



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CARINA HELENA DA SILVA

**Avaliação dos mecanismos de ação da lectina de *Cratylia mollis*
(Cramoll 1,4) sobre *Leishmania* spp**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Dra. Andrezza Raposo Borges

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Recife, 2014

CARINA HELENA DA SILVA

Avaliação dos mecanismos de ação da lectina de *Cratylia mollis*
(Cramoll 1,4) sobre *Leishmania* spp

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Biológicas do
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco para a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Dra. Andrezza Raposo Borges

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Recife, 2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Carina Helena da

Avaliação dos mecanismos de ação da lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) sobre *Leishmaniaspp* – Recife: O Autor, 2013.

65 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Teresa dos Santos Correia

**Coorientadores: Andrezza Raposo Borges e Álvaro Aguiar Coelho
Teixeira**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2014**

Inclui bibliografia e anexos

1. Leishmaniose 2. Lectinas I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Borges, Andrezza Borges (coorientadora) III. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho (coorientador) IV. Título

614.534

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 243

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Parecer da Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado
CARINA HELENA DA SILVA

Avaliação dos mecanismos de ação da lectina de *Cratylia mollis*
(Cramoll 1,4) sobre *Leishmania* spp

Recife, 25 de Fevereiro de 2014.

A comissão examinadora, composta pelos professores e doutora abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a mestrand **CARINA HELENA DA SILVA** como:

Recife, 25 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE- orientadora)

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (UFRPE-co-orientador)

Profa. Dr. Maria das Graças Carneiro da Cunha (UFPE)

Dra. Andrezza Raposo Borges (UFPE-co-orientadora)

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (UFPE)

Aquele que me proporcionou a vida e a coragem para lutar por ela... O meu Deus.
Aqueles escolhidos por Deus para estarem ao meu lado... Antônio
Oreste e Helena Rodrigues, meus pais.
A eles dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Por tudo o que fizestes e tudo o que irás fazer, eternamente grata serei... Ao meu Deus, por conceder-me incontáveis bênçãos. A vida e tantas oportunidades, como a realização deste sonho, o Mestrado. Agradeço pela constante companhia em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis, sempre pude sentir a presença do soberano Deus, invisível, mas real, fazendo-me feliz independente das circunstâncias.

Aos meus queridos pais Antônio Oreste e Helena Rodrigues, pelo amor, cuidados, carinho e dedicação em todos os anos de minha vida. A pessoa que me tornei, o caráter que tenho e as metas que já alcancei, são frutos de seus constantes esforços.

Agradeço aos meus queridos irmãos Carlos, Cláudio e Cezar, pelos cuidados, apoio, por acreditarem na conquista dos meus ideais. Aos amores da minha vida, minhas lindas sobrinhas Camile, Ridyny e Radassa, por tornarem minha vida mais bonita, pois sabem o segredo de meu sorriso. As minhas cunhadas Maria e Gerlane, pois também são participantes desta conquista.

Aos meus amados amigos do grupo jovem Filadélfia, minha gratidão, por durante estes dois anos sempre me apoiar, incentivar e acima de tudo orar, sei que contribuíram profundamente para esta conquista. Ao meu amigo João, pela força e incentivo. Meu querido amigo Wellington, por tornar doce tantos momentos amargos de minha vida, pela companhia e por tantas palavras certas nas horas necessárias.

Minha querida amiga Rosy, que esteve comigo desde o início da graduação, com quem pude dividir alegrias, ansiedades, angústias, trabalhos e agora a vitória de juntas concluirmos o Mestrado, sempre serei grata. Não tenho dúvidas que Deus a colocou em minha vida para ajudar-me, pois sabia que sozinha não conseguiria.

Agradeço a professora Dra Maria Tereza, por aceitar orientar-me e atenciosamente sempre ajudar no desenvolvimento deste trabalho, por se preocupar com minha satisfação na pesquisa.

Minha sincera gratidão a Dra Andreza Borges, pela atenciosa co-orientação. Sei que nosso trabalho foi um desafio, mas juntas vencemos, nunca esquecerei todo apoio que me ofertou.

Ao Professor Dr. Álvaro Aguiar meu co-orientador, meu exemplo de calma e paciência, agradeço por sempre estar disposto a me ajudar.

Sou grata aos meus companheiros de laboratório e amigos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, a Professora Valéria, pelo carinho e apoio.

A Dra Regina Bressan por me ter acolhido tão bem para desenvolver esta pesquisa no laboratório de Biologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz.

Sou grata a agradável companhia dos meus amigos do laboratório de Glicoproteínas da UFPE, em especial Raiana, pela ajuda neste trabalho. Minhas queridas companheiras de trabalho do laboratório de Biologia Celular, por tornarem nosso trabalho mais agradável e divertido.

Aos meus queridos companheiros da turma do mestrado, nunca esquecerei nenhum deles, pois fiz amizades que levarei por toda a vida.

A Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de realização deste curso, bem como pelas instalações onde foram desenvolvidos os experimentos.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, pelas instalações dos laboratórios, onde parte desta pesquisa foi desenvolvida.

A Pós Graduação em Ciências Biológicas, a cada professor pela grande contribuição científica. Agradeço a Adenilda, nossa secretária, que sempre esteve disposta a resolver as nossas necessidades relacionadas ao Curso.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Sei que cada situação vivenciada, cada pessoa que conheci, cada experiência, foram permitidas por Deus, a Ele minha gratidão maior.

RESUMO

SILVA, Carina Helena. **Avaliação dos mecanismos de ação da lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) sobre *Leishmania* spp.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2014.

As leishmanioses são doenças endêmicas que constituem sérios problemas de saúde pública podendo levar a uma extensa mortalidade e morbidade. São classificadas em leishmanioses tegumentar (LT), e visceral (LV), provocadas por protozoários do gênero *Leishmania* e no Brasil as principais espécies envolvidas em sua propagação são a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania chagasi* para LT e LV respectivamente. Antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha, no entanto a recidiva devido à resistência dos parasitas, e os efeitos colaterais, ocasionados pela elevada toxicidade destes medicamentos tem revelado a necessidade da busca pelo tratamento adequado das leishmanioses. Cramoll 1,4, uma lectina extraída das sementes de *Cratylia mollis*, uma planta forrageira da família das Leguminosae encontrada no sertão do Nordeste brasileiro, em estudos anteriores tem demonstrado o seu perfil biotecnológico, como propriedades antimicrobiana, antitumoral e antiparasitária. Diante das importantes aplicações biológicas de Cramoll 1,4 a presente pesquisa teve por objetivo analisar os mecanismos de ação desta lectina sobre *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Os seguintes testes foram realizados: Atividade leishmanicida, análise da citotoxicidade, produção de Óxido Nítrico e análise em microscopia eletrônica de transmissão. A atividade leishmanicida de Cramoll 1,4 foi determinada através da IC₅₀, que revelou a grande efetividade da lectina para as formas promastigotas das duas espécies de *Leishmania*. Cramoll 1,4 não apresentou citotoxicidade frente às células de mamíferos, possuindo alto grau de seletividade para os promastigotas. A lectina induziu a síntese de Óxido Nítrico (molécula importantíssima para a resposta imunológica às infecções causadas por *Leishmanias*) por macrófagos, mostrando seu perfil imunomodulatório. A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou alterações severas causadas nos parasitas após tratamentos com Cramoll 1,4, como mudanças na morfologia, surgimento de vacúolos e desintegração das membranas celular e nuclear. Estas alterações são compatíveis com a perda de viabilidade e morte celular. Nossos resultados sugerem a Lectina Cramoll 1,4 como agente promissor no desenvolvimento de novo fármaco para o tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar.

Palavras chave: *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*, Cramoll 1,4, Tratamento.

ABSTRACT

SILVA, Carina Helena. **Evaluation of the action mechanisms of *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) lectin on *Leishmania* spp.** 2014. Thesis (MA in Biology) – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, 2014.

Leishmaniasis is endemic diseases are serious public health problems may lead to extensive morbidity and mortality. They are classified as cutaneous leishmaniasis (LT), and visceral (VL), caused by protozoa of the genus *Leishmania* and Brazil the main species involved in its spread are the *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi* for LT and LV respectively. Pentavalent antimonials are the drugs of first choice, however relapse due to parasite resistance, and side effects caused by the high toxicity of these drugs has revealed the need to search for the appropriate treatment of leishmaniasis. Cramoll 1.4, one extracted from the seeds of *Cratylia mollis*, a forage plant of the family Leguminosae found in the backwoods of northeastern Brazil, previous studies have demonstrated its lectin biotechnological profile, such as antimicrobial properties, antitumor, and antiparasitic. Given the important biological applications Cramoll 1.4 this research was to analyze the mechanisms of action of this lectin on *L. amazonensis* and *L. chagasi*. The following tests were performed on promastigote parasites: leishmanicidal activity, analysis of cytotoxicity, production of Nitric Oxide and analysis in transmission electron microscopy. The leishmanicidal activity Cramoll 1.4 was determined by IC₅₀, which revealed the great effectiveness of the lectin for promastigotes of two species of *Leishmania*. Cramoll 1,4 front showed no cytotoxicity to mammalian cells having a high degree of selectivity for promastigotes. The lectin induced the synthesis of Nitric Oxide (molecule important for the immune response to infections caused by *Leishmania*) by macrophages, showing their immunomodulatory profile. Analysis by transmission electron microscopy revealed severe alterations caused in parasites after treatment with Cramoll 1,4 as changes in morphology, appearance of vacuoles and disintegration of cellular and nuclear membranes. These changes are consistent with the loss of viability and cell death. Our results suggest Lectin Cramoll 1.4 as a promising agent in the development of new drug for the treatment of leishmaniasis, visceral and cutaneous.

Keywords :*Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*, Cramoll 1.4, Treatment.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 2 - Casos de Leishmaniose Cutânea.....	21
Figura 3 - Casos de Leishmaniose Mucocutânea.....	21
Figura 4 - Casos de Leishmaniose cutânea difusa.....	21
Figura 5 – Caso de Leishmaniose Visceral.....	23
Figura 7 – <i>Cratyilia mollis</i> e sementes	28

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Efeito de Cramoll 1,4 sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*.....48

Figura 2. Efeito de Cramoll 1,4 sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi*.....48

Figura 3. Produção de óxido nítrico por macrófagos após 48 h de tratamento com a lectina Cramoll 1,4.....49

Figura 4. Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (A) - Célula controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (K) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo a bolsa flagelar. Núcleo central (N) com nucléolo evidente e nucleoplasma homogêneo e eletrondenso. (B-C) Células tratadas com a IC₅₀ de Cramoll 1,4, apresentando grandes vacúolos (V) e desorganização do núcleo e cinetoplasto, notável aumento de inclusões lipídicas (*) em (C) desorganização do retículo endoplasmático (seta). (D-E) Células drasticamente alteradas submetidas ao tratamento com 2 x IC₅₀ de Cramoll 1,4 com uma intensa desorganização interna, e surgimento de espaços eletrnluscentes (*) e vacúolos (V), desintegração da membrana plasmática (seta), em (E) presença de numerosas inclusões lipídicas (*brancos).....50

Figura 5. Formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (A) - Célula controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (K) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo a bolsa flagelar. Núcleo central (N) com nucléolo evidente eletrondenso. (B-C) Células tratadas com a IC₅₀ de Cramoll 1,4, apresentando grandes vacúolos (V) e grandes espaços no citoplasma (*), desorganização do núcleo e com desintegração da membrana nuclear (seta), surgimento de inclusões lipídicas (*brancos) em (C). Em (B) aumento notável do volume do cinetoplasto (K). (D-E) Células submetidas ao tratamento com 2 x IC₅₀ de Cramoll 1,4, drasticamente alteradas, com perda excessiva de material citoplasmático

com grandes espaços eletróluscentes (*) e vacúolos (V), em (D) presença
de numerosas inclusões lipídicas (*brancos).....51

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1.Efeito citotóxico da lectina Cramoll 1,4.....	52
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

CC₅₀: Concentração Citotóxica em 50% das células de mamíferos

CDC : Centros de Controle e Prevenção de Doenças

Cramoll: Lectina de *Cratilya mollis*

DMSO: Dimetilsulfóxido

ELISA: Enzyme-LinkedImmunoabsorbentAssay

IC₅₀: Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas promastigotas

IL: Interleucina

INF- γ : Interferon gama

IS: Índice de sobrevivência

LPG: lipofosfoglicano

LT: Leishmaniose Tegumentar

LV: Leishmaniose Visceral

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NaCl: Cloreto de Sódio

NO: Óxido Nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

OsO₄: Tetróxido de Ósmio

PBS: Tampão fosfato-salino

SGS : estibogluconato de sódio

Sinan: sistema de informação de agravos de notificação

spp: espécies

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

WRAMC: Centro Médico do Exército Walter Reed

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 <i>Leishmania</i> spp.....	18
3.2 Leishmanioses.....	20
3.3.1 Leishmaniose Tegumentar.....	20
3.3.2 Leishmaniose Visceral.....	22
3.4 Tratamento para as leishmanioses.....	23
3.5 Plantas medicinais.....	24
3.6 Lectinas.....	25
3.7 Cramoll 1,4.....	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	53
ANEXOS.....	54

1 INTRODUÇÃO

O interesse na medicina moderna pelos compostos extraídos dos vegetais é crescente ao longo dos anos, principalmente pela elevada incidência de efeitos colaterais, ausência de eficácia na terapêutica, os altos custos na sua produção e o grande aumento na resistência às drogas convencionais (BORGES; BAUTISTA; GUILERA, 2008; UPCROFT; UPCROFT, 2001).

Dentre os compostos produzidos pelas plantas destacam-se os metabólitos primários que são essenciais à sua sobrevivência e desenvolvimento, dentre eles, estão os ácidos nucléicos, carboidratos, lipídeos e proteínas (VERPOORTE; MEMELINK, 2002). Algumas destas proteínas, tais como as lectinas, estão relacionadas com seus mecanismos de defesa, uma vez que várias evidências demonstram a sua capacidade em desempenhar esse papel. As lectinas se distribuem amplamente entre plantas, animais e microrganismos e são conhecidas por sua capacidade em ligar-se especificamente a carboidratos presentes em superfícies celulares (CORREIA; COELHO, 1995; KAWAGISHI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2013; SUN et al., 2007). As lectinas possuem importantes atividades, como inseticida, antimicrobiana, antitumoral e antiviral (CARVALHO et al., 2012; DA SILVA; CORREIA, 2013; FANG, et al., 2010; NUNES et al., 2012; SÁ et al., 2009; SADEGHI, et al., 2008; SWANSON et al., 2010).

As plantas constituem ricas fontes de lectinas e sua distribuição pode ocorrer nas raízes, folhas, flores, frutos, sementes, tubérculos, bulbos, rizomas e entrecascas. Sementes de *Cratylia mollis* Mart. ex. Benth contêm lectinas e isoformas de lectinas denominadas Cramoll (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3, Cramoll 4 e Cramoll 1,4), e assim como as demais lectinas possuem especificidade de ligação a determinado carboidrato ou glicoconjugado, Cramoll 1,4 é específica pra glicose/manose (CORREIA; COELHO, 1995; PAIVA; COELHO, 1992).

Cramoll 1,4 (preparações contendo Cramoll 1 e Cramoll 4) vem sendo estudada quanto as suas aplicações em ensaios biológicos, como reconhecimento diferencial do padrão de glicosilação de células tumorais (DE LIMA et al., 2010) e atividade tripanocida (FERNANDES et al., 2010). Estudos têm demonstrado o perfil imunomodulatório da Cramoll 1,4, como atividade mitogênica em linfócitos humanos, indução de citocinas e memória imunológica (MACIEL et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

As plantas e seus extratos são potentes agentes farmacêuticos que vêm sendo utilizados tradicionalmente por culturas nativas no tratamento de diversas doenças infecciosas e parasitárias (OKIGBO; MMEKA, 2008; SANTORO et al., 2007). Dentre as principais

doenças causadas por parasitas, estão as leishmanioses, provocadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que podem levar à altas taxas de mortalidade e morbidade, tornando-as endêmicas em países subdesenvolvidos, constituindo sérios problemas de saúde pública (FONSECA-SILVA et al., 2013; VENDRAMETTO; SANTOS; NAKAMURA, 2010).

As leishmanioses podem ser classificadas em cutânea ou tegumentar (LT) e visceral (LV). A LT é constituída por pápulas e úlceras simples, geralmente únicas, podendo ocorrer o acometimento difuso de pele e mucosas ocasionando a Leishmaniose mucocutânea (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Constitui um sério problema de saúde pública em 88 países, além de ser considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis doenças infecciosas mais importantes, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (Organização Mundial de Saúde, 2010). *Leishmania amazonensis*, um dos principais agentes causadores desta doença, está associada à leishmaniose tegumentar no Brasil (BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

A leishmaniose visceral é uma doença crônica grave, potencialmente fatal, a qual se caracteriza por febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia (GOTIJO; MELO, 2004). *Leishmania chagasi* é um dos principais agentes causadores da leishmaniose visceral (LV) nas Américas.

Diferentes fatores como o crescimento da população, a imigração de pessoas não imunes às áreas endêmicas, atividade de insetos flebotomíneos infectados, presença de tocas de roedores, pessoas que sofrem de lesões ou feridas crônicas, têm proporcionado um ambiente adequado para a prevalência das leishmanioses em localizações específicas (VALIZADEH et al., 2005; YAGHOUBI-ERSHADI et al., 2002).

As principais drogas utilizadas para o tratamento dos diferentes tipos de leishmanioses desde o início do século passado são antimoniais pentavalentes, que induzem graves efeitos colaterais devido a sua toxicidade (KEDZIERSKI et al., 2009; KHATAMI et al., 2007).

Diante do potencial biotecnológico da Cramoll 1,4 associado à necessidade para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses surge uma nova perspectiva nesse sentido. A avaliação de seus efeitos sobre os parasitas e dos mecanismos intracelulares envolvidos constitui um campo aberto. Tais aplicações representam um passo fundamental para o uso de lectinas como novo fármaco, que implicará em ganhos sob o ponto de vista científico, social e econômico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da lectina Cramoll 1,4 sobre *Leishmania* spp em ensaios in vitro.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter Cramoll 1,4 através de protocolo pré-estabelecido;
- Determinar a atividade biológica de Cramoll 1,4 sobre a viabilidade e proliferação das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*;
- Analisar o efeito de Cramoll 1,4 sobre a ultraestrutura da *L. amazonensis* e *L. chagasi*, através de microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar o efeito imunomodulatório de Cramoll, 1,4 sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos intraperitoneais.
- Avaliar o efeito citotóxico e seletividade de Cramoll 1,4 frente a macrófagos intraperitoneais e *L. chagasi* e *L. amazonensis*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Leishmania* spp

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, caracterizados principalmente pela presença de uma única mitocôndria diferenciada, rica em DNA (kDNA), chamada cinetoplasto. Ao contrário de qualquer outro tipo de DNA na natureza, kDNA está organizado de uma rede única gigante de anéis entrelaçados. Estes parasitas são causadores das infecções denominadas leishmanioses, transmitidas através da picada de insetos flebotômíneos (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990). Mais de 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas por causar doenças em seres humanos (KAYE; SCOTT, 2011).

As *Leishmanias* possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, sendo estes, responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro (figura 1). Nos mamíferos, incluindo o homem, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário, principalmente macrófagos. À medida que as formas amastigotas vão se multiplicando, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Nos flebotômíneos as *Leishmanias* vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo, livres ou ligados à microvilosidades. Ali, as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas, denominadas promastigotas, morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (SELVAPANDIYAN, et al., 2012; WALTERS, 1993).

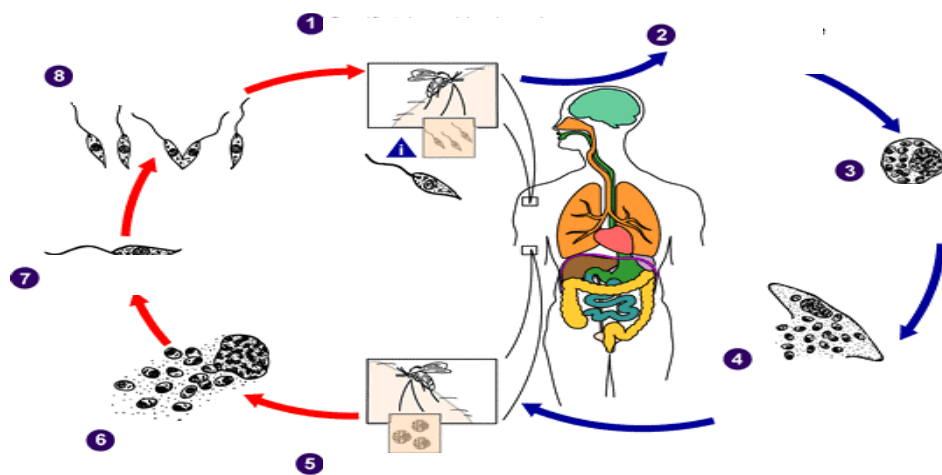
Insetos do gênero *Lutzomyia* são os responsáveis pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina. Destas, pelo menos 200 ocorrem na bacia amazônica (GILL et al., 2003).

No Brasil os mais importantes reservatórios animais são o cão (*Canis familiaris*) e a raposa (*Dusycion vetulos*), que agem como mantenedores do ciclo da doença. O homem pode ser fonte de infecção, sobretudo quando a leishmaniose incide sob a forma de epidemia (FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS, 2010).

Após a inoculação dos parasitas no hospedeiro, macrófagos e células dendríticas presentes na derme e epiderme são capazes de internalizá-los, podendo apresentar aos linfócitos T CD4⁺ Th1 os antígenos contra *Leishmania* que foram destruídas. Estes por sua

vez, irão induzir a produção de citocinas com padrão inflamatório (IL-2, IL-12, TNF- α , INF- γ) levando à ativação de macrófagos e destruição dos parasitas (GOLLOB, 2008). Esta via de ativação geralmente leva a um processo inflamatório intenso e posterior resolução do processo infeccioso (HERNANDEZ, 2006). Por outro lado, se a resposta for do padrão T CD4⁺ Th2 com a produção de interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 haverá uma inibição da ativação dos macrófagos e da produção de IL-12, o que permitirá que a *Leishmania* escape do local de inoculação e ocorra a disseminação local ocasionando a leishmaniose tegumentar do tipo difusa, ou para outros órgãos, gerando a leishmaniose visceral (COSTA, 2011).

Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp



Fonte: <http://dpd.cdc.gov> (adaptado)

- (1) Flebotomíneo faz repasto sanguíneo (injeta promastigota);
- (2) Promastigotas são fagocitados por macrófagos;
- (3) Promastigotas são transformados em amastigotas dentro dos macrófagos;
- (4) Multiplicação de amastigotas com rompimento de macrófagos e liberação dos parasitas;
- (5) Flebotomíneo faz o repasto sanguíneo, ingerindo amastigotas;
- (6) Ingestão de células parasitadas;
- (7) Amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino médio do inseto;
- (8) Divisão binária e migração para a probólide do inseto.

3.2 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponozoonoses classificadas em: leishmaniose cutânea ou tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (PIMENTEL et al., 2012). A sua epidemiologia e seus aspectos clínicos são altamente variáveis, devido à interação de vários fatores relacionados aos parasitas, especialmente a espécie de *Leishmania* envolvida, além dos vetores, hospedeiros vertebrados e do ambiente (GONTIJO; MELO, 2004).

3.2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

LT é uma das infecções dermatológicas que mais merece atenção devido a sua magnitude e riscos de deformidades, podendo ter repercussões psicológicas e reflexos no campo social dos indivíduos. Os principais sinais clínicos da leishmaniose tegumentar são a presença de úlceras cutâneas, com fundo granuloso e bordas infiltradas em molduras. Na realidade a LT produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato. As lesões exclusivamente na pele se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor (Figura 2). A LT ainda pode apresentar-se na forma mucocutânea, que neste caso é frequente a presença de úlcera na mucosa nasal, com ou sem perfuração, ou perda do septo nasal, podendo atingir lábios, palato e nasofaringe (Figura 3). Estas lesões são geralmente vistas meses ou anos após o primeiro episódio da leishmaniose cutânea, quando os macrófagos da mucosa naso-orofaringe tornam-se infectados (CHAPPUIS et al., 2007; FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS, 2010). Outra forma da doença é a Leishmaniose cutânea difusa (Figura 4) que embora apresente poucos casos no Brasil, constitui-se a forma mais grave e severa da LT, em que os principais sintomas são linfadenomegalia palpável, deformidades ósseas, lesões cutâneas em membros inferiores e superiores, tronco e face (COSTA et al., 2009).

Na América Latina as principais espécies causadoras da LT são a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (GOTO; LINDOSO, 2010).

A LT é amplamente distribuída, cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões: Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental do Oriente Médio para a Ásia Central. Os dez países com as maiores contagens de casos estimados são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos são responsáveis por 70 a 75 % da incidência global de LT (ALVAR et al., 2012).

São crescentes os casos de LT no Brasil e no mundo, no ano de 2009 foram notificados 23.399 casos confirmados, sendo 94,1% casos novos e 4,6% recidivas. Com relação às manifestações clínicas, 93,7% dos casos apresentaram forma clínica cutânea e 6,2%, manifestação clínica mucosa (PELISSARI; CECINEL; SOUSA-GOMES, 2011).

Figura 2 –Casos de Leishmaniose Cutânea



Fonte: <http://www.issoe.com/blog>

Lesões ulcerosas causadas por Leishmaniose Tegumentar (cutânea).

Figura 3 – Caso de Leishmaniose Mucocutânea



Fonte: VELOSO, et al., 2006

A-Destruição total da cartilagem nasal com extensão da lesão ao lábio superior. Lesões Infiltradas e ulceradas na região malar esquerda em diferentes estágios evolutivos. B - Ulcerações com abundante secreção purulenta e necrose na região malar esquerda e lábio superior. Corroído em infiltrada lesão na mucosa do palato duro.

Figura 4 - Casos de Leishmaniose Cutânea Difusa



Fonte: COSTA, et al., 2009.

A - Lesões do tipo pólipode na base da orelha esquerda, associado à placa infiltrada com exulceração no contorno da orelha. Lesão do tipo tubérculo na asa do nariz esquerdo. B - Lesões do tipo placas infiltrativas, algumas com exulceração comprometendo as pernas direita e esquerda. Lesão do tipo tubérculo com exulceração localizada no joelho esquerdo.

3.3.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

Leishmania chagasi é o agente etiológico da leishmaniose visceral encontrado nas Américas e consequentemente no Brasil. Há controvérsias em relação à classificação de *L. chagasi* e *Leishmania infantum*, pois muitos afirmam se tratarem da mesma espécie, uma vez que causam Leishmaniose Visceral tanto em humanos quanto em animais. Por outro lado, a *Leishmania donovani* é responsável pela infecção apenas em humanos (GONTIJO; MELO, 2004; LUKES et al., 2007; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

Os primeiros casos de LV aconteceram na Índia no ano de 1885 e, somente em 1903, William Boog Leishman e Charles Donovan descreveram o agente causador desta doença, associando-o as formas de *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903).

Existem dois tipos de LV, que diferem nas suas características de transmissão: LV zoonótica que é transmitida do animal ao vetor, e do vetor ao ser humano e LV antroponótica, transmitido do ser humano para vetor, e deste para o ser humano. No primeiro caso, os seres humanos são hospedeiros ocasionais, enquanto que os animais, principalmente cães, são o reservatório do parasita. LV zoonótica é encontrada em áreas de transmissão pelo parasita *L. infantum*. Enquanto a LV antroponótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. donovani* e *L. chagasi* (ALVAR et al., 2004). O cão doméstico é um elemento de extrema importância no ciclo epidemiológico da LV, uma vez que age como hospedeiro do parasita, sendo, portanto, um dos alvos para as estratégias de controle (SILVA, 2007).

Após a infecção pelos flebótomos, os parasitas se disseminam através do sistema linfático e vascular e infectam monócitos e macrófagos do sistema retículo-endotelial, resultando na infiltração na medula óssea, causando hepatoesplenomegalia e, por vezes, linfonodos aumentados (linfadenopatia) (Figura 5). É importante ressaltar que a infecção nem sempre condiz com a doença clínica. A proporção de infecções assintomáticas incidentes a casos clínicos varia (CHAPPUIS et al., 2007; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000).

A transmissão da LV era inicialmente silvestre, ou concentrada em pequenas localidades rurais. No entanto, desde a década de 1980 a doença se tornou endêmica e epidêmica em centros urbanos de médio porte e grandes cidades brasileiras, em área domiciliar e peridomiciliar, e cada vez mais, ela vem se urbanizando de forma crescente e novas epidemias ocorrem mesmo com as tentativas de avanços nas estratégias de controle (FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS, 2010).

No Brasil a doença começou a ter notificação obrigatória em 1978 e no ano de 2009, 20 estados brasileiros já haviam registrado casos de leishmaniose visceral (ALVES, 2009).

No período de 1980 a 2004, foram registradas no Brasil 57.766 casos de LV, com 2.911 óbitos. Na década de 1990, apenas 10% dos casos relatados ocorreram fora da Região Nordeste, no entanto nos anos de 2000-2004 mais de 30% dos casos foram notificados nas regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste do país (WERNECK, 2008).

De acordo com o sistema de informação de agravos de notificação (Sinan) a média de casos de LV no período de 2005 a 2009 foi de 3.679 casos por ano, com uma taxa de letalidade de 5,8% em 2009 (PELISSARI; CECHINEL; SOUSA-GOMES, 2011). Mais de 90% dos casos de LV globais ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010) e, cerca de 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV ocorre a cada ano (ALVAR, et al., 2012). A LV é uma doença crônica e sistêmica e que quando não tratada, pode evoluir para o óbito em mais de 90% dos casos. Os sinais clínicos mais comuns são apatia e emagrecimento (SILVA, et al., 2001).

A ocorrência da doença em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. A possibilidade de que o homem, principalmente crianças desnutridas, venha em alguns casos a ser fonte de infecção pode conduzir a um aumento na complexidade da transmissão da LV. (GONTIJO; MELO, 2004).

Figura 5 – Caso de Leishmaniose Visceral



Fonte: <http://portalamazonia.globo.com>

Criança com quadro avançado de Leishmaniose Visceral com aumento significativo do abdome (baço e fígado).

3.4 TRATAMENTO PARA AS LEISHMANIOSES

Na realidade nacional e estadual, as LT e LV representam sérios problemas de saúde pública, com o aumento do número de casos, sendo o tratamento a grande arma no combate à

infecção, devido à complexidade de sua epidemiologia. Por outro lado, as leishmanioses são doenças negligenciadas, e o investimento em seu tratamento é desprezível. Além do tratamento, torna-se necessário e de fundamental importância o estudo da população afetada em nosso país para o estabelecimento de medidas eficazes de controle da doença (DE LIMA et al., 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha para o tratamento de todas as formas clínicas de leishmanioses. A dosagem recomendada varia de 10-20 mg/kg/dia por um período mínimo de 20 dias (HERWALDT; BERMAN, 1992; KEDZIERSKI et al, 2009; KHATAMI et al, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em virtude da sua maior toxicidade, a anfotericina B e pentamidina são medicamentos de segunda escolha, recomendados em casos de contra-indicação, intolerância ou resistência aos antimoniais pentavalentes (BERMAN, 1988; DE LIMA et al., 2007).

Nos Estados Unidos da América, estibogluconato de sódio (SGS), disponível a partir dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Atlanta, Geórgia) ou Centro Médico do Exército Walter Reed (WRAMC; Washington, DC), é recomendado por via intravenosa numa dosagem de 20 mg/kg/dia durante 20 dias. Em estudos com a droga com voluntários militares dos EUA, foi registrado, artralgias e mialgias em 58% dos voluntários, pancreatite em 97%, níveis elevados de transaminases no fígado em 67% e erupção cutânea em 9%, sendo necessária a interrupção do tratamento (ARONSON; WORTMANN; JOHNSON, 1998).

O Ministério da Saúde do Brasil, em 1996 importou o SGS de fabricação chinesa, para o tratamento da LT, porém o SGS causou manifestações de: dor abdominal, elevação dos níveis séricos de amilase, cefaleia, mialgia/artralgia, anorexia e exantema maculopapular extenso grave, artralgia grave, extrassístoles bigeminadas, polimorfos e polifocais, levando a interrupção do tratamento (ARONSON; WORTMANN; JOHNSON, 1998).

O tratamento para as leishmanioses é um desafio porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, e nenhuma delas é bastante eficaz. Além disso, a recidiva, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal que estabeleça uma via alternativa para o tratamento das leishmanioses (DE LIMA et al., 2007).

3.5 PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil é um país com grande diversidade genética vegetal, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO; SILVA, 2006). As plantas são importantes fontes de descoberta de drogas, principalmente no que diz respeito a drogas antiparasitárias, devido à associação entre a coexistência dos parasitas, seres vivos e plantas medicinais (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005). Neste âmbito são crescentes os estudos dos extratos e compostos obtidos dos vegetais. As plantas tornaram-se importantes fontes 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 drogas semis-sintéticas (BERGMANN; COSTA; MORAES, 1997; RONDON et al., 2012).

Testes utilizando o extrato bruto de *Bixa orellana* (urucum) demonstrou atividade in vitro frente *L. amazonensis* e *L. chagasi* (BRAGA et al., 2007). Geranilgeraniol um composto extraído da *B. orellana* induziu alterações no potencial da membrana mitocondrial e a fragmentação do DNA de *L. amazonensis*, assim como alterações semelhantes em *Trypanosoma cruzi* (LOPES et al., 2012).

Alcalóides quinolínicos di-substituídos da *Galipea longiflora*, apresentaram efeito leishmanicida em infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. venezuelensis* (FOURNET et al., 1993).

Compostos com capacidade imunomoduladora tem sido alvo de estudos na busca de tratamento adequado para doenças como as leishmanioses. Extratos de plantas como *Kalanchoe pinata* e *Solanum lyratum thunb* induzem o aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (BERGMANN et al., 1997; KIM et al., 1999; KUMAR et al., 2012, 2011).

Testes revelaram que o flavonoide quercetina induziu a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos infectados por formas amastigotas de *L. amazonensis*, reduzindo assim o índice de infecção (FONSECA-SILVA et al., 2013).

Lectina extraída do látex de *Synadenium carinatum* foi capaz de induzir um efeito protetor em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com aquela molécula (AFONSO-CARDOSO et al., 2007).

Pesquisas realizadas com lectinas extraídas de *Ricinus Communis* revelou inibição da aglutinação de *Leishmania brasiliensis*, o inverso ocorreu com o parasita na presença da lectina obtida da *Canavalia ensiformis* (DAWIDOWICZ; HERNANDEZ; INFANTE, 1985).

3.6 LECTINAS

O termo “lectina” (do latim *lectus*, significa selecionado, escolhido) foi proposto para designar um grupo de proteínas que apresentava a característica comum de seletividade na interação com carboidratos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). O termo aglutinina é usado como sinônimo para lectina, em referência à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Segundo De-Simone; Netto; Silva, (2006) as lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados. Possuem dois ou mais sítios de ligação para carboidrato promovendo aglutinação de células animais e de plantas e, precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácido teicóico, glicofosfolípidios, dentre outros. Sua especificidade é definida pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo que inibe as reações de precipitação ou aglutinação induzidas por lectinas (KOMPELLA; LEE, 2001).

São encontradas na natureza e são purificadas a partir de diferentes organismos como animais, fungos, plantas, principalmente em sementes de leguminosas. Por outro lado, as lectinas podem ser produzidas por técnicas de recombinação de DNA (LAM; NG, 2011). São as únicas proteínas da planta capazes de reconhecerem e se ligarem a glicoconjugados de outros organismos, como os presentes na superfície de microrganismos (bactérias e fungos) ou expostos no trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros. Além disso, as lectinas acumulam-se nas partes da planta mais suscetíveis ao ataque de organismos e que também são imprescindíveis para a sobrevivência individual e da espécie, como as sementes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas se ligam de modo seletivo a carboidratos por diversas interações químicas fracas (SHARMA; SUROLIA, 1997), as quais aumentam tanto a afinidade como a especificidade através de subsítios e subunidades. Esta ligação ao carboidrato é fundamental para a atividade biológica (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). A hidrofobicidade é a principal força de interação entre lectinas e carboidratos, através de sítios de ligação a carboidratos e com proteínas, ou outras substâncias também através dos chamados sítios hidrofóbicos (BARONDES, 1988).

Devido essa capacidade de reconhecimento a carboidratos, as lectinas são usadas como ferramentas para a investigação funcional e estrutural de carboidratos complexos, especialmente para a análise de mudanças que ocorrem nas proteínas da superfície celular, monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas, ou por ensaios de precipitação de moléculas glicídicas (CARVALHO et al., 2011; SHARON; LIS, 1990).

Diferentes propriedades das lectinas possibilitam suas diversas aplicações em sistemas

biológicos, como a avaliação de superfícies celulares e tipagem sanguínea (LAM; NG, 2011; MO; WINTER; GOLDESTEN, 2000; YANG; BUCK; WIDMER 2010).

As lectinas podem ser encontradas em diferentes partes das células, e sua localização reflete a sua diversidade funcional. Lectinas endógenas atuam em vários processos biológicos, como, reconhecimento célula-célula, interação célula matriz extracelular, fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação, sinalização, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação patógeno hospedeiro, dobramento e endereçamento de glicoproteínas, indução mitogênica e homeostase (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

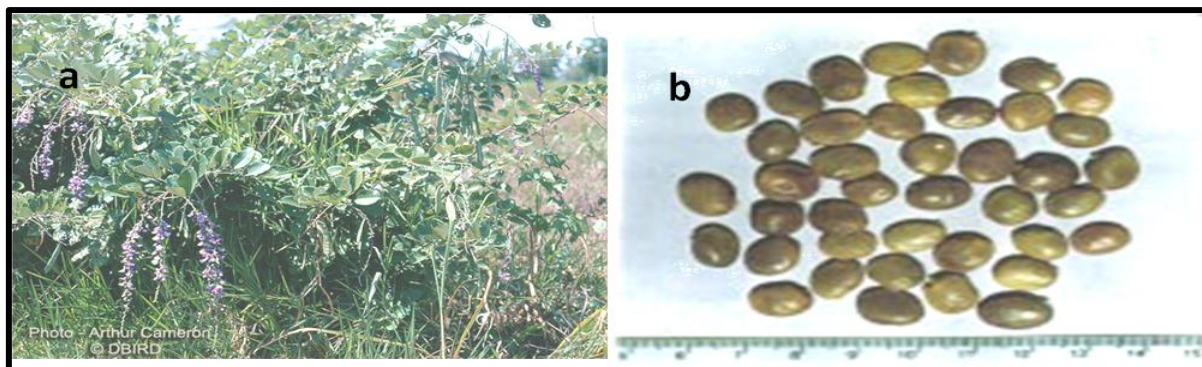
Importantes atividades das lectinas como, inseticida pode ser utilizada para o controle de agentes patogênicos aumentando a mortalidade ou retardando o desenvolvimento de insetos (LAM; NG, 2011). Quando incorporadas em dieta artificial, a lectina de *Arisaema jacquemontii* interferiu no desenvolvimento de larvas de *Bactrocera cucurbitae* (KAUR et al., 2006). Estudos relatam o potencial embriotóxico, artemicida, antimicrobiano e indutor de apoptose em células tumorais de algumas lectinas em diferentes tipos celulares. (DA SILVA; CORREIA, 2014; FERREIRA et al., 2013; FREITAS et al., 2012; HASEGAWA et al., 2000). Lectinas purificadas a partir de *Musa acuminata* inibiram a replicação do vírus da imunodeficiência Humana - HIV (SWANSON et al., 2010).

Dentre as lectinas de origem vegetal com potencial biológico destaca-se a Cramoll 1,4 extraída das sementes de *Cratylia mollis* (CORREIA; COELHO, 1995). Importantes atividades biológicas como antiparasita já foram demonstradas utilizando-se esta lectina. Cramoll 1,4 provocou a morte celular por necrose em formas epimastigotas de Tripanossomatídeos *Tripanossoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (FERNANDES et al., 2010).

3.7 CRAMOLL 1,4

Cratylia mollis é uma forrageira nativa do Semiárido do Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como feijão camaratu ou camaratuba (Figura 8a), pertencente à mesma família Leguminosae e subtribo Diocleinae da *Canavalia ensiformis* conhecida como feijão de porco, da qual é extraída a lectina Concanavalina A (Con A). Das sementes (Figura 8b) de *C. mollis* são purificadas as quatro isoformas da lectina Cramoll: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Cramoll 1,4 é uma preparação contendo as isoformas Cramoll 1 e Cramoll 4 (CORREIA; COELHO, 1995; PAIVA; COELHO, 1992).

Figura 7 – *Cratylia mollis* e sementes



Embora nenhum estudo sobre a biossíntese de Cramoll 1,4 tenha sido realizado, evidências sugerem que essa lectina é processada pós-traducionalmente de maneira similar às lectinas de leguminosas da subtribo Diocleinae. Uma vez que, análises ultraestruturais associadas a marcações imunocitoquímicas mostraram que ela é encontrada no interior de corpos proteicos no cotilédone de sementes de *C. mollis* (SANTOS; PEIXOTO; COELHO, 2004), mesmo local onde a Con A assume sua conformação madura em sementes de *Canavalia ensiformis*. Cramoll e Con A apresentam 82% de homologia em sequência de aminoácidos com grande similaridade em sua estrutura terciária e quaternária (SOUZA et al., 2003), o que justifica a mesma especificidade monossacarídica para glicose e manose exibida por ambas lectinas (CORREIA; COELHO, 1995; SOUZA et al., 2003).

Frente às aplicações da Cramoll 1,4, destacam-se: a) forte ligação para tecidos humanos com câncer, particularmente para aqueles de glândulas mamárias, útero e cérebro (BELTRÃO et al., 1998). b) 41% de inibição tumoral (sarcoma 180) quando aplicada na forma livre; encapsulada em lipossomas esta atividade aumentou para cerca de 80%, além de eliminar efeitos hepatotóxicos provocados pela lectina livre (ANDRADE et al., 2004); c) potencial biomarcador de câncer de próstata (DE LIMA et al., 2010), d) indutor in vitro de citocinas pertencente à via imune Th1 clássica em esplenócitos de ratos (MELO et al., 2010); e) indutor in vitro a produção das citocinas IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23, sobresaindo a produção induzida pela lectina ConA, a mais utilizada comercialmente (OLIVEIRA et al., 2013). f) geração de memória imunológica por reinduzir a estimulação de linfócitos (OLIVEIRA et al., 2013). g) atividade anti-helmíntica em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* (MELO et al., 2011).

Tendo em vista que pesquisas utilizando a lectina extraída das sementes de *C. mollis*, apresentam várias aplicações biológicas, sendo de fácil obtenção, justificando estudos mais aprofundados sobre esta molécula e sua possível aplicação no tratamento das leishmanioses.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. *Doenças negligenciadas: Ciência e Tecnologia para o desenvolvimento Nacional - estudos estratégicos*. São Paulo, 2010. 58p.
- AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *The Korean Journal of Parasitology*. v. 45, n. 4, p. 255-66, 2007.
- ALVAR, J.; et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. v. 7, p. 1-12, 2012.
- ALVAR, J.; et al. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. v. 57, p. 1–88, 2004.
- ALVES, W. A. et al. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil Leishmaniasis: current situation in Brazil. *Boletim Epidemiológico Paulista*. v. 6, p. 25-29, 2009.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 278, p. 435-445, 2004.
- ANTHONY, J.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents. *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 462-468, 2005.
- ARONSON, N. E. et al. Safety and efficacy of intravenous sodium stibogluconate in the treatment of leishmaniasis: recent US military experience. *Clinical Infectious Diseases*. v. 27, p. 1457-64, 1998.
- AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*. v. 20, p. 185-194, 2006.
- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*. v. 25, p. 203-211, 2007.
- BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences*. v. 13, p. 480-482, 1988.
- BERGMANN, B.R., COSTA, S.S. & MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. *Brazilian Journal Association for the Advancement of Science*. v. 49, p. 395-402, 1997.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Infectious Diseases*. v. 10, p. 560-586. 1988.
- BORGES, K.B.; BAUTISTA, H.B.; GUILERA, S. Diabetes - utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 5, n. 2, p. 12-20, 2008.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*. v. 119, p. 419. 1954.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal Ethnopharmacology*. v. 111(2), p. 396-402, 2007.

CARVALHO, E. V. M. M. M. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in Serum of the Amazonian Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Fisheries Science*. v. 1, p. 1-9, 2012.

CARVALHO, F. C. et al. The Recognition of N-Glycans by the Lectin ArtinM Mediates Cell Death of a Human Myeloid Leukemia Cell Line. *Plos One*. v. 6, p. 1-10, 2011.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nature Reviews Microbiology*. v. 5, p. 873- 882, 2007.

CORREIA, M. T.S., COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261-273, 1995.

COSTA, D. L. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v.5, n.3, p. 965, 2011.

COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose cutânea difusa (lcd) no brasil após 60 anos de sua primeira descrição. *Gazeta médica Bahia*. v.79, p. 16-24, 2009.

DA SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. S. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Frontiers in Microbiology* (Online). v. 5, p. 1-3, 2014.

SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. S. Plant Lectins and Toll-like receptor: implications in therapy for microbial infections. *Frontiers in Microbiology* (Online). v. 1, p. 1-1, 2013.

DAWIDOWICZ, K.; HERNANDEZ, A. G.; INFANTE, R. B.; The surface membrane of *Leishmania*. The effects of lectins on different stages of *Leishmania brasiliensis*. *Journal Parasitology*. v.61, p. 950-953, 1985.

DE LIMA, A. L. et al. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. v. 2010, p. 6, 2010.

DE LIMA, E. B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v. 82, n. 2, p. 111-24, 2007.

DE-SIMONE, S. G.; NETTO, C. C.; SILVA, J. R. Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins. *Journal of Chromatography*. v. 838, p. 135-138. 2006.

FANG, E. F. A lectin with anti- HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. extralong autumn purple bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 58, p. 2221-29, 2010.

FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of Trypanosoma cruzi death induced by Cratylia mollis seed lectin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. v. 42, n. 1, p. 69-78, 2010.

FERREIRA, R. D. et al. Crystal Structure of Crataeva tapia Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. *PLoS One*. v. 8, n.6, p. 1-14, 2013.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive Oxygen Species Production by Quercetin Causes the Death of Leishmania amazonensis Intracellular Amastigotes. *Journal of Natural Products*. v. 76, n. 8, p.1505-8. 2013.

FOURNET, A. et al. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American Leishmania sp. in BALB/c mice. *Phytoterapy Research*. v. 7, p. 281-284, 1993.

FREITAS, A. C. C. et al. Biological activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *Parvifolia* (mart.Ex tul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 7, 2012.

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAPÁ. *Plano Estadual de Controle das Leishmanioses*: Amapá. Manaus, 2010. 64p.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*. v. 113, p. 236-254, 2011.

GILL, L. H. S. et al. Recent observations on the sandfly (Díptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davis* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 98, p. 751-75, 2003.

GOLLOB, K. J. Immunoregulatory mechanisms and CD4–CD8– (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology. *International Immunopharmacology*. v. 8, p. 1338-1343, 2008.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, p. 338-949, 2004.

GONTIJO, C.M.F.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; J. A. L. LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. v. 8(4), p. 419-433, 2010.

HASEGAWA, N. et al. Isolated ricin B-chain mediated apoptosis in U937 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 64, p. 1422-1429, 2000.

HERNANDEZ, P. Protective effect of *Mangifera indica* L. polyphenols on human T lymphocytes against activation-induced cell death. *Pharmacological Research*. v.55, n.2, p.167-73, 2006.

HERWALDT, B. L.; BERMAN, J. D. Recommendation for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 46, p. 296-306. 1992.

KAUR, M. et al. A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and antiproliferative properties. *Journal of biochemistry and molecular biology*. v. 39, p. 432–440, 2006.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*. v. 9, p. 604-615, 2011.

KAWAGISHI, Y. et al. Purification and characterization of a lectin from the mushroom, *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*. v. 56, p.53-58, 2001.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Current Medicinal Chemistry*. v. 16, p. 599-614, 2009.

KHATAMI, A. et al. Treatment of acute old world cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v. 57, n. 335, p. 1-29, 2007.

KIM, H. M. et al. The nitric oxide-production properties of *Solanum lyratum*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 67, p. 163-169, 1999.

KOMPELLA, U. B.; LEE, V. H. L.; Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 46, p. 211–245, 2001.

KUMAR, U. A. et al. A Review on Immunomodulatory Activity Plants. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*. v. 4, n. 2, p. 93-103, 2012.

KUMAR, S. V. et al. Immunomodulatory effects of some traditional medicinal plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. v. 3, n.1, p.675-84, 2011.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 89, p. 45-55, 2011.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurs of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal*. v.1, p. 1252-1254, 1903.

LOPES, M. V. et al. Mitochondria Superoxide Anion Production Contributes to Geranylgeraniol-Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. v. 2012, p. 9, 2012.

- LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.104, p. 9375-9380, 2007.
- MACIEL, E. V. M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*. v. 32, p. 57-60, 2004.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A.; The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*. v.16, p. 188-189, 2000.
- MELO, C. M. L. et al. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. *Acta Tropical*. v. 118, p. 152-158, 2011.
- MELO, C. M. et al. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rat. *Molecular Cellular Biochemistry*. v. 342, p. 163-169, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - Brasil. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180p.
- MO, H.; WINTER, H. C.; GOLDESTINE, I. J. Purification and characterization of a Neu5Ac a 2–6 Gal b-1–4 Glc/GlcNac–specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 275, p. 10623–10629, 2000.
- NUNES, E. S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by Bothrops leucurus venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon*. v. 59, p. 667-71, 2012.
- OKIGBO, R. N.; MMEKA, E. C. Antimicrobial effects of three tropical plant extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albican*. *Journal of Traditional, Complementary and Alternative*. v.10, p. 226-29, 2008.
- OLIVEIRA, P. S. S. et al. *Cratylia mollis* 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. *BioMed Research International*. v. 2013, 2013.
- PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 36, p. 113-118, 1992.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 65, n. 5, p. 510–517, 2001.
- PELISSARI, D. M.; CECINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. v. 20, p. 107-110, 2011.

- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. v. 15, p. 199–228, 1998.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*. v. 109, n. 2, p. 347-52, 1995.
- PIMENTEL, I. A. S. et al. In Vitro and In Vivo Activity of an Organic Tellurium Compound on Leishmania (Leishmania) chagasi. *PLoS ONE*. v. 7, n. 11, 2012.
- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Experimental Parasitology*. v. 71, n. 3, p. 267-75, 1990.
- ROUNDON, F. C. M. et al. In vitro efficacy of Coriandrum sativum, Lippia sidoides and Copaifera reticulata against Leishmania chagasi Eficácia in vitro de Coriandrum sativum, Lippia sidoides e Copaifera reticulata sobre Leishmania chagasi. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012.
- SÁ, R. A et al. Larvicidal activity of lectins from Myracrodruon urundeuva on Aedes aegypti. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v. 149, p. 300-306, 2009.
- SADEGHI, A. et al. Ectopically expressed leaf and bulb lectins from garlic (Allium sativum L.) protect transgenic tobacco plants against cotton leafworm (Spodoptera littoralis). *Transgenic Research*. v. 17, p. 9-18, 2008.
- SANTORO, G. F. et al. Effect of oregano (Origanum vulgare L.) and thyme (Thymus vulgaris L.) essential oils on Trypanosoma cruzi (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*. v. 100, n. 4, p. 783-90, 2007.
- SANTOS, A. C.; PEIXOTO, C. A.; COELHO, L. C. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in Cratylia mollis seeds. *Micron*. v. 35, n. 7, p. 613-8, 2004.
- SELVAPANDIYAN, A. et al. Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. *Journal of Tropical Medicine*. v. 2012, p. 12, 2012.
- SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analysis of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *Journal of Molecular Biology*. v. 267, p. 433-445, 1997.
- SHARON, N.; LIS, H. A large family of homologous protein. *Federation of American Societies Experimental Journal*. v. 4, p. 3198-3208, 1990.
- SILVA, B. E. S. et al. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.
- SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Tropical – Ciências Agrárias e Biológicas*. v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SOUZA, S. R. et al. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresource Technology*.v.88, n.3, p.255-8, 2003.

SUN, J. et al. Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 23, p.292-299, 2007.

SWANSON, M. D. et al. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. *The Journal of Biological Chemistry*.v.285, p. 8646–8655, 2010.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology*. v. 14, p. 150-164, 2001.

VALIZADEH, M. et al. A study on *Leishmania* species causing cutaneous leishmaniasis in Mashhad using specific monoclonal antibody. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*. v. 7, n. 2, p. 107-113, 2005.

VELOZO, V. et al. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.81, n. 3, 2006.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*.v. 13, n. 2, p. 181-187, 2002.

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly host. *Journal of Eukaryotic Microbiology*.v. 40, p. 196-206, 1993.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. *Caderno de Saúde Pública*. v. 24, p. 2964-2967, 2008.

YAGHOUBI-ERSHADI, M. R. et al. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Saudi Medical Journal*.v. 23, n. 3, p. 291-294, 2002.

YANG, Y. L.; BUCK, G. A.; WIDMER, G. Cell sorting-assisted microarray profiling of host cell response to *Cryptosporidium parvum* infection. *Infection and Immunity*.v. 78, p. 1040-48, 2010.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

ATIVIDADE LEISHMANICIDA IN VITRO DA LECTINA DE *Cratylia mollis* – CRAMOLL 1,4

Artigo a ser submetido a Revista **Química Nova**

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA IN VITRO DA LECTINA DE *Cratylia mollis* –
CRAMOLL 1,4**

Carina H. Silva^{*,a}, Andrezza R. Borges^a, Jéssica Viana de Santana^b, Cynarha D. C. Silva^b, Rosimere Silva^a, Raiana A. Paula^a, Álvaro A. C. Teixeira^c, Regina B. C. Q. Figueiredo^b, Maria G. Caneiro-da-Cunha^a, Maria T. S. Corrreia^a

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Pernambuco – PE, Brasil

^bDepartamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, 50670-901 Pernambuco – PE, Brasil

^cDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Pernambuco – PE, Brasil

*e-mail: biocarina18@gmail.com

LEISHMANICIDAL ACTIVITY IN VITRO LECTIN *Cratylia mollis* – CRAMOLL 1,4

Leishmaniasis are infections caused by protozoa of the genus *Leishmania*. They are classified as cutaneous (LT) and visceral (VL) leishmaniasis. Pentavalent antimonials are the drugs of first choice for treatment. However, cytotoxic effects have made impossible their use and stimulated the search for an ideal drug. The present study objetived to analyze the biological activity of lectin *Cratylia mollis* - Cramoll 1.4 on promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*, causing species of the LT and LV respectively, and their possible effects on macrophages. 1.4 Cramoll inhibited the growth of *Leishmania* IC₅₀ of 6.9 mg / ml for *L. amazonensis* 7, 19 mg / ml for *L. chagasi*. Showed no toxicity in macrophages and induced NO synthesis in all concentrations. The lectin caused severe alterations in the morphology of the parasites that are signs of cellular infeasibility. Cramoll 1.4 showed up as potential new drug candidate for the proper treatment of leishmaniasis.

Key-words: *Leishmania chagasi*; *Leishmania amazonensis*; Cramoll 1,4.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes a família Tripanosomatidae. Transmitidas através da picada de insetos flebotomíneos. Ocorrem comum espectro de sintomas clínicos, que são normalmente divididos em leishmaniose tegumentar (LT) e visceral (VL).¹ São doenças endêmica e constituem sérios problemas de saúde pública, ameaçando cerca de 350 milhões de pessoas em mais de 90 países.²

Na leishmaniose tegumentar o paciente geralmente apresenta-se com uma ou várias úlceras ou nódulos na pele. Esta doença pode apresentar-se nas formas cutânea localizada (LC), cutânea disseminada (LD), cutânea difusa (LCD) e mucosa (LM), com ou sem lesões na pele. As principais espécies que causam a doença no Brasil são: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.³⁻⁵ A leishmaniose visceral é uma doença grave que acomete as vísceras, podendo ser fatal se não tratada ou tratada de forma inadequada, pois o hospedeiro falha em apresentar uma resposta protetora eficiente contra o parasita. Nas Américas, a *Leishmania chagasi* é a espécie comumente envolvida em sua transmissão.⁶ Após um período de incubação que dura geralmente entre 2 e 6 meses, os pacientes apresentam sinais e sintomas de infecção sistêmica persistente (incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso) e invasão do parasita no sistema retículo-endotelial (sistema fagocítico geral), tal como aumento dos gânglios linfáticos, baço e fígado.⁷

Antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira linha para o tratamento de todas as formas clínicas de leishmanioses. A dosagem recomendada varia de 10-20 mg/kg/dia por um período mínimo de 20 dias.^{8,9} No entanto em várias regiões endêmicas, como a Índia tem sido registrada a ineficácia, devido a resistência às drogas pentavalentes através do desenvolvimento de parasitas resistentes aos medicamentos.⁹ O tratamento para as leishmanioses é um desafio porque as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, e nenhuma delas é bastante eficaz. A recidiva, a falha terapêutica, sobretudo em pacientes imunodeprimidos e a resistência ao tratamento são fatores que motivam a busca de uma droga ideal.¹⁰

Estudos utilizando extratos e compostos purificados obtidos de plantas apresentaram atividades antiprotozoários significativas sem efeitos colaterais.¹¹ *Cratylia mollis*, uma planta nativa, perene da Região Semi-Árida do sertão do estado de Pernambuco pertencente à família Leguminosae, popularmente conhecida como feijão camaratuba ou camaratú possui

em suas sementes quatro isoformas da lectina Cramoll (Cramoll 1, Cramol 2, Cramoll 3 e Cramoll 4).^{12,13}

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas, encontradas em plantas animais e microrganismos que possui pelo menos uma exposição de domínio de ligação reversível, não catálitica aos monossacáridos ou oligossacáridos específicos. Podem ligar-se as porções de hidrato de carbono na superfície de eritrócitos e aglutinar as hemácias, sem alterar as propriedades destes carboidratos.¹⁴ A ligação de lectinas a oligossacáridos sobre a membrana da célula para algumas aplicações específicas parece mediar a morte celular.^{15,16} Estudos com Cramoll 1,4 (preparações contendo as isoformas 1 e 4) revelou como potente agente antiparasitário contra *Trypanosomacruzi*.¹⁷ Em virtude da necessidade de desenvolvimento de novos fármacos alternativos para o tratamento adequado das leishmanioses e as aplicações biotecnológicas de Cramoll 1,4, a presente pesquisa teve por objetivo analisar a atividade biológica desta lectina sobre *L. amazonensis* e *L. chagasi* e seus possíveis efeitos em células de mamíferos.

PARTE EXPERIMENTAL

1 Obtenção e purificação da lectina Camoll 1,4

As sementes de *C. mollis* foram coletadas na cidade de Ibimirim, no estado de Pernambuco - Brasil. O extrato das semente(10% p/v em NaCl 0,15 M) foi fracionado com sulfato de amônio (40-60%) e, em seguida, Cramoll 1,4 foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75. Cramoll1, 4 foi eluida com glicose 0,3 M em NaCl 0,15 M¹³.

2 Parasitas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram cedidas gentilmente pelo Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz e mantidas em meio Schneiders (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 28 °C em estufa. Para os experimentos foram utilizados parasitas na fase log de crescimento (3 dias).

3 Atividade leishmanicida de Cramoll 1,4

Culturas de promastigotas contendo 2×10^6 parasitas/mL foram incubadas a 28°C na ausência ou presença de diferentes concentrações (60 - 3,25 µg/mL) da lectina. O crescimento celular foi avaliado durante 3 dias por contagem direta em câmara de Neubauer. O parâmetro para estimar a inibição do crescimento foi a IC₅₀, o qual corresponde à concentração da droga capaz de inibir em 50 % a proliferação dos parasitas, após 48 h de tratamento. Para cada experimento, foram realizados três ensaios independentes em triplicata.²⁰ As análises de regressão linear para a determinação da IC₅₀ foram obtidas com auxílio do programa SPSS 18.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA) para Windows.

4 Citotoxicidade em células de mamíferos

A análise de citotoxicidade foi avaliada através da técnica de MTT (Brometo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio) [21]. Brevemente, macrófagos intraperitoneais obtidos de camundongo BALB/c, tratados com cramoll 1,4 foram lavados, e incubados em meio de cultura contendo 10% de MTT por 16 horas. Em seguida, os pellets foram solubilizados em DMSO e transferidos para microplacas. O precipitado derivado da redução do MTT foi determinado espectrofotometricamente a 570nm. Poços contendo apenas MTT e DMSO serviram como controle da reação. Foram realizados três ensaios independentes em quadruplicata. A seletividade de Cramoll 1,4 foi analisada para indicar o quanto a lectina é mais tóxica para os parasita e não para os macrófagos. O cálculo do índice de seletividade (IS) foi expresso pela razão entre a CC₅₀ (Concentração Citotóxica em 50% das células de mamíferos) e a IC₅₀.

5 Produção de Óxido nítrico

A concentração de nitrito (NO₂⁻) estável, como produto final da geração de óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. chagasi* e tratados com Cramoll 1,4 foi determinada com base na reação de Griess.²² A concentração variou de 0 à 250 µg/mL. A absorbância foi medida a 490 nm em leitor de ELISA Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). O Nitrito (µmol/10⁵ células) foi quantificado por extrapolação da curva padrão de nitrito de sódio em cada experimento. Foram realizados três ensaios independentes em quadruplicata.

6 Análise ultraestrutural

Nos tempos determinados, as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* após tratamento com a IC₅₀ e 2 x IC₅₀ de Cramoll 1,4 foram centrifugadas por 10 min a 500 x g e lavadas 2 vezes com PBS. A fixação foi realizada através de uma solução de 2,5% Glutaraldeído, 4% Paraformaldeído em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 durante 60 min a 4 °C. Após três lavagens com o mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas no escuro por 1 h em uma solução contendo 1% OsO₄, 0,8% ferricianeto de potássio, 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1M, e então desidratadas em baterias crescentes de acetona e incluídas em resina Polybed 812. Cortes ultrafinos obtidos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 Atividade leishmanicida sobre promastigotas

A incubação das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* na presença de Cramoll 1,4 inibiu de maneira significativa e dose-dependente da Cramoll 1,4 o seu crescimento com o valor da IC₅₀ = 6,9 e 7,19 µg/mL, respectivamente. A lectina Cramoll 1,4 foi capaz de inibir em 100% o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* a partir da concentração de 30 µg/mL e 60 µg/mL, respectivamente [Ver FIGURA 1 e 2]. A proliferação de promastigotas foi inibida significativamente em baixas concentrações da lectina, com baixo valor de IC₅₀, quando comparados com outros compostos de origem protéica e peptídica como Spinigerin, um peptídeo da imunidade inata de organismos pluricelulares com atividade antimicrobiana, que apresentou IC₅₀ de 150 µg/ml.²³

Pesquisas anteriores já demonstraram a atividade leishmanicida de compostos extraídos de vegetais, como o parcial efeito protetor da lectina extraída do látex de *Synadenium carinatum* (SCLL), em camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* e imunizados com SCLL, reduzindo também a carga parasitária.²⁴ Um estudo com promastigotas de *L. amazonensis* incubados na presença de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* e seu principal composto, α-bisabolol, inibiu o crescimento do parasita com os valores IC₅₀/24h de 7,35 e 4,95 µg/ml, respectivamente.²⁵ Epimastigotas de *T. cruzi* quando incubados na presença de Cramoll 1,4 sofreram inibição na proliferação e sobrevivência, com uma insuficiência dose-dependente de

viabilidade celular na concentração de 20 µg/mL de Cramoll 1,4, atingindo nesta concentração uma redução máxima de 60% mediante o tratamento, devido a indução de morte celular por necrose.¹⁷ Nossos resultados sugerem que Cramoll 1,4 é muito mais efetiva para *Leishmanias*, atingindo inibição de até 100% nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

2 Citotoxicidade em células de mamíferos

A lectina Cramoll 1,4 não apresentou citotoxicidade sobre as células de mamíferos - macrófagos (CC₅₀ > 100 µg/mL). A atividade citotóxica em macrófagos tratados com Cramoll 1,4 apresentou Concentração Citotóxica (CC₅₀) de 308,55 µg/mL, para ambas as leishmanias [TABELA 1]. Esta característica é de suma importância, pois os medicamentos que são utilizados para o tratamento das leishmanioses como antimoniais pentavalentes, paromomicin, anfotericina, miltefosina e pentamidina apresentam graves problemas aos pacientes, além da via de administração, o tratamento a longo prazo e a geração de resistência dos parasitas, que são os efeitos tóxicos secundários nos hospedeiros humanos.²⁶

A partir da análise da citotoxicidade da lectina sobre as células de mamíferos foi determinado o índice de seletividade (IS) para as formas promastigotas, o qual indica o quanto a lectina é tóxica para estas formas em relação às células de mamíferos. Cramoll 1,4 mostrou-se mais seletiva contra promastigota apresentando IS igual ou superior a 2,0. Cramoll 1,4 foi altamente seletiva para ambas as *Leishmanias*, com um IS para *L. amazonensis* de 40,5, e para *L. chagasi* de 38,8, valor este bastante satisfatório, uma vez que ela é mais de 40 vezes mais seletiva para o parasita *L. amazonensis* e 38 vezes para *L. chagasi* que para as células de mamíferos com CC₅₀ de 308,55 µg/mL. Quando comparada com outras moléculas de origem vegetal como o flavanóide quecertina que apresentou IS de 16,8, Cramoll 1,4 mostra-se muito mais seletiva.²⁷

3 Produção de Óxido Nítrico (NO)

Para avaliarmos o possível efeito imunomodulador da lectina Cramoll 1,4 sobre macrófagos, a produção de óxido nítrico por estas células foi avaliada através da quantificação das concentrações de nitrito, após 48 h, na presença ou ausência desta lectina. Cramoll 1,4 foi capaz de induzir alterações na produção de NO em todas as concentrações estudadas quando

comparado ao controle. A produção de NO foi bastante superior ao controle nas concentrações de Cramoll 1,4 de 15,6 e 31,3 µg/mL.

Os macrófagos são células do sistema fagocítico mononuclear que apresentam atividades citotóxicas, resultado de sua capacidade de secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio e superóxido) e pró-inflamatórias, com liberação de citocinas, como TNF, IL-1 e IL-6.²⁸

O óxido nítrico (NO), substância produzida por estas células, geralmente desempenha um papel crucial na contenção e eliminação de *Leishmanias*, pois é a principal molécula efetora que participa da morte intracelular do parasita.²⁹ Cramoll 1,4 foi capaz de induzir a síntese de NO por macrófagos intraperitoneais em todas as concentrações avaliadas. Comparada a substâncias provenientes de vegetais Cramoll 1,4 se destaca na produção de NO. Extrato metanólico de *Allium sativum* induziu a produção de NO por macrófagos, em que a maior produção de 60 µg/mL ocorreu na concentração de 250 µg/mL do extrato.³⁰

Lectinas podem atuar de diversas maneiras para combater ou prevenir infecções causadas por parasitas. Lectinas extraídas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Pisum arvense* (PAA) e *Artocarpus integrifolia* (KM+) foram capazes de induzir a produção de INF em camundongo e embora não tenham causado redução da lesão provocada pela infecção com *L. amazonensis*, a carga parasitária foi amplamente reduzida em camundongos imunizados com a lectina KM+.³¹

Radicais intermediários de oxigênio e nitrogênio foram eficientes no controle da infecção de macrófagos murinos por *Leishmania donovani*, mostrando potente efeito leishmanicida mesmo para uma espécie de *Leishmania* que pode determinar a doença visceral.³² Cramoll 1,4, apresenta-se portanto como eficiente ativador da produção de NO e consequentemente importante molécula leishmanicida para espécies causadoras das leishmanioses tegumentar e visceral.

4 Análise ultraestrutural dos parasitas

A microscopia eletrônica tem se mostrado uma ferramenta útil e confiável na investigação do efeito de novos fármacos para as leishmanioses, tanto para avaliar as alterações morfológicas quanto para identificar as organelas-alvo. As alterações mais notáveis nos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com Cramoll 1,4 durante 48 horas, com 6,9 µg/mL (IC₅₀) foram graves danos nas células com a perda da morfologia dos parasitas, presença de grandes vacúolos, desorganização do núcleo e cinetoplasto, com notável aumento de inclusões lipídicas e

desorganização do retículo endoplasmático como mostrado na figura 4. B e C. As células submetidas ao tratamento com o dobro da IC₅₀ de Cramoll 1,4 mostrado na figura 4. D e E apresentaram importantes alterações como intensa desorganização interna com espaços eletroluscentes e vacúolos, evidente desintegração da membrana plasmática, e presença de numerosas inclusões lipídicas **[FIGURA 4]**. Os promastigotas de *L. chagasi* submetidos ao tratamento com 1x IC₅₀ também apresentaram características semelhantes a *L. amazonensis* com o mesmo tratamento, no entanto com maior agravante, a desintegração da membrana nuclear. O tratamento com 2x a IC₅₀ ocasionou perda excessiva do material citoplasmático com grandes vacúolos e espaços eletroluscentes **[FIGURA 5]**. As alterações ocasionadas nos parasitas das duas espécies estudadas submetidas aos tratamentos com Cramoll 1,4 tanto da 1x IC₅₀, como 2x IC₅₀ indicam a perda da viabilidade celular.

Modificações na estrutura do cinetoplasto, intensa vacuolização no citoplasma e o aparecimento de protusões de membranas semelhantes a bolhas também foram comumente observadas em tripanossomatídeos tratados com óleos essenciais e drogas de origem sintética e natural. Essas alterações são compatíveis com a perda da viabilidade e morte celular dos parasitas.³³

A interação de formas promastigotas de *Leishmanias* e lectinas através do reconhecimento de glicoconjugados da superfície do parasita pela lectina (*L. amazonensis* e *Leishmanias* do complexo *Donovani*) é conhecida desde pesquisas anteriores.³⁴ No entanto são escassos os estudos dos mecanismos de morte celular induzida por estas moléculas. Os glicoconjugados presentes na membrana dos parasitas podem interferir no momento da fagocitose dos promastigotas pelos macrófagos, gerando um mecanismo de resistência da *Leishmania* contra o sistema imune do hospedeiro. Um desses glicoconjugados é o lipofosfoglicano (LPG), um glicolípido abundante na superfície de promastigotas de *Leishmanias*. *Leishmania donovani* inibiu a biosíntese de fagolisossomos pelos macrófagos de forma lipofosfoglicano-dependente.³⁵ *Leishmanias* do complexo mexicana, como a *L. amazonensis* apresentam unidades repetidas de ligações de glicose em posição $\beta(1,3)$ nas cadeias laterais de LPG (Lipofosfoglicanos) e de outros fosfoglicanos.³⁶ Cramoll 1,4 é uma lectina de especificidade para glicose/manose, podendo desta forma justificar a ligação e reconhecimento de Cramoll 1,4 a superfície destes parasitas. Cramoll 1,4 por ligar-se a glicose, poderia ligar-se aos lipofosfoglicanos presentes na membrana dos parasitas impedindo assim o bloqueio da formação dos fagolisossomos, bem como este fato poderia justificar a intensa desintegração da membrana plasmática em *L. amazonensis*, tendo em vista a maior quantidade de açúcares presentes em sua membrana nas moléculas de LPG. A ação anti-parasitária de Cramoll 1,4,

especificamente em Tripanossomatídeos já foi demonstrada em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, em que provocou aglutinação celular devido ao reconhecimento de glicoconjugados presentes na membrana plasmática. A toxicidade apresentada frente a estes parasitas, provavelmente resulta de uma ação concentrada nas membranas plasmática e mitocondrial do parasita, devido a uma sobrecarga de íons Ca^{2+} e produção de espécies reativas de oxigênio.¹⁷ As alterações provocadas nas *Leishmanias* devido o tratamento pela Cramoll 1,4 como modificações no cinetoplasto e na morfologia da célula, correspondem a indícios de morte celular por apoptose, corroborando com os estudos realizados por Sandar et al, 2013.²³

CONCLUSÃO

Os resultados da presente pesquisa mostraram que Cramoll 1,4 foi bastante efetiva contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. A ausência de toxicidade da lectina sobre as células de mamíferos, o perfil imunomodulatório de Cramoll 1,4 sobre a indução na produção de NO, molécula importantíssima no combate as infecções por *Leishmanias*, apontam o seu uso para a realização de ensaios in vivo. Soma-se a estes resultados a seletividade sobre as formas promastigotas dos parasitas. Cramoll 1,4 causou severas alterações morfológicas nos parasitas, compatíveis com a perda de viabilidade e consequente morte celular. Nossos resultados sugerem Cramoll 1,4 como agente promissor no desenvolvimento de novo fármaco para o tratamento adequado das Leishmanioses Visceral e Tegumentar.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FACEPE, (Fundação de Amparo a Pesquisa em Pernambuco), pelo financiamento do projeto. A Universidade Federal de Pernambuco e o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, pela estrutura dos laboratórios.

REFERÊNCIAS

- [1] Bailey, M. S.; Lockwood, D. N. J.; *Clin Dermatol***2007**, 25, 203.
- [2] Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J. J. J.; Den, B. M. *PLoS1***2012**, 7,12.
- [3] Velozo, V.; Cabral, A.; Ribeiro, M. C. M.; Motta, J. O. C.; Costa, I. M. C.; Sampaio RNR. *An. Bras. Dermatol***2006**, 81, 25.
- [4] Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G.; *The Lancet***2005**, 366, 1561.
- [5] Furtado, T.; Vieira, J. B. F.; *An Bras Dermatol***1982**, 57, 135.
- [6] Silva, F. S.; R.; *Trop. Ci. Agr. Biol***2007**, 1, 20.
- [7] Chappuis, F.; Shyam, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M.; *Nature Rev Microbiol***2007**, 5, 873.
- [8] KedziersKI, L.; Sakthianandeswaren, A.; Curtis, J. M.; Andrews, P. C.; Junk, P. C.; Kedzierska, K.; *Curr Med Chem***2009**, 16, 599.
- [9] Chakravarty, J.; Sundar, S.; *J Glob Infect Dis* 2010, 2, 167.
- [10] De Lima, E. B.; Porto, P.; Motta, J. O. C.; Sampaio, R. N. R.; *An Bras Dermatol***2007**, 82, 111.
- [11] Guida, M. C.; Esteva, M. I.; Camino, A.; Flawia, M. M.; Torres, H. N.; Paveto, C.; *Exp Parasitol***2007**, 117, 188.
- [12] Santos, A. C. O.; Peixoto, C. A.; Coelho, L. C. B. B.; Ultrastructural analysis and seeds *Micron***2004**, 35, 613.
- [13] Correia, M. T.; Coelho, L. C.; *Appl Biochem Biotechnol***1995**, 55, 261.
- [14] Lam, S. K.; Ng, T. B.; *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**, 89, 45.
- [15] Coelho, M. B.; Marangoni, S.; Macedo, M. L.; *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol***2007**, 146, 406.
- [16] Macedo, M. L.; Graças, M. F. M.; Silva, M. B.; Coelho, L. C.; *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol***2007**, 146, 486.
- [17] Fernandes, M. P.; Inada, N. M.; Chiaratti, M. R.; Araújo, F. F. B.; Meirelles, F. V.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Alves, M. J. M.; Gadelha, F. R.; Vercesi, A. E.; *J Bioenerg Biomembr* **2010**, 42, 69.
- [18] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.***1951**, **193**, 265.

- [19] Laemmli, U. K.; *Nat***1970**, 227, 680.
- [20] Vendrametto, M. C.; Santos, A. O.; Nakamura, C. V.; *Parasitol Int***2010**, 59, 154.
- [21] Mosmann, T.; *J Immunol Methods***1983**, 16, 55.
- [22] Ding, A. H.; Nathan, C. F.; Stuehr, D. J.; *J Immunol***1988**, 141, 2407.
- [23] Sardar, A. H., Agnihorti, S.; Kumar, M.; Ghosh, A. K.; Abhishek, K.; Kumar, A.; Purkait, B.; Ansari, M. Y.; Das, P.; *Exp Parasitol***2013**, 135, 715.
- [24] Afonso-Cardoso, S. R.; Rodrigues, F. H.; Gomes, M. A. B.; Silva, A. G.; Rocha, A.; Guimarães, A. H. B.; Candeloro, I.; Favoreto Jr, S.; Ferreira, M. S.; Souza, M. A. *Korean J Parasitol***2007**, 45, 255.
- [25] Colares, A. V.; Almeida-Souza, F.; Taniwaki, N. N.; Souza, C. S. F.; Costa, J. G. M.; Calabrese, K. S.; Abreu-Silva, A. L.; *Hindawi Publ. Corp.* **2013**, 2013, 1.
- [26] Castillo, E.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F.; Rangel, M.; González-Rosende, M. E.; *Curr Med Chem***2010**, 17, 4027.
- [27] Fonseca-Silva, F.; Inacio, J. D. F.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Almeida-Amaral, E. E.; *J. Nat. Prod***2013**, 76, 1505.
- [28] Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M.; *Trendsimmunol***2004**, 25, 677.
- [29] Loría-Cervera, E. N.; Sosa-Bibiano, E. I.; Villanueva-Lizama, L. E.; Wynsberghe, N. R. V.; Canto-Lara, S. B.; Batn-Cutz, J. L.; Andrade-Narvez.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz***2013**, 108, 172.
- [30] Wabwobaa, B. W.; Anjilib, C. O.; Ngeiywac, M. M.; Ngured, P. K.; Kigondue, E. M.; Ingongab, J.; Makwalic, J.; *J Vector Borne Dis***2010**, 47, 160.
- [31] Teixeira, C. R.; Cavassani, K. A.; Gomes, R. B.; Teixeira, M. J.; Roque-Barreira, M. C.; Cavada, B. S.; Silva, J. S.; Barral, A.; Barral-Netto, M.; *Vaccine***2006**, 24, 3001.
- [32] Murray, H. W.; Nathan, C. F.; *J. exp. Med***1999**, 189, 741.
- [33] Fidalgo, L. M.; Gille, L.; *Pharm Res***2011**, 28, 2758.
- [34] Andrade, A. F.; Saraiva, E. M.; *Parasitol Res***1999**, 85, 576.
- [35] Rasmusson, B.; Descoteaux, A.; *Microsc Microanal***2004**, 10, 656.
- [36] Ilg, T.; Estges, R.; Overath, P.; McConville, M. J.; Thomas-Oastes, J.; Homans, S. W.; Ferguson, M. A.; *J. Biol. Chem***1992**, 267, 6834.

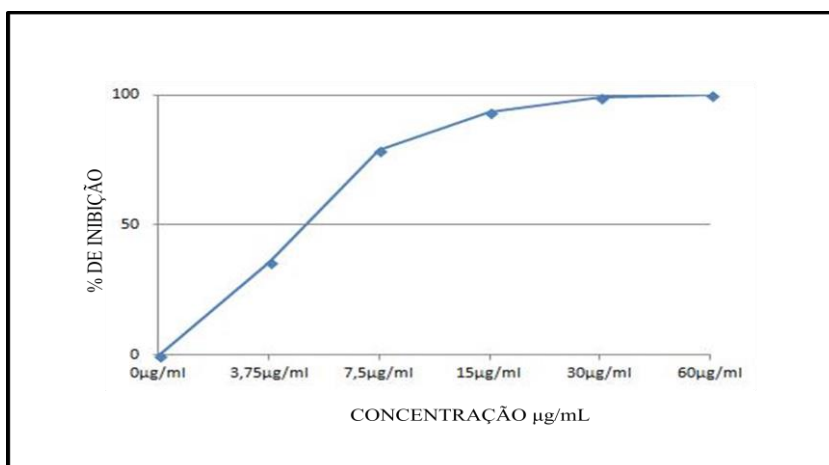


Figura 1. Efeito de Cramoll 1,4 sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*

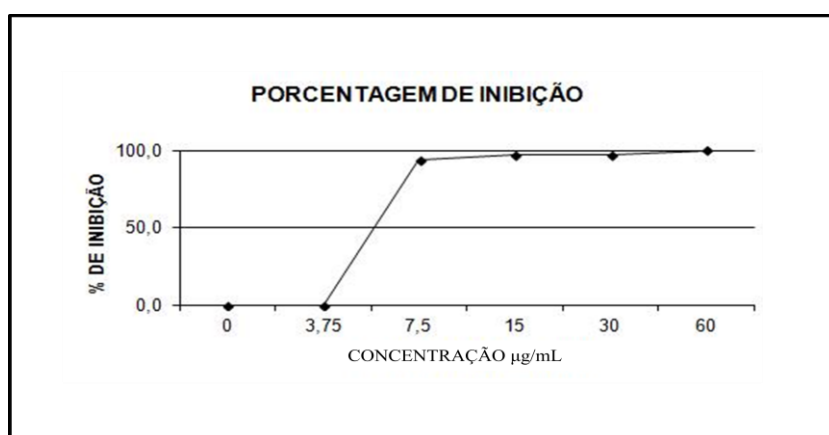


Figura 2. Efeito de Cramoll 1,4 sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi*

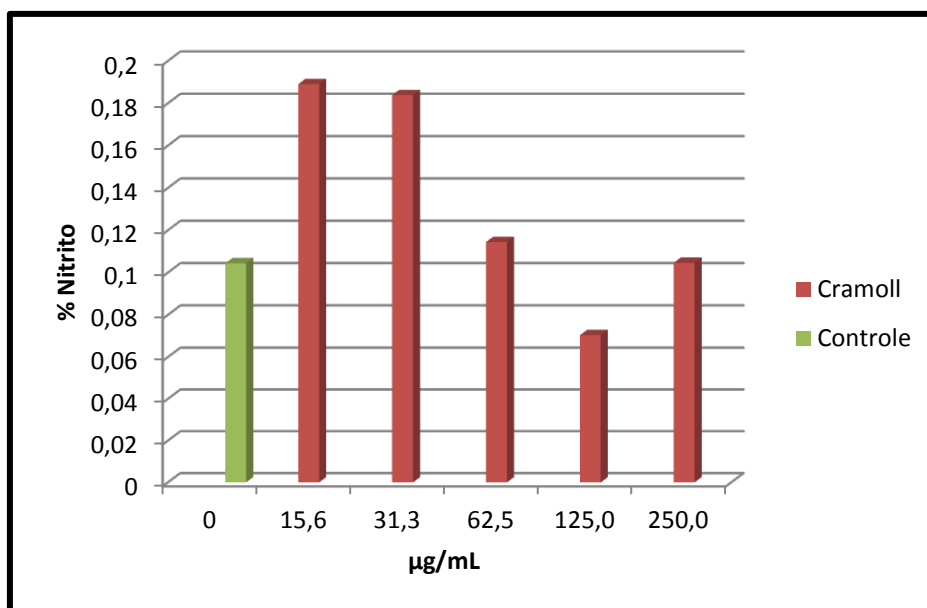


Figura 3. *Produção de óxido nítrico por macrófagos após 48 h de tratamento com a lectina Cramoll 1,4*

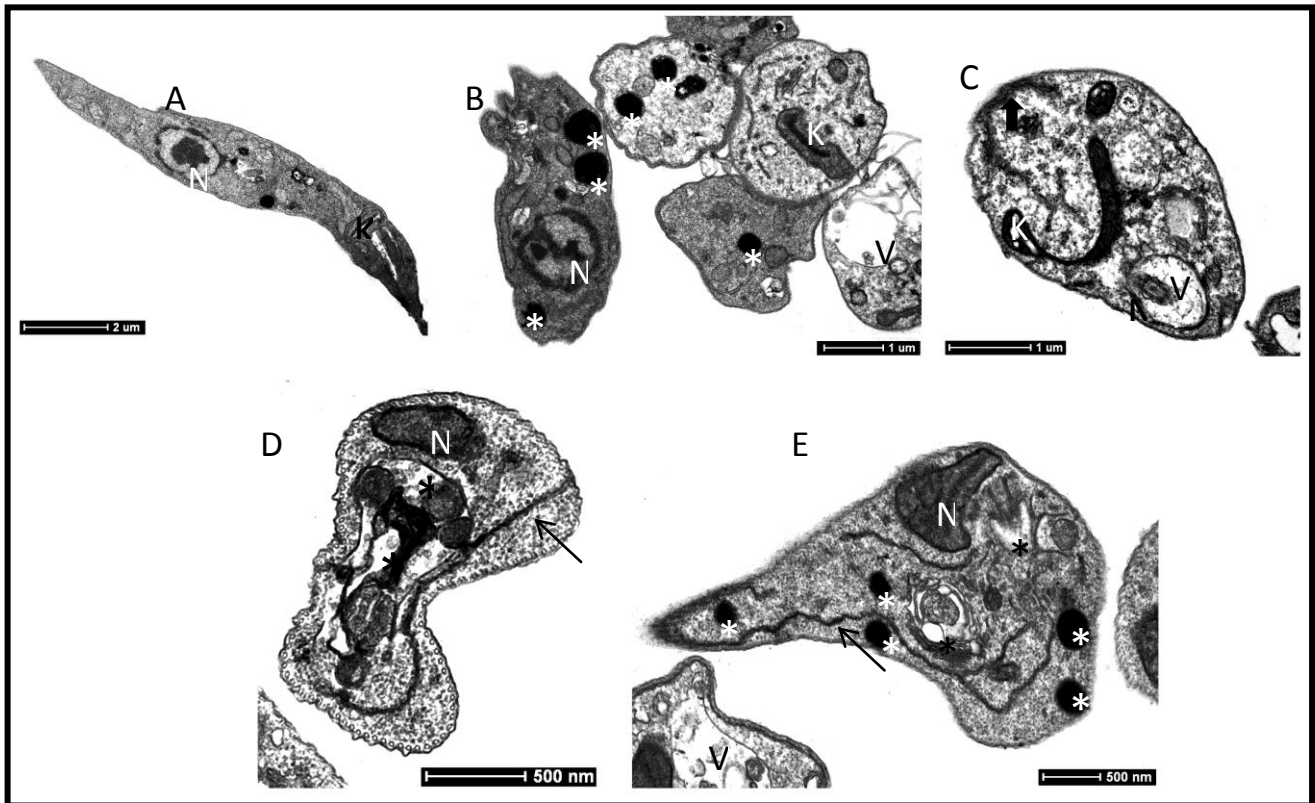


Figura 4. Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (A) - Célula controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (K) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo a bolsa flagelar. Núcleo central (N) com nucléolo evidente e nucleoplasma homogêneo e eletrondenso. (B-C) Células tratadas com a IC_{50} de Cramoll 1,4, apresentando grandes vacúolos (V) e desorganização do núcleo e cinetoplasto, notável aumento de inclusões lipídicas (*) em (C) desorganização do retículo endoplasmático (seta). (D-E) Células drasticamente alteradas submetidas ao tratamento com $2 \times IC_{50}$ de Cramoll 1,4 com uma intensa desorganização interna, e surgimento de espaços eletrondensos (*) e vacúolos (V), desintegração da membrana plasmática (seta), em (E) presença de numerosas inclusões lipídicas (*brancos)

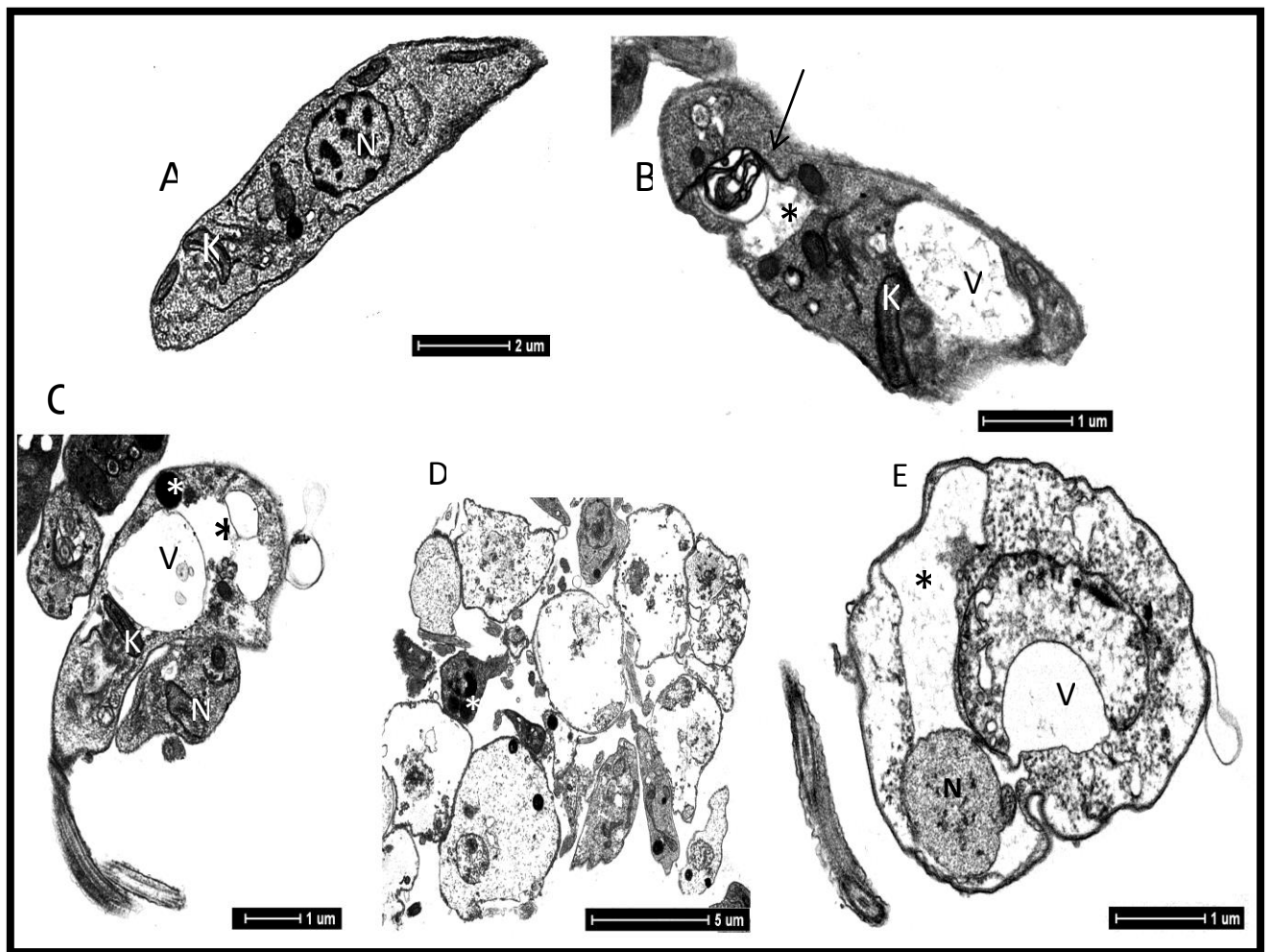


Figura 5. Formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (A) - Célula controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (K) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo a bolsa flagelar. Núcleo central (N) com nucléolo evidente eletrondenso. (B-C) Células tratadas com a IC_{50} de Cramoll 1,4, apresentando grandes vacúolos (V) e grandes espaços no citoplasma (*), desorganização do núcleo e com desintegração da membrana nuclear (seta), surgimento de inclusões lipídicas (*brancos) em (C). Em (B) aumento notável do volume do cinetoplasto (K). (D-E) Células submetidas ao tratamento com $2 \times IC_{50}$ de Cramoll 1,4, drasticamente alteradas, com perda excessiva de material citoplasmático com grandes espaços eletróluscentes (*) e vacúolos (V), em (D) presença de numerosas inclusões lipídicas (*brancos)

Tabela 1.Efeito citotóxico da lectina Cramoll 1,4

Leishmania	Macrófagos CC ₅₀ (g/mL)	IS
<i>L. amazonensis</i>	308,55±41,4	40,5
<i>L. chagasi</i>	308,55 ±41,4	38,8

Valores da CC₅₀ e o índice de seletividade entre macrófagos e *Leishmanias* (IS)

6 CONCLUSÕES

- a) A lectina Cramoll 1,4 em baixas concentrações apresenta inibição de até 100% na proliferação dos promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, importante característica de um possível candidato a novo fármaco.
- b) A ausência de toxicidade da lectina Cramoll 1,4 sobre as células de mamíferos aponta seu uso para a realização de ensaios *in vivo*. Soma-se a isto, a seletividade desta lectina para o parasita;
- c) A indução da síntese de Óxido Nítrico em macrófagos aponta para a atividade imunomoduladora de Cramoll 1,4 no combate as infecções causadas por *Leishmanias*.
- d) Análises ultraestruturais demonstraram que Cramoll1,4 causou alterações morfológicas severas nos parasitas, compatíveis com a perda de viabilidade e morte celular, provavelmente por apoptose.
- e) Nossos resultados sugerem a lectina Cramoll 1,4 como agente promissor para o tratamento das leishmanioses Tegumentar e Visceral, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de drogas que sejam mais eficazes e menos tóxicas.

ANEXOS

REVISTA QUÍMICA NOVA

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico ([clique aqui para acessar as normas de restrição](#)). Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e outros elementos.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida e lista de publicações, acompanhados de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente ao das outras modalidades.

ANTES DA SUBMISSÃO

Direitos autorais

Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que não será

publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os autores também concordam que os direitos autorais do manuscrito serão transferidos para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção Introdução deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele.

A seção Parte Experimental pode preceder ou vir após a seção Resultados e Discussão, mas devem ser necessariamente separadas. A seção Conclusões, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção Resultados e Discussão.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser incluídas no Material Suplementar (ver seção Material Suplementar).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas por e-mail à Editoria da Química Nova. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os manuscritos em língua inglesa que forem considerados para avaliação deverão, no envio da versão revisada, portar certificado de correção de idioma emitido por empresa especializada. O certificado deve ser enviado por e-mail para sbqedit@sbq.org.br.

Os Editores poderão solicitar o certificado a qualquer momento do processo de avaliação caso julguem necessário. Dessa forma, os autores interessados em submeter manuscritos em língua inglesa devem estar cientes dessa possibilidade.

Preparo dos manuscritos

Geral

Um modelo de artigo (.doc) já formatado de acordo com as normas da Química Nova pode ser obtido aqui.

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5x. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

Os elementos gráficos, tabelas e suas respectivas legendas devem vir ao final do artigo. Deve-se indicar, no texto, onde o elemento deve aparecer após a diagramação, utilizando as *tags* entre colchetes. Esses elementos devem aparecer o mais próximo possível de onde foram citados pela primeira vez.

Alguns exemplos:

(...) A Figura 1 mostra o sistema utilizado na primeira etapa do processo.

[FIGURA 1]

Os valores obtidos a partir do experimento encontram-se na Tabela 1.

[TABELA 1]

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção Material Suplementar).

Detalhes

A primeira página deverá conter o graphical abstract (ver seção Graphical Abstract), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{*,a}

^a Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^b Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve ser o departamento. Em seguida a faculdade/instituto e, por fim, a universidade. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser incluídos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 150 (cento e cinquenta) palavras, e a indicação de 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito.

Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico. Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;

A bactéria *Escherichia coli* ...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

- Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

- As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-).

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry*, *Abstracts Service*, *Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: as fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O graphical abstract deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [**os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões**]. Junto com o graphical abstract, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.

A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas)

As referências devem ser citadas na forma de números sobrescritos após a pontuação, quando houver. Parênteses e colchetes não devem ser utilizados. Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

Alguns exemplos:

salicilato de sódio,¹⁻³

Nishideet *al.*,⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>).

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.;Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar *doi* da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. KokaiTokkyoKoho* 79 73,771 **1979**.(CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)
7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito, ao final do arquivo .pdf.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas. Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão online, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material suplementar. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS. Assim como as Figuras e Tabelas, devem ser numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

DURANTE A SUBMISSÃO

A QN oferece aos autores a submissão online, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente a partir do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Para as versões de avaliação

Deve ser gerado um arquivo único, em formato PDF, preparado de acordo com as normas descritas anteriormente. O sistema online de submissão da Química Nova não aceitará outro formato de arquivo para as versões de avaliação.

Manuscritos Revisados: Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento .pdf completo da versão revisada. Deve ser redigida uma carta de encaminhamento, em pdf, aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados por meio da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão online da revista.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Para a versão final

Quando for solicitado o envio da versão final, os autores deverão enviar a versão redigida em arquivo .doc/.docx, de acordo com as normas descritas anteriormente. Os elementos gráficos e as tabelas devem ser enviados separadamente, em seus formatos originais:

Estruturas químicas: *.cdx (ChemDraw, ISIS-Draw e correlatos)

Gráficos: *.opj/org (Origin) ou *xls/xlsx (Excel)

Tabelas: *.doc (Word) ou *xls/xlsx (Excel)

Outros elementos (Figuras, esquemas, etc.): *.cdr (CorelDraw)

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho poderá ser atestada por consultor(es) *ad hoc*, indicados pela Editoria.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright ©2012 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.