mais profundos e aplicados, visando o encontro de métodos alternativos de garantir a saúde da população de forma simples, eficiente e segura, além de chamar atenção para a necessidade de preservação deste rico ecossistema. Das 107 espécies vegetais do Brasil ameaçadas de extinção, 54 são plantas medicinais (Correio Brasiliensis 2002) e algumas estão sendo testadas como forma alternativa no controle de parasitoses e vetores (Carvalho 1991, Haslan 1996).

Várias espécies da flora brasileira são consideradas plantas taníferas, por apresentarem altos teores de taninos que contribui na defesa das plantas contra ataque de herbívoros, além de limitar o crescimento de microorganismos patogênicos (Alcanfor *et al.* 1999, Silva *et al.* 1999). A *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae), conhecida popularmente como tingui, é uma planta característica do cerrado brasileiro e apresenta alto teores de tanino na sua composição (Silva *et al.* 2004).

O tanino, muitas vezes, é o composto ativo de plantas empregado na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, por apresentar atividades biológicas como a ação bactericida (Scalbert 1991), fungicida, moluscicida e inibição enzimática (Simões *et al.* 2001), pois apresenta grande capacidade de interação com proteínas se tornando tóxico para muitos microorganismos. Acredita-se que os taninos interferem nos macrófagos estimulando a liberação de interferons que eliminam amastigotas de *Leishmania*, mas não possuem efeito direto nas promastigotas (Kolodziel *et al.* 2001).

Entretanto, existem compostos ativos que podem atuar diretamente no parasito como as chalconas e alcaloides. Existem vários tipos de chalconas e análogos que podem ser encontradas em plantas, mas também são passíveis de síntese e representam uma classe promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos. Um exemplo típico é a licochalcona 2 encontrada nas raízes e rizomas do alcaçuz chinês ou Gan

Cao, ativa para parasitos de manifestação cutânea e visceral, destruindo a mitocôndria de promastigotas e amastigotas, sem prejuízo às demais organelas e sem afetar a mitocôndria do macrófago (Christensen *et al.* 1994, Gilbert e Favoreto 2005).

O alcaçuz, *G. glabra*, a mais de 3 mil anos é utilizado na medicina natural, originário da Europa, é uma planta arbustiva, variando de 1 a 2 metros de altura e está aclimatada no Brasil. A erva tem propriedades antiespasmódicas, diuréticas, antiinflamatórias, anti-sépticas e expectorantes. A medicina popular a utiliza no tratamento de úlceras pépticas, bronquites, tosses catarrais, rouquidão e acidez estomacal. Também pode ser empregado contra furunculoses. Externamente, por meio de bochechos, é utilizado contra inflamações bucais. Compressas de infusão da raiz auxiliam no tratamento da conjuntivite aguda. No cerrado brasileiro há uma espécie de alcaçuz, *Periandra mediterrânea*, já aclimatada, segundo site do herbário brasileiro, 2006.

Um fator relevante é a análise de como atuam estas substâncias em hospedeiros ou parasitos, e se destes produtos poderiam ser extraídos componentes específicos ao metabolismo, que pudessem inibir determinada reação metabólica vital (Bezerra e Becker 1994, Bezerra *et al.* 1997, 1999, Herzog-Soares *et al.* 1999). Portanto, além dos bioensaios pretende-se, com o presente trabalho estabelecer análise com ácidos orgânicos visando o conhecimento metabólico do parasito. A detecção e quantificação de tais ácidos orgânicos são importantes em muitas áreas de biotecnologia. Os ácidos orgânicos são essências como indicadores de distúrbios biológicos e importantes componentes no metabolismo intermediário e energético de todos os seres vivos (Scriver *et al.* 1989).

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Setor de parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP – UFG). Os bioensaios foram realizados com dois extratos de plantas:

extrato bruto etanólico em pó de cascas do caule de *M. pubescens*, conhecido popularmente por tingui, gentilmente cedido pelo laboratório de bioatividade de plantas do IPTSP/UFG sob responsabilidade da Professora Doutora Heloísa Helena Garcia da Silva e extrato bruto em pó da raiz de *G. glabra* conhecido por alcaçuz ou raiz doce, procedente de uma farmácia de produtos naturais, em Goiânia – GO, sob responsabilidade da farmacêutica Léia Cury (CRF – GO 1325).

As promastigotas de *L. amazonensis* cepa PH8 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de citocinas e imunobiologia de leishmanioses do IPTSP-UFG, de responsabilidade do Professor Doutor Milton Adriano Pelli de Oliveira. Os parasitos foram mantidos através de cultivo *in vitro* mantidos em estufa à 26°C e repicados a cada dois dias a partir de 5×10^5 promastigotas/ml em meio de cultura Grace, suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sartori, 1997). O repique ocorreu entre o segundo e o terceiro dia (fase log), que permite manter sempre a forma promastigota pró-cíclica em cultivo, no entanto, após 15 repiques, estes parasitos eram renovados, estabelecendo, assim, uma nova cultura de *Leishmania*.

Os extratos foram diluídos em solução salina estéril e adicionados ao meio de cultura Grace completo nas concentrações de 100, 50 e 25 mg.L⁻¹, em seguida, foram repicadas para este meio uma quantidade inicial de 5×10^5 promastigotas/mL e as promastigotas foram quantificadas em Câmara de Neubauer, utilizando a metodologia descrita por Brener (1961), adaptada para microscópio binocular, em intervalos de 24 horas por sete dias consecutivos. A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada por meio da determinação de uma curva de crescimento comparada ao grupo controle que recebeu somente salina. Para cada análise foram realizadas três repetições.

As amostras que foram submetidas ao CLAE, foram extraídas a partir do meio de cultura de promastigotas contendo os extratos testados nas

diferentes concentrações analisadas e do meio de cultura controle contendo salina, no início, no segundo, no quarto e sexto dias da cultura, totalizando um número de quatro amostras por cultura avaliada. Foram retiradas amostras de 250 µL para posterior extração.

A extração foi realizada com auxílio de uma bomba de vácuo e através de uma coluna Varian de extração denominada Bond Elut (SAX-anion exchange-quaternary amine, Analytichem International, Harbor city, USA), adequada para separação em fase sólida, como descrito por Bezerra *et al.* (1997, 1999). As colunas foram ativadas na caixa de vácuo com 1 mL de ácido clorídrico a 0,5 mol/L, 1 mL de metanol e 2 mL de água ultrafiltrada (tipo I). Neste momento com a coluna já ativada e ainda sob vácuo, adicionou-se 250 µL das amostras contendo promastigotas com ou sem extrato das plantas, seguido de 2 mL de água ultrafiltrada (tipo I). Logo após, as colunas foram retiradas do vácuo e com a finalidade de eluir os ácidos orgânicos retidos na coluna, foi adicionado 250 µL de ácido sulfúrico a 0,5 mol/L e em seguida as mesmas foram centrifugadas a 520g durante 5 minutos à 2°C. A amostra resultante da centrifugação (amostra biológica) foi congelada e, conseqüentemente, submetida a uma cromatografia líquida de alta eficiência para análise dos ácidos orgânicos.

O aparelho utilizado para análise dos ácidos foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Varian ProStar, que possui uma bomba, um injetor, uma coluna de separação (BIORAD –Aminex Íon Exclusion HPX-87H 300x7,8mm), um detector ultravioleta e um sistema de dados (computador e impressora). Esta coluna é preparada com material específico para separação de ácidos orgânicos e é protegida por uma pré-coluna (Aminex HPX-85, Fa. BIORAD).

As condições para análise foram: fluxo de 0,8 mL/minuto do eluente ou fase móvel (0,5 mM H₂SO₄) à uma temperatura de 30°C, detecção por ultravioleta com comprimento de onda de 210 nm e volume da amostra injetável de 20 µL. A separação dos ácidos orgânicos ocorre à medida que a amostra e a fase móvel são bombeadas através da coluna.

Estes componentes que eluem da coluna foram demonstrados por picos no programa de análise de acordo com o tempo de retenção e área de pico de cada ácido, anteriormente validado, representados por gráficos e integrados por software próprio, fornecendo e calculando, desse modo, as devidas concentrações.

A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA pelo programa Sigma Pro Stat, comparando-se as concentrações dos ácidos orgânicos no controle, na cultura com extrato da *G. glabra* e da *M. pubescens*, ambos nas concentrações de 100, 50 e 25 mg.L⁻¹, no início, no segundo, quarto e sexto dia de cultura. O mesmo teste também foi utilizado na avaliação do efeito leishmanicida dos extratos de plantas testados. As concentrações foram expressas em média ou mediana de acordo com a normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Considerou-se estatisticamente significativo o valor de p menor que 0,05.

RESULTADOS

A curva de crescimento das promastigotas de *L. amazonensis* sob ação do extrato bruto diluído de *M. pubescens* (tingui) e de *G. glabra* (alcaçuz) está representada na Figura 15 e 16, respectivamente. Pode-se observar que ambos os extratos testados apresentaram inibição do crescimento do parasito, entretanto a *G. glabra* apresentou uma inibição geral maior do que a *M. pubescens*. A concentração mais efetiva foi de 100 mg.L⁻¹ para a *G. glabra* e de 25 mg.L⁻¹ para a *M. pubescens*, correspondendo, respectivamente, a 35 e 27% de inibição de crescimento em média (Figura 17). A análise estatística considerou significativa somente a inibição apresentada pela *G. glabra* 25 e 100 mg.L⁻¹, no quinto dia, e 100 mg.L⁻¹ no sexto dia e pela *M. pubescens* 100 mg.L⁻¹ no quinto dia.

O sexto dia de crescimento, correspondente a fase estacionária, apresentou a maior média de inibição quanto ao ensaio com a *G. glabra*, porém, ao contrário, para a *M. pubescens* este foi o dia de menor inibição. A *M. pubescens* foi mais efetiva durante a fase estacionária do crescimento

das promastigotas, em contra partida, a *M. pubescens* teve maior ação na fase log (Figura 18).

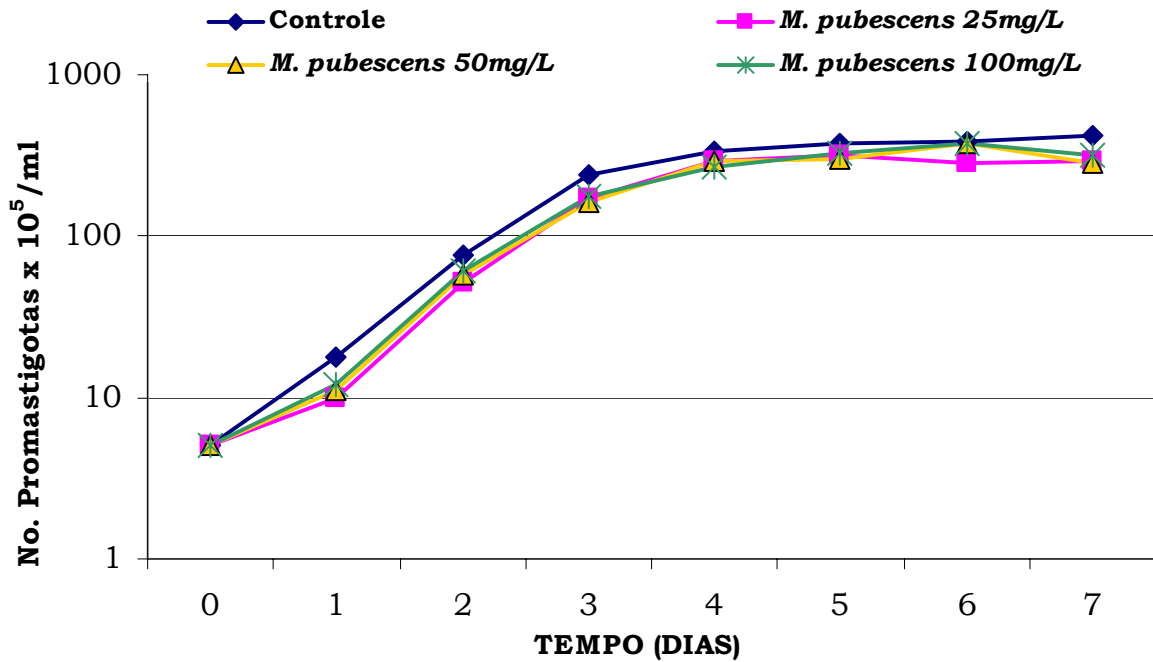


Figura 15: Ação da *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L⁻¹, na curva de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

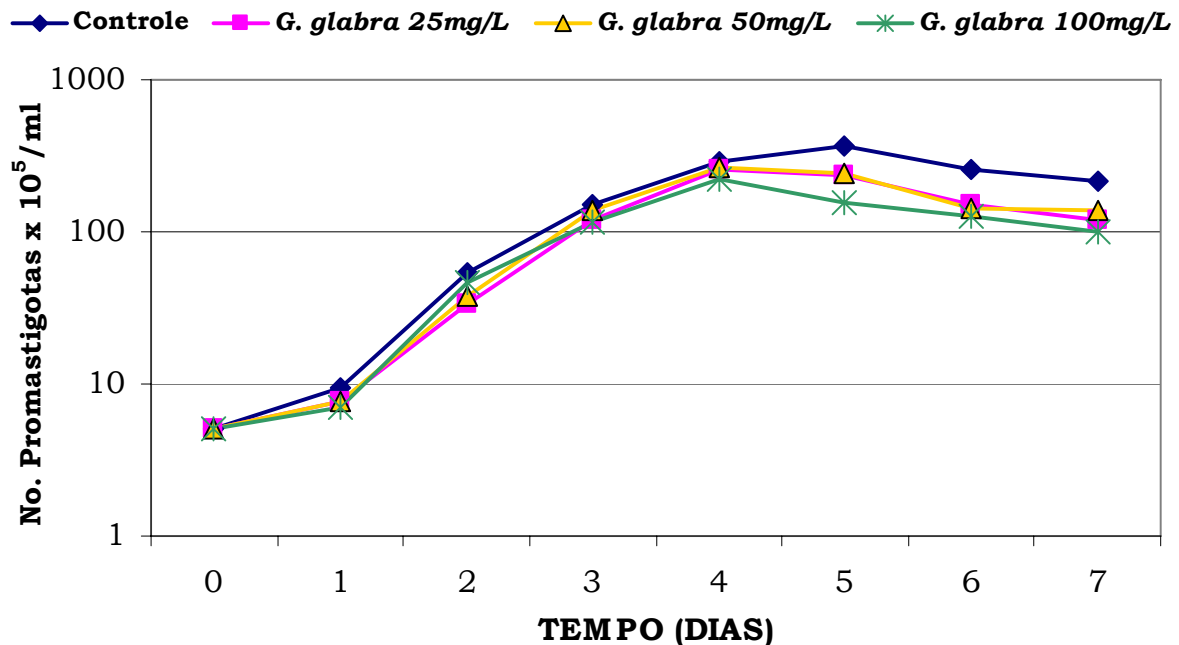


Figura 16: Ação da *Glycyrrhiza glabra*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L⁻¹, na curva de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

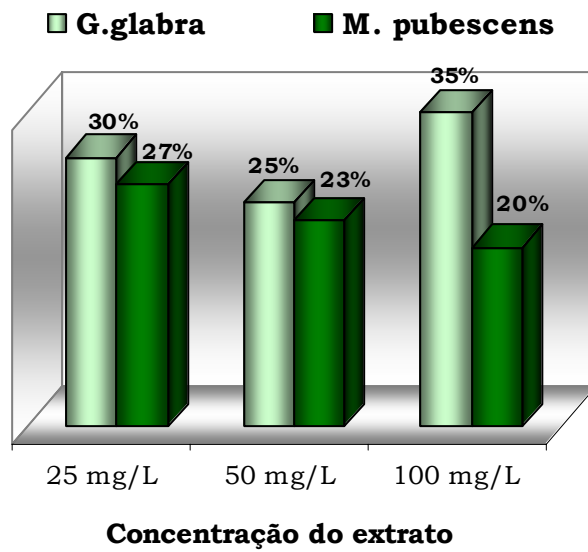


Figura 17: Inibição média, em porcentagem, do crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* sob ação da *Glycyrrhiza glabra* e da *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.

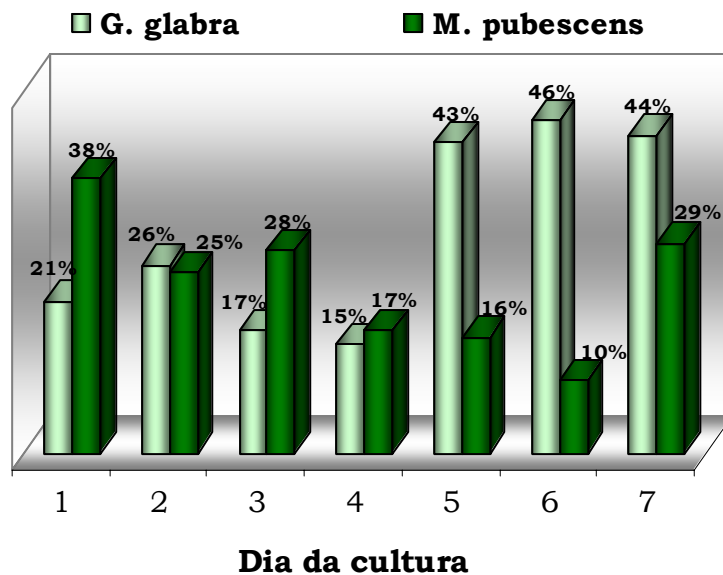


Figura 18: Inibição média, em porcentagem, do crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* sob ação da *Glycyrrhiza glabra* e da *Magonia pubescens* nos sete dias consecutivos de cultura e de exposição aos extratos.

Quanto à análise dos ácidos orgânicos pelo CLAE, foram detectados lactato, oxalato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato e propionato. Dentre estes ácidos encontrados o succinato não foi detectado no meio de cultura demonstrando ser fruto da excreção das promastigotas.

Segundo a análise estatística não houve diferença entre as concentrações encontradas de oxalato, citrato, fumarato, malato e lactato, referente a todas culturas testadas (controle, *M. pubescens* 25, 50 e 100 mg.L-1 e *G. glabra* 25, 50 e 100 mg.L-1) e os dias do crescimento avaliados (Figuras 19, 20, 21, 24 e 25). Observou-se uma diminuição da concentração do citrato no segundo dia, apesar de não haver diferenças significativas quanto às variações das concentrações deste ácido (Figura 21).

O succinato foi detectado a partir do quarto dia da cultura controle, da cultura com *G. glabra* 25, 50 e 100 mg.L-1 e da *M. pubescens* 100 mg.L-1. Entretanto no ensaio com *M. pubescens* 25 e 50 mg.L-1, já no início da curva (tempo zero) houve detecção do succinato. Todas as culturas tiveram aumento na concentração do succinato no decorrer dos dias de cultura, com exceção da *M. pubescens* 50 mg.L-1 que apresentou queda no quarto dia, porém não houve diferença quanto à taxa de concentração do ácido entre as culturas testadas e os dias do crescimento avaliados (Figura 23).

Em relação ao α -cetogluturato houve diferença significativa quanto à concentração encontrada na cultura com *G. glabra* 25 mg.L-1 comparada com o controle, no segundo dia de cultura, demonstrando um aumento significativo deste ácido. Com a *G. glabra* nas concentrações de 100 e 25 mg.L-1, comparada ao controle, também houve aumento significativo de concentração, relativo ao quarto dia de crescimento das promastigotas. Outra diferença significativa foi encontrada quanto à detecção do α -cetogluturato, no sexto dia da cultura para *M. pubescens* e *G. glabra*, ambos nas concentrações de 25 e 50 mg.L-1, que apresentaram concentrações maiores do ácido em comparação com a encontrada no controle (Figura 22). A presença ou ausência dos ácidos nos testes realizados está representada

nas Tabelas II e III e as taxas de concentrações dos ácidos detectados nas Figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26.

Tabela II: Detecção de ácidos orgânicos na cultura de promastigotas de *Leishmania amazonensis* testadas com extrato de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.

Ácidos orgânicos	Início da cultura				Segundo dia				Quarto dia				Sexto dia			
	Ct	A25	A50	A100	Ct	A25	A50	A100	Ct	A25	A50	A100	Ct	A25	A50	A100
Oxalato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
α -cetogluturato	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fumarato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: Ct controle com salina, A25 alcaçuz 25 mg.L-1, A50 alcaçuz 50 mg.L-1, A100 alcaçuz 100 mg.L-1. (+) presente, (-) ausente – não detectado.

Tabela III: Detecção de ácidos orgânicos na cultura de promastigotas de *Leishmania amazonensis* testadas com extrato da *Magonia pubescens* (tingui) nas concentrações de 25, 50 e 100mg.L-1.

Ácidos orgânicos	Início da cultura				Segundo dia				Quarto dia				Sexto dia			
	Ct	T25	T50	T100	Ct	T25	T50	T100	Ct	T25	T50	T100	Ct	T25	T50	T100
Oxalato	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Succinato	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
α -cetogluturato	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fumarato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: Ct controle com salina, T25 tingui 25 mg.L-1, T50 tingui 50 mg.L-1, T100 tingui 100 mg.L-1. (+) presente, (-) ausente – não detectado.

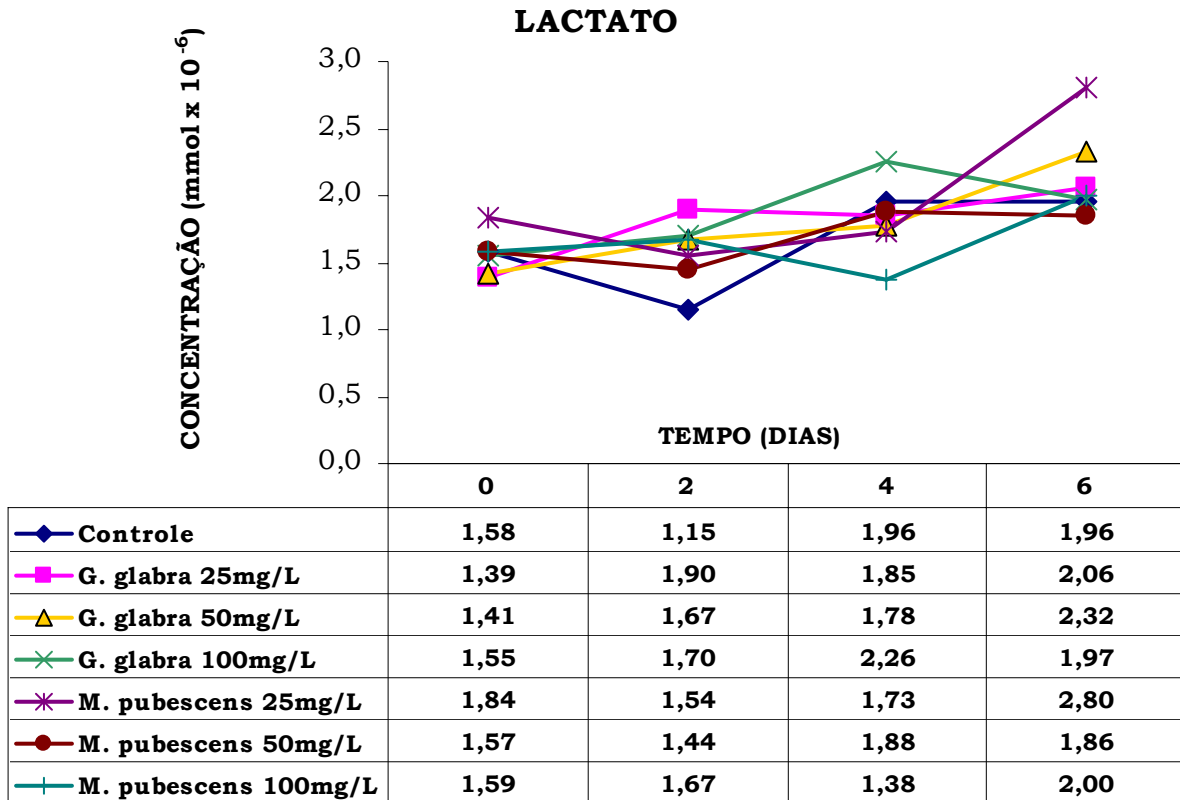


Figura 19: Taxa de concentração de lactato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.

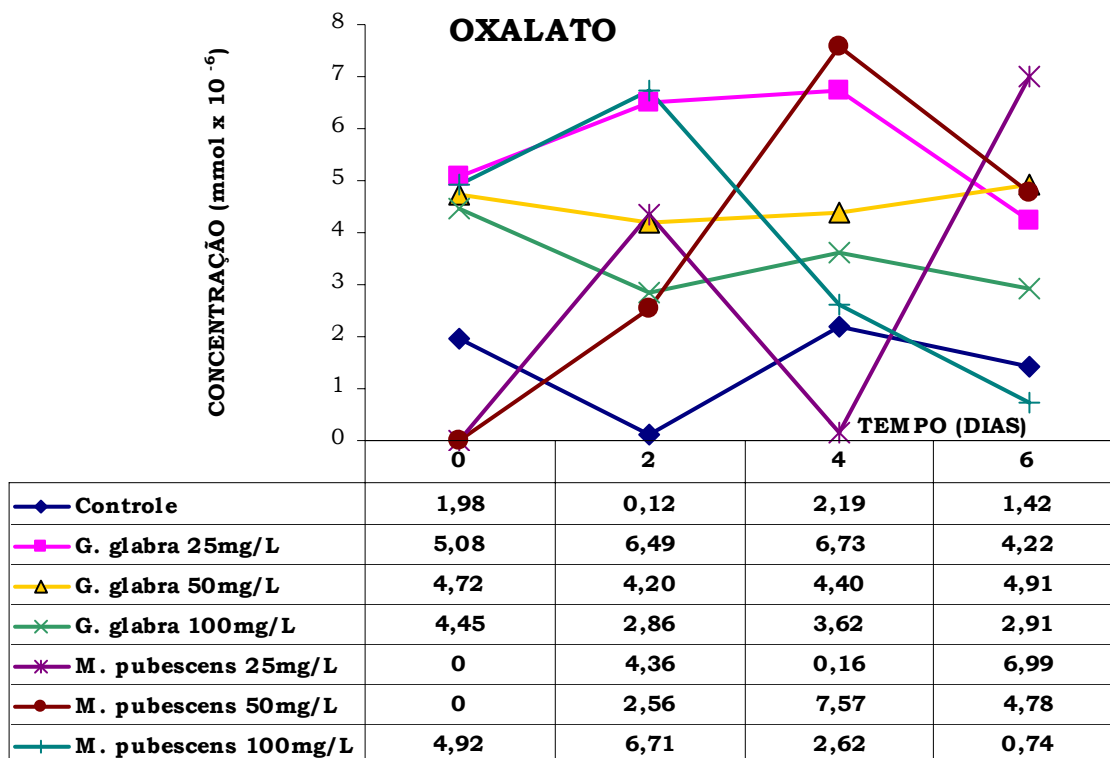


Figura 20: Taxa de concentração de oxalato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100mg.L-1. Legenda: 0 – ácido não detectado.

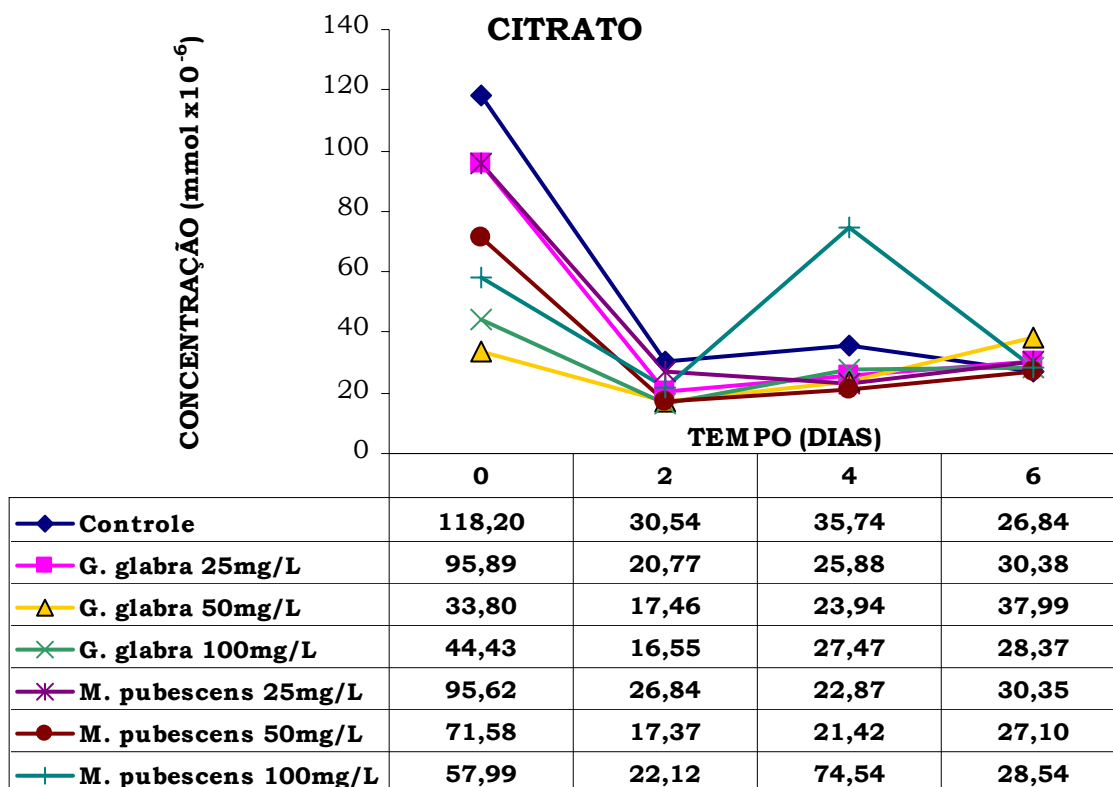


Figura 21: Taxa de concentração de citrato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100mg.L-1.

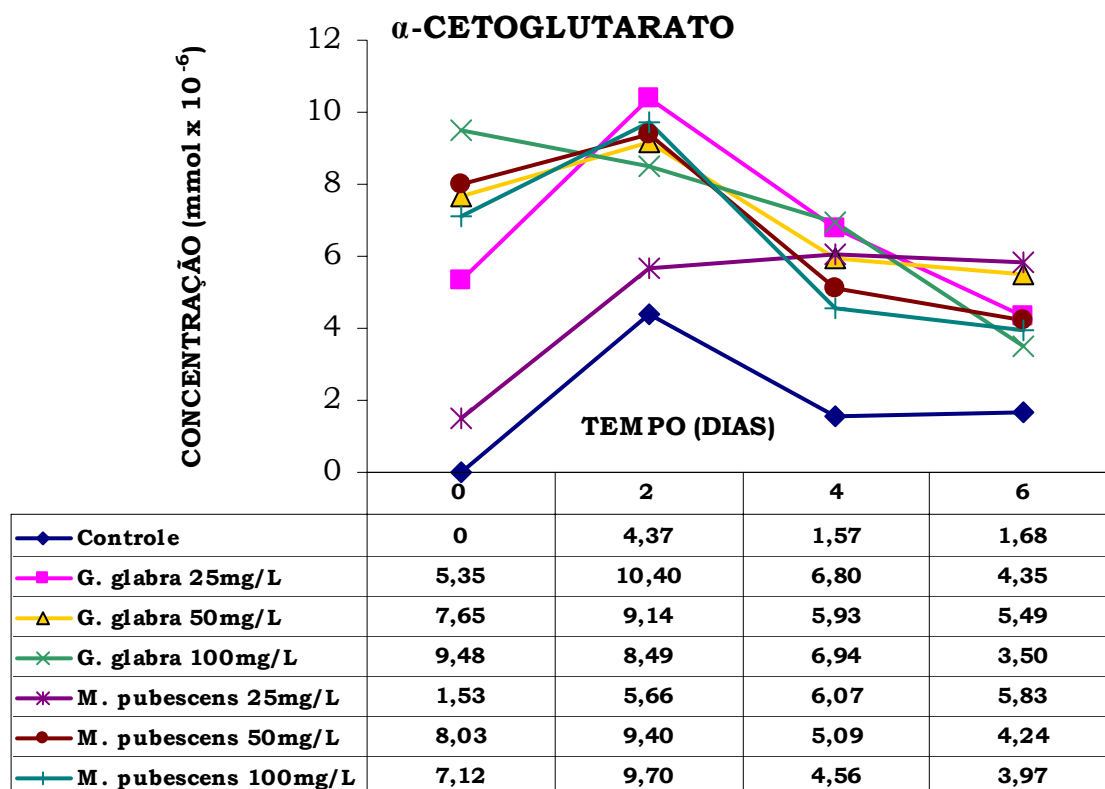


Figura 22: Taxa de concentração de α -cetoglutarato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L⁻¹. Legenda: 0 – ácido não detectado.

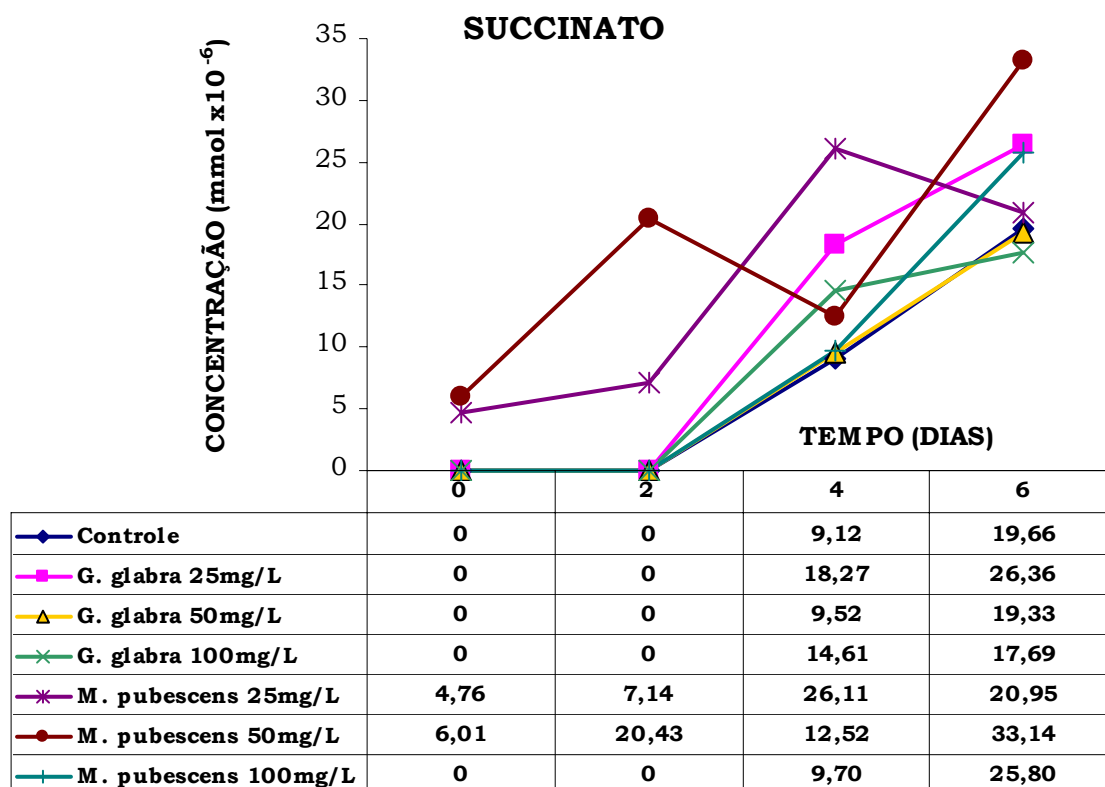


Figura 23: Taxa de concentração de succinato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1. Legenda: 0 – ácido não detectado.

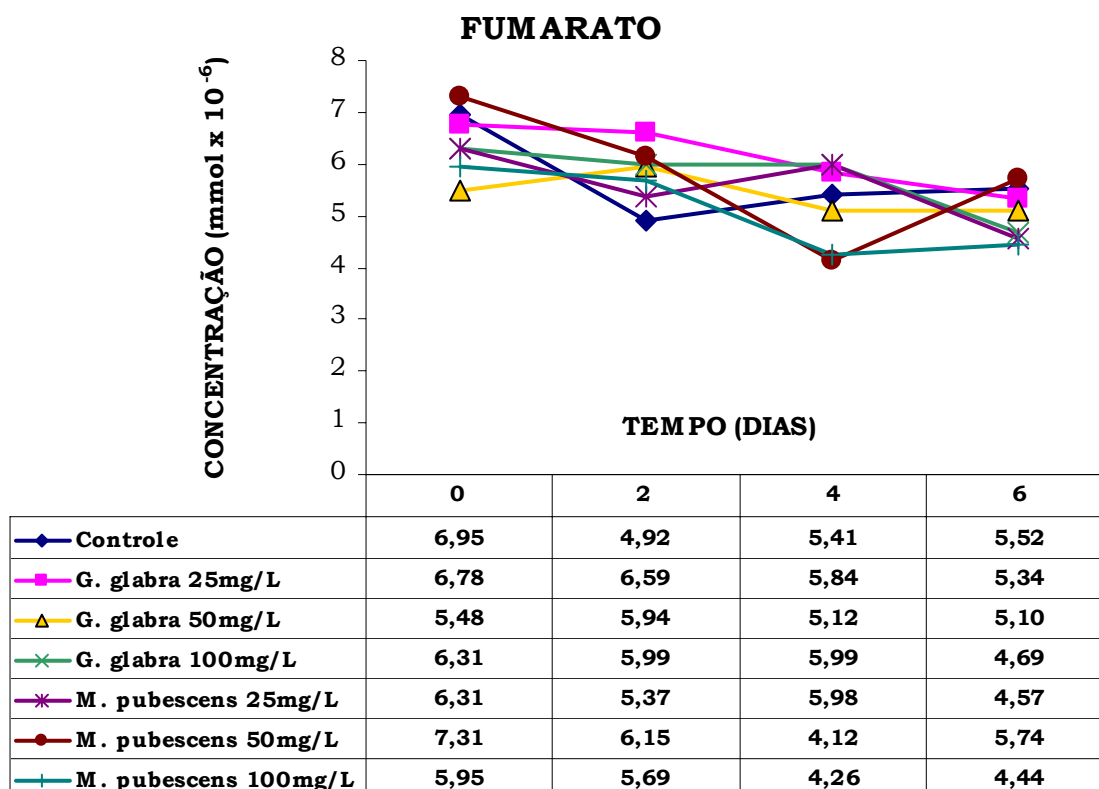


Figura 24: Taxa de concentração de fumarato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.

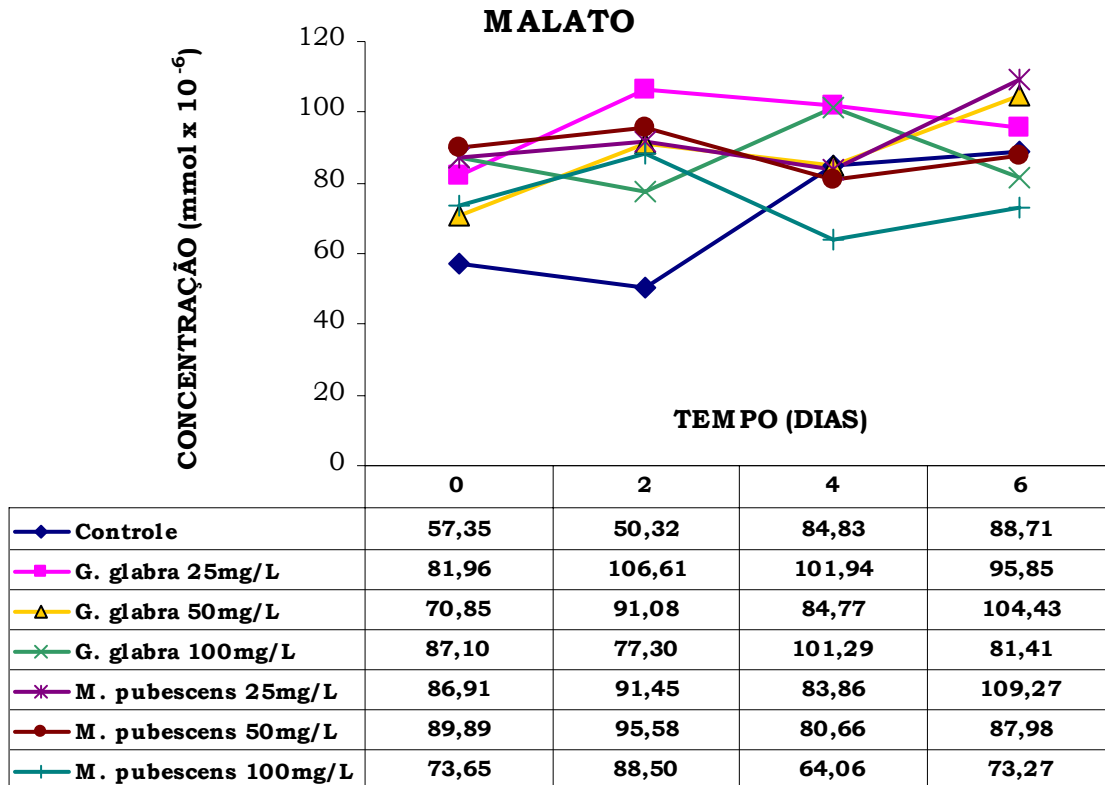


Figura 25: Taxa de concentração de malato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg.L-1.

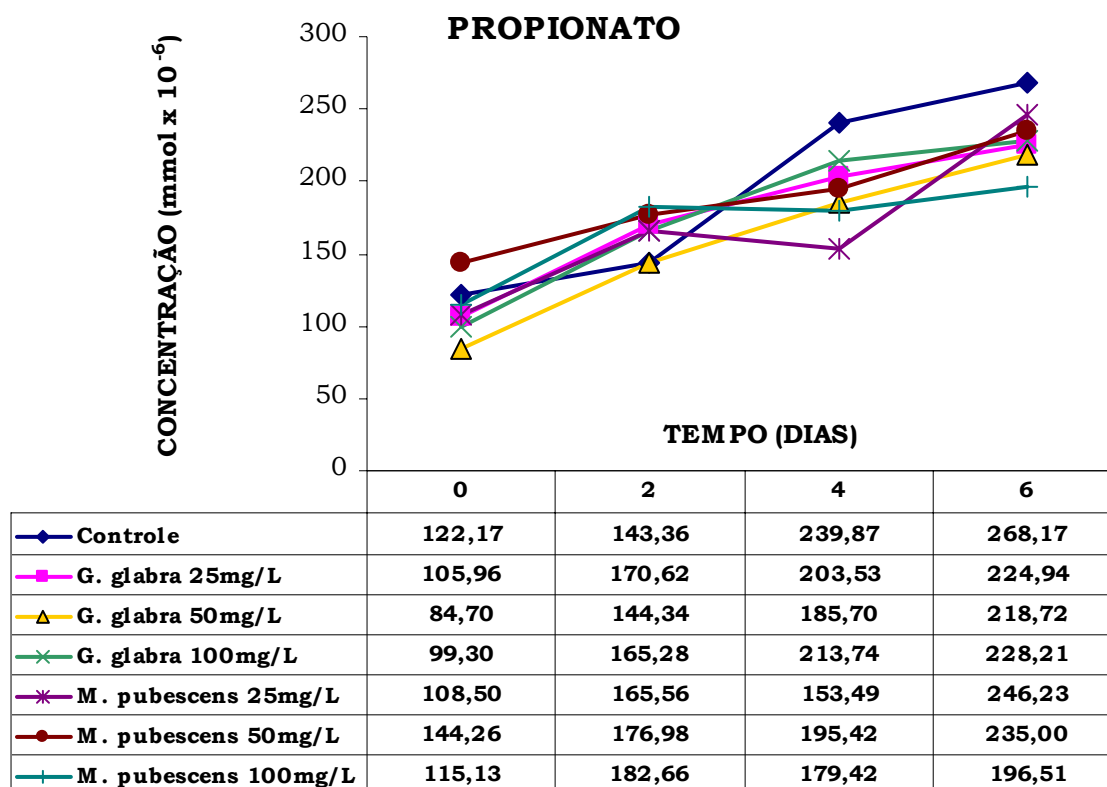


Figura 26: Taxa de concentração de propionato na curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* no início, no segundo, quarto e sexto dias, testadas com *Glycyrrhiza glabra* e *Magonia pubescens*, nas concentrações de 25, 50 e 100mg.L-1.

DISCUSSÃO

Chalconas, alcalóides e taninos se destacam por demonstrar ação sobre o parasito ou sobre seu metabolismo energético ou, ainda, na liberação de interferons atingindo o macrófago, no entanto há um número grande de extratos de plantas, alguns de uso tradicional, que demonstram possuir atividade leishmanicida, porém nem todas substâncias ativas foram identificadas (Gilbert e Favoreto 2005). A necessidade de encontrar drogas antileishmanióticas com menor toxicidade e que consiga contornar a resistência do parasito têm estimulado as pesquisas com produtos naturais no sentido de desenvolver novos fármacos a partir de substâncias extraídas de caules, raízes, folhas e frutos de plantas já utilizadas na medicina popular (Bergmann *et al.* 1997, Geary *et al.* 1989, Harvey 2000).

Estudos foram realizados com a *M. pubescens*, evidenciando os mecanismos de ação e as alterações morfológicas que provocaram as mortes nas larvas de *Aedes aegypti*, mosquito vetor da dengue e da febre amarela. Além disso, estudos toxicológicos realizados em coelhos, ratos e cobaios mostraram-se atóxicos de acordo com as normas para produtos vegetais (Silva *et al.*, 2004). Autores, após avaliarem os efeitos tóxicos de taninos sobre a fauna associada aos culicíneos, sugeriram que os taninos vegetais podem ser úteis como complemento em programas de controle de espécies de mosquitos associados à atividade humana (Pautou 2000).

Os taninos representam um grupo presente em inúmeras espécies de plantas (Porter 1994). Estudos, *in vitro*, com a susceptibilidade das promastigotas de *Leishmania* spp ao tanino, apresentaram toxicidade seletiva para as formas extracelulares (Radtke *et al.* 2003). Apesar disso, no presente trabalho o tingui, que apresenta tanino na sua constituição, apresentou ação inibitória de crescimento para as promastigotas, demonstrando agir também nesta forma do parasito.

O efeito de alguns extratos de plantas é baseado no estabelecimento de resposta modulatória imune ou dos constituintes fenólicos da planta

(Kayser *et al.* 2001, Radtke *et al.* 2003). As frações do tanino podem, também, estar relacionadas com a inibição de produção do óxido nítrico (Kim *et al.* 1999).

Estudos têm apresentado que a chalcona exibe uma potente atividade antileishmanicida *in vitro* e *in vivo*, pois este componente destrói a ultraestrutura da mitocôndria e inibe a respiração e a atividade da desidrogenase mitocondrial da *Leishmania sp.* A licochalcona A é um exemplo típico, ela inibe a atividade da fumarato redutase. Entretanto, os alvos específicos na mitocôndria do parasito não são bem conhecidos, apesar de haver indicações de que o alvo específico da chalcona seja a fumarato redutase do parasito. Esta enzima catalisa a redução do fumarato a succinato e é a chave do metabolismo anaeróbico para muitos organismos que utilizam o fumarato como acceptor de elétrons. Em células de mamíferos o succinato é convertido em fumarato pela ação da succinato desidrogenase e depois é convertido em malato pela fumarase, porém na *Leishmania sp.* todo o malato retorna para a mitocôndria onde é convertido em fumarato pela ação da fumarase e em seguida convertido à succinato pela fumarato redutase (Blum 1994, Chen *et al.* 2001).

Aqui, observou-se que a *G. glabra* apresentou melhor inibição do crescimento na fase estacionária, na qual a via do succinato é essencial, isto indica uma atividade específica para organismos que utilizam o sistema fumarato redutase. As duas plantas testadas possuem componentes ativos contra *Leishmania*, a *G. glabra* apresenta chalcona na sua constituição e a *M. pubescens* frações de tanino. Ambas apresentaram bioatividade contra os parasitos, porém a *M. pubescens* teve menor efeito nas promastigotas como sugere a literatura (Kolodziej *et al.* 2001). A *G. glabra* apresentou melhor inibição do crescimento, entretanto a análise bioquímica dos ácidos orgânicos, apesar de não haver variação significativa nas concentrações de succinato e fumarato, houve um aumento de succinato no teste com alcaçuz 25 e 100 mg.L⁻¹ e diminuição de fumarato, mas não se pode comprovar que tal fato ocorreu pela ação na fumarato redutase.

O piruvato é o produto final da glicólise, no entanto nas promastigotas parte do carboidrato é oxidado, completamente, em CO₂ via ciclo de Krebs, mas grande parte é oxidado em produtos como acetato, piruvato e succinato. Parte do piruvato é transaminado em alanina que é excretada (Cazzulo 1992, Blum 1993). A excreção da alanina explica a não detecção do piruvato nas culturas de promastigotas. Notou-se, ainda, excreção de succinato e este foi influenciado pela presença das plantas na cultura. O succinato é produzido principalmente por via oxidativa envolvendo parte do ciclo de Krebs e oxidação de NADH via cadeia respiratória, somente os estágios que possuem ciclo de Krebs ativo produzem succinato (Van Hellemond *et al* 1997, Tielens e Van Hellemond 1998).

As alterações encontradas nas taxas de concentração dos ácidos orgânicos comprovam que as promastigotas são dependentes da atividade do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória. As condições de substrato e oxigênio são essenciais para a sobrevivência do parasito, no entanto o que garante sua sobrevivência em condições adversas é sua capacidade e habilidade de alterar o metabolismo reduzindo a níveis mínimos ou mesmo revertendo vias metabólicas.

CONCLUSÕES FINAIS

- Viabilizou-se técnicas de estudos bioquímicos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A detecção de ácidos orgânicos, pelo CLAE, se mostrou efetiva no monitoramento do metabolismo de *L. amazonensis*, ampliando a possibilidade de estudos na interação parasito-hospedeiro.

- Os ácidos, lactato, oxalato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato, malato e propionato foram detectados na cultura de *Leishmania* estudada. A promastigota apresentou glicólise, ciclo de Krebs, metabolismo de ácidos graxos e cadeia respiratória ativos, visto que os ácidos orgânicos encontrados são constituintes de tais vias metabólicas. Houve aumento da excreção de citrato, malato e propionato no decorrer da curva de crescimento das promastigotas, sendo que o malato e o propionato apresentaram maior excreção no sexto dia. Não houve diferença significativa quanto às variações encontradas para o oxalato, fumarato e lactato, entretanto o α -cetogluturato foi o único ácido que foi consumido. Este consumo foi significativo a partir do segundo dia de crescimento. O succinato não foi detectado na constituição do meio de cultura utilizado no cultivo das promastigotas, no entanto observou-se que o mesmo foi excretado pelos parasitos no quarto e sexto dias de crescimento (fase estacionária) indicando metabolismo anaeróbio em hipóxia.

- Os extratos de *M. pubescens* (tingui) e de *G. glabra* (alcaçuz) foram ativos em culturas de formas promastigotas de *L. amazonensis* em todas as concentrações estudadas. Ambos apresentaram capacidade leishmanicida. As concentrações mais ativas foram as de 100 mg.L⁻¹ para *G. glabra* e de 25mg.L⁻¹ para *M. pubescens*. A *G. glabra* teve maior efeito durante a fase estacionária, ao contrário da *M. glabra* que foi mais efetivo na fase logarítmica. Estatisticamente foram efetivos *G. glabra* 25 e 100 mg.L⁻¹ no quinto e sexto dias.

- As análises dos ácidos orgânicos nas culturas testadas com *G. glabra* e *M. pubescens*, ambos nas concentrações de 25, 50 e 100mg.L-1 e do controle realizado com salina, observou-se excreção do succinato, visto que este não foi constituinte do meio de cultura. Ambos os ácidos foram excretados no quarto e sexto dias exceto para os testes com *G. glabra* e *M. pubescens*, 100 mg.L-1, cujo acetato foi detectado desde o início da cultura, porém foi consumido em todos os testes no decorrer dos dias de cultura e para a *M. pubescens*, 25 e 50 mg.L-1, que apresentou succinato, também desde o início do crescimento. Não houve diferença significativa para o oxalato, fumarato, malato, lactato e citrato em todos os testes, no entanto o citrato apresentou diminuição da concentração, sendo que na cultura padrão este aumenta no decorrer do crescimento. O α -cetogluturato foi o que apresentou alterações mais significativas. Sua excreção aumentou no segundo dia no teste com *G. glabra* 25 mg.L-1, no quarto dia com *G. glabra* 100 e 25 mg.L-1 e no sexto dia com *M. pubescens* e *G. glabra*, ambos nas concentrações de 25 e 50 mg.L-1.

- Os bioensaios mostraram, por meio das alterações metabólicas observadas nas taxas de concentração dos ácidos orgânicos, uma influência na fisiologia e proliferação das formas promastigotas. O aumento do succinato sob influência dos extratos das plantas testadas indicou a ativação de vias metabólicas anaeróbias. As alterações da taxa de concentração do citrato e do α -cetogluturato indicaram ação por parte das soluções naturais testadas no ciclo de Krebs.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de adaptar seu metabolismo conforme a disponibilidade de substratos energéticos, pois apresentam um ciclo de vida complexo envolvendo dois hospedeiros diferentes. Para estes organismos a glicose é a principal fonte energética, porém promastigotas preferem os aminoácidos (Tielens e Van Hellemond 1998). O conhecimento do metabolismo de parasitos possibilita que sejam encontrados novos sítios de ação, uma vez que estes organismos podem possuir vias bioquímicas diferenciadas de seus hospedeiros ou apresentar inversões no seu metabolismo como forma de resistência (Turrens 2004).

O metabolismo e as vias utilizadas podem ser conhecidos por meio da caracterização dos ácidos orgânicos, que são importantes indicadores bioquímicos (Bezerra *et al.* 1997). A descrição destes processos bioquímicos, que muitas vezes podem ser diferentes daqueles encontrados no hospedeiro, é umas das maiores esperanças para a intervenção terapêutica nas leishmanioses humanas. A grande incidência da doença e o tratamento com compostos altamente tóxicos associados à resistência do parasito despertam o interesse e a busca por novos meios de controle que superem tais dificuldades.

Este trabalho foi realizado na forma de dois artigos, tendo como princípio fundamental subsidiar o controle e o conhecimento integrado da Leishmaniose, bem como valorizar e proteger a riqueza da biodiversidade brasileira. Plantas do Cerrado, como a *M. pubescens*, vêm sendo amplamente investigadas quanto a sua atividade antimicrobiana e antiparasitária e plantas como *G. glabra* já possuem um consumo freqüente na medicina popular para várias enfermidades.

O primeiro artigo procurou caracterizar os ácidos orgânicos durante o crescimento das promastigotas, com o objetivo de identificar suas vias metabólicas e o comportamento bioquímico da *L.*

amazonensis. A metodologia aplicada foi satisfatória para o monitoramento das atividades do ciclo de Krebs, da cadeia respiratória, da via glicolítica e do metabolismo de ácidos graxos.

O segundo artigo mostra a ação da *M. pubescens* e da *G. glabra* no crescimento dos parasitos. Além disso, demonstra a atividade de tais extratos na produção dos ácidos orgânicos do metabolismo das promastigotas, possibilitando a identificação de alvos específicos de ataque.

Os produtos naturais são excelente fonte de biodiversidade, pois apresentam novas moléculas com alto potencial na aplicação terapêutica. No entanto é necessário conhecer e isolar os componentes dos extratos para que se possa testá-los separadamente com o objetivo de se determinar àquele que apresenta melhor atividade e inibe de forma mais efetiva alguma via metabólica essencial.

Os testes realizados neste trabalho ofereceram uma perspectiva de ação, no entanto faz-se necessário estabelecer o mecanismo de ação e correlacionar a estrutura química com a etapa de inibição ou geração de ácidos orgânicos. A correlação entre alvo específico e componente ativo é de extrema prioridade e para isso um conhecimento detalhado do metabolismo do parasito é o primeiro passo.

Observou-se no trabalho que os resultados são inerentes às condições de cultura. Fica aqui destacado a perspectiva de novos testes com outro meio de cultura e outras condições de análise ou mesmo uso de compostos químicos já conhecidos na sua atividade leishmanicida como meio de aprimorar o conhecimento do metabolismo do parasito e até mesmo descobrir novas vias essenciais de ataque.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackrell BAC *et al.*, 1992 in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Muller, F., ed.) , CRC Press. 3: 229–297.

Alcanfor JDX, Silva RC, Bezerra JCB, Ferri PH, Santos SC, 1999. Ação metabólica de *Stryphnodendron adstringens*, Barbatimão do cerrado, sob *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni*. XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia. 2 a 5 de novembro , Poços de Caldas, MG.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG, 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* 112: 2993–3002.

ANVISA – Vigilância Sanitária – www.anvisa.gov.br (acesso em agosto, 2003)

Araújo CAC, Alegrio LV e Leon LL 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry.* 49: 751-754.

Ashford RW, 2000. The leishmanioses as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269–1281.

Barata LES, Santos LS, Ferri PH, Phillipson JD, Paine A e Croft SL 2000. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry.* 55: 589-595.

Barrett MP, 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol. Today.* 13: 11–16.

Berman J, 2003. Current treatment approaches to Leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis (Supl)*. 16(5):397-401.

Bermam JD 1997. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24: 684-703.

Bergmann BR, Costa SS e Moraes VLG, 1997. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. *Brazilian Journal Association for the Advancement of Science.* 49: 395-402.

Bezerra JCB e Becker W, 1994. Efeitos da infecção com *Schistosoma mansoni* no metabolismo de *Biomphalaria glabrata*. *Revista de Patologia Tropical (Supl)*. 23(2): 202.

Bezerra JCB, Becker W e Kemper A, 1995. Metabolism of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*, under hypoxic conditions. XXIV Reunião annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e biologia Molecular, 6 a 9 de maio, Caxambu, MG. p.116.

Bezerra JCB, 1996. The inversion of the cycle course of tricarboxilic acid as facultative metabolism of invertebrate. XXVª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 4 a 7 de maio, Caxambú, MG. p.81.

Bezerra JCB, Becker W e Zelck UE, 1997. A comparative study of the organic acid content of the hemolymph of *Schistosoma mansoni*-resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Supl)*. 92(3): 421-425.

Bezerra JCB, Kemper A e Becker W, 1999. Profile of organic acids concentrations in digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Supl)*. 94(6): 779-784.

Blum JJ, 1993. Intermediary metabolism of *Leishmania*. *Parasitol. Today*. 9: 118-122.

Blum JJ, 1994. Energy metabolism in *Leishmania*. *Bioenerg Biomembr (Supl)*. 26(2):147-55.

Bodeker G, Willcox M, 2000. The first international meeting of the Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods (RITAM). *J Altern Complement Med (Supl)*. 6(2):195-207.

Brener Z, 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. *Tese de Docência livre. Faculdade de Odontologia e Farmácia de Minas Gerais*. Belo Horizonte. p. 99.

Burchmore RJS e Barrett MP, 2001. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*. 31: 1311-1320.

Camacho MR, Phillipson JD, Croft LS, Kirby GC, Warhurst DC e Solis PN, 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry*. 56: 203-210.

Cannata JJB, Cazzulo JJ, 1984. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 297-308.

Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI, 2000. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Rev. Bras. Ci. Farm (Supl)*. 36(1): 69–96.

Carvalho LH, 1991. Antimalarial activity of crude extracts from brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei* infected mice *in vitro* gainst *Plasmodium faciparum* in culture. *Brazilian. J. Med. Biol. Res.* (24): 1113-1123.

Clayton CE and Michels P, 1996. Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitol. Today*. 12: 465–471.

Cazzulo JJ, 1992. Aerobic fermentation on glucose by trypanosomatids. *FASEB J*. 6: 3153–3161.

Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo, BM, Engel JC and Cannata JJB, 1985. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol*. 16: 329-343.

Chatterjee T, Datta AG, 1974. Studies on malate or oxaloacetate formation from bicarbonate and pyruvate or phosphoenolpyruvate in cell-free extracts *Leishmania donovani*. *Comp. Biochem. Physiol.* 47B: 725-738.

Christensen SB, Ming C, Andersen L, Hjerne U, Olsen CE, Cornett C, Theander TG, Kharazmi A, 1994. An antileishmanial chalcone from Chinese Licore roots. *Planta Medica*. 60(2):.121-123.

Chen M, Bennedsen M, Zhai L, Kharazmi A, 2001. Purification and enzymatic activity of an NADH-fumarate reductase and other mitochondrial activities of *Leishmania* parasites. *APMIS*. 109(12):801-8.

Croft SL, Coombs GH, 2003. Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 19(11):502-508.

Craft SL, 2006. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 19(1): 11-26.

Correio Brasiliensis, 2002.

Darling TN, Dvis DG, London RE and Blum JJ, 1987. Products of *Leishmania brasiliensis* glucose metabolism: release of D-lactate and, under conditions, glycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7129-7133.

Darling TN, Dvis DG, London RE and Blum JJ, 1989. Carbon dioxide abolishes the reverse pasteur effect in *Leishmania major* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 191-202.

Daish P and Leonard JV, 1985. Rapid profiling of plasma organic acids by high performance liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 146: 8-91.

Davis AJ, Murray HW and Handman E, 2004. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *TRENDS in Parasitology.* 20(2): 73-76.

Desjeux P, 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.* 95: 239-243.

Desjeux P, 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (2004) 305–318

Enserink M, 2000. Infections diseases. Has Leishmaniasis become endemic in the US? Science. 290: 1881-1883.

Fournet A, Barrios AA, Munõz V, Hocquemiller R e Cavé A, 1992. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. Annals of Tropical Medicine Parasitology. 43: 219-222.

Fournet A, Munõz ABC, Cavé A and Hocquemiller R, 1993. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American *Leishmania* sp. in BALB/c mice. Phytoterapy Research. 7: 281-284.

Fournet A, Munõz ABC, Arias AR, Muñoz V, Hocquemiller R, Cavé A and Bruneton J, 1993. 2- Substitute quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 37: 859-863.

Frayha GJ, Smyth JD, Gobert JG and Savel J, 1997. The Mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. Gen. Pharmacol. 28(2): 273-299.

Galbraith RA, 1991. Intermediary metabolism in *Leishmania mexicana*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 4(2): 180-184

Geary TG, Edgar A, Jensen JB, 1989. In Campbell, W. C. and Rew, R. S. (eds.), Chemotherapy of Parasitic Diseases, Plenum Press, New York. 209-238.

Genaro O, 2000. Leishmaniose Visceral Americana. In: **Neves, D. P. (10. ed). Parasitologia Humana**. São Paulo, Editora Atheneu. 10: 56-72.

Gilbert B e Favoreto R, 2005. Produtos naturais ativos em Leishmaniose. *Revista Fitos*. 1(1): 43-51.

Gontijo B, Carvalho MLR, 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(1):71-80.

Gossage SM, Rogers ME, Bates PA, 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand Flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for parasitology*. 3: 1027-1034.

Grimaldi jr. G e Tesh RB, 1993. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Review*. 6: 230-250.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2: 494-501.

Handman E, 2000. Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* 44: 1-39.

Hart DT and Coombs GH, 1981. The effects of carbon dioxide and oxygen upon the growth and *in vitro* transformation of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 4: 117-127.

Hart DT and Coombs GH, 1982. *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol*. 54: 397-409.

Harvey A, 2000. Estrategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug. Discov. Today*. 5(7): 249-3000.

Haslam E, 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of actions. *Natural Products Reports, United States*. 59 (2): 205-220.

Herbario brasileiro 2006.

<http://www.herbario.com.br/dataherb11/1712alcacuz.htm>.

Herzog-Soares JDA, Alves RA, Bezerra JCB, 1999. Análise da proliferação da *Entamoeba moshkovskii* exposta à diferentes concentrações do extrato da casca de *Stryphnodendron adstringens*. XVI Congresso de Brasileiro de Parasitologia. 2 a 5 de novembro, Poços de Caldas, MG.

Kam TS, Sim KM, Koyana T, Toyoshima M, Hayash M and Komiyama K, 1997. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. *Journal of Natural Products*. 61: 1332-1336.

Karaffa L, Sándor E, Kozma J and Szentirmai A, 1997. Methionine enhances sugar consumption, fragmentation, vacuolation and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenu*. *Process Biochemistry*. 32(6): 495-499

Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H and Croft SL, 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica*. 77: 307-314.

Kayser O, Klodziej H, Kiderlen AF, 2001. Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. *Phytotherapy Research*. 15: 122-126.

Keegan FP, Sansone L and Blum JJ, 1989. Oxidation of glucose, ribose, alanine and glutamate by *Leishmania brasiliensis panamensis*. *Protozool*. 34: 174-179.

Khabnadideh S, Tan CL, Croft SL, Kendrick H, Yardley V, Gilbert IH, 2000. Squalamine analogues as potencial anti-trypanosomal and anti-leishmanial compounds. *Biorg. Med. Chem. Lett*. 10: 1237-1239.

Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Ashford RW, 1974a. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 68: 269-276.

Killick-Kendrick R, 1990. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Comp. Hum*. 65 (Suool.): 37-42.

Kim HM, Kim MJ, Li E, Lyu YS, Hwang CY, AN, NH, 1999. The nitric oxide-production properties of *Solanum lyratum* . *Journal of Ethnopharmacology*. 67: 163-169.

Kolodziej JH, Kayser O, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY, 2001. Antileishmanial activity of hydrolyzable taninins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor alpha release in macrophages in vitro. *Planta Medica*. 67(9): 825-832.

Kohlschutter A, Behbehani A, Langenbeck U, Albani M, Heidemann P, Hoffmann G, Kleneke J, Lehnert W and Wendel U, 1982. A familial

progressive neurodegenerative diseases with 2-oxoglutaric aciduria. *Eur. J. Pediatr.* 138: 32-37.

Lainson R and Shaw JJ, 1987. Evolution, classification geographical distribution. In: Petters, W & Killick-kendrick, R (eds). *The Leishmaniase in Biology and Medicine. Biology and Epidemiology.* Londom. Academic Press. 1(1): 1-120.

Marounek M, Suchorska O and Savka O, 1999. Effect of substrate and feed antibiotics on in vitro production of volatile fatty acids and methane in caecal contents of chickens. *Animal Feed Science and Technology.* 80(3-4): 223-230.

Martin E and Mukkada AJ, 1979. Identification of the terminal respiratory chain in kinetoplast mitochondrial complexes of *Leishmania tropica* promastigotes. *J. Biol. Chem.* 254: , CRC Press. 12192–12198.

Mahaio UV, Roblot F, Hocquemiller R, Cavé A, 1995. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *Journal of Natural Products.* 58: 324-328.

Mcgreevy PB, Marsden PD, 1986. In **Campbell, W. C. and Rew, R. S. (eds.), Chemoterapy of Parasitic Diseases**, Plenum Press, New York, p. 115-127.

Mittal N, Gupta N, Saksena S, Goyal N, Roy U, Rastogi A K, 1998. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sciences.* 63: 1823-1834.

Ministério da Saúde / FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), 2000. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA, MS.

Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahin LR, Menezes CR, Pirmez C, 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermat.* 39:506-514.

Opperdoes FR, 1995 in **Biochemistry and Molecular Biology of Parasites** (Marr, J.J. and Müller, M., eds), pp 19–32, Academic Press.

Pautou MP, Rey D, David JP, Meyran JC, 2000. Toxicity of vegetable tannins on crustacea associated with Alpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 47:323-332.

Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY, 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* 30: 1395–1405.

Pearson RD and Souza AQ, 1996. Clinical spectrum of leishmanioses. *Clinical Infections diseases.* 22: 1-11.

Porter LJ, 1994. Flavans and proanthocyanidins. In: **Harbone, j.b. (ed), The flavonoides.** Advances in Research Since 1986. Chapman and Hall, London. p. 21-64

Radtke OA, Foo LY, Lu Y, Kiderlen AF, Kolodziej H, 2003. Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor- α -release in RAW 264.7 cells. *Zeitschrift fur Naturforschung.* 58c: 395-400.

Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM, 2005. A review of natural products with antiLeishmanial activity. *Phytomedicine*. 12(6-7):514-35.

Sá EV, Sá MA, Souza AVS, Diniz AM, 1992. Saúde e Doenças Tropicais: Comunidades Rurais, Conflitos Agrários e Pobreza. Belém: NUMA, UFPA.

Sartori A, Oliveira MA, Scott P, Trinchieri G, 1997. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *J Immunol*. 159(6):2849-57.

Scalbert A, 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 875-3883.

Scriver RC, Beaudet *al*, Sly WS, Valle D, 1989. *The metabolic basis of inherited disease*, McGraw-Hill, N.Y.

Silva LA, Silva IA, Ferri PH, Santos SC, Bezerra JCB, 1999. Bioatividade de extrato de *Caryocar brasiliensis* (pequizeiro) sobre *Biomphalaria glabrata*, e cercarias de *Shistosoma mansoni*. XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia. 2 a 5 de novembro, Poços de Caldas, MG.

Silva HHG, Silva IG, Santos RMG, Filho ER, Elias CN, 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil.(Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37(5): 396-399.

Silva LJ e Camargo-Neves VLF. As Leishmanioses, uma visão para o clínico - [www.praticahospitalar.com.br/ pratica%2036](http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2036), acesso em 2006.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, 2001. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Tielens AGM, 1994. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitol. Today*. 10: 346–352.

Turrens JF, 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*. 25(1-2): 211-220.

Urbina JA, 1994. Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. 10(3).

Van Hellemond JJ and Tielens AGM, 1997. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol*. 85: 135–138.

Van Hellemond JJ, Van der Meer P and Tielens AGM, 1997. *Leishmania infantum* promastigotes have a poor capacity for anaerobic functioning and depend mainly on respiration for their energy generation. *Parasitology*. 114: 351–360.

Verdini GL, 1996. The combinatory chemistry of nature. *Nature*. 384: 11-13.

Veronesi C. Doenças infecciosas e parasitárias. 8a. Ed. P 250-262.

Yang DM and Liew FY, 1992. Effects of qinghaosu (artemisin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 106: 7-11.

WHO – World Health Organization Statistical Information System Website
– <http://www.who.ch> (acesso em fevereiro, 2006)