

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

PHILLIPE LYNNEKER DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE RIPARINAS I, II E
III SOBRE AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis*

RECIFE

2018

PHILLIPE LYNNEKER DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE RIPARINAS I, II E
III SOBRE AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do grau mestre em Morfotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Cavalcanti da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Lucio Soares da Silva

RECIFE

2018

Catalogação na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Silva, Phillippe Linneker da

Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de riparinas I, II e III sobre as formas promastigotas de *Leishmnia (L.) amazonensis* / Phillippe Linneker da Silva. – 2018.

46 f. : il.

Orientadora: Eliete Cavalcanti da Silva.

Coorientador: Luiz Lucio Soares da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Leishmaniose. I. Silva, Eliete Cavalcanti da (orient.). II. Silva, Luiz Lúcio Soares da (coorient.). III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 237

PHILLIPE LYNNEKER DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE RIPARINAS I, II E III SOBRE AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (L) AMAZONENSIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do grau mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em: 23/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Eliete Cavalcanti da Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a. Ivone Antônia de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a. Paloma Lys de Medeiros (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Camilla Vila Nova Soares Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Janaina Paula da Silva por toda dedicação, amor e carinho ao longo de toda minha vida. Sem ela, jamais teria conquistado o que conquistei.

A minha avó Eurides, ao meu avô Deodato, a minha tia Virginia e a André por todo carinho dado a mim e por estarem ao lado da minha mãe na construção da minha educação.

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes dando incentivo e carinho.

A minha namorada Isabelle Barbosa que em muitos momentos foi minha paz e calmaria durante a fase final deste projeto.

Aos meus amigos que foram um porto de tranquilidade nas horas tempestuosas.

À Prof.^a Dra. Eliete Cavalcanti pela oportunidade, orientação, apoio e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao meu Coorientador Prof.^o Dr. Luiz Lucio Soares pela colaboração e ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos pelo companheirismo e ajuda durante a jornada laboratorial, em especial à Erwelly Barros e Eliane Carvalho pelo apoio prestado.

Às professoras Dra. Paloma Lys de Medeiros e Dra. Marta Gerusa por toda ajuda e conselhos.

Ao professor Dr. Fabio Bryner do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Aggeu Magalhães pela realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Ao professor Dr. Walter Barbosa do Departamento de Histologia e Embriologia – UFPE.

Ao programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia por aceitar e dar suporte ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e colegas do curso de Pós-Graduação de Morfotecnologia e à Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade da relação deste mestrado.

Aos que acreditaram em mim, muito obrigado!

RESUMO

Leishmaniose tegumentar americana é uma doença negligenciada que atinge mais de 1 milhão de pessoas no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde. No Brasil, a espécie do parasita de maior notoriedade, devido a distribuição e severidade clínica, é a *Leishmania (L.) amazonensis*. Embora tenha sido descoberta em meados da década de 70, a tratamento da doença ainda continua ineficaz, causando diversos efeitos colaterais nos pacientes em tratamento e, consequentemente, abandono da terapia, contribuindo para o surgimento de parasitas resistentes. Portanto, é importante a busca de métodos terapêuticos menos tóxicos e mais eficientes, como por exemplo os fitoterápicos. *Aniba riparia*, possui um metabólito secundário que foi isolado e identificado como riparina, um alcalóide alcámida. Os alcalóides pertencem a um grupo de metabólitos secundários com atividade leishmanicida comprovada. Portanto, neste trabalho foram avaliadas as riparinas I, II e III, quanto a capacidade de inibir *in vitro* o crescimento da *Leishmania amazonensis*. A determinação da viabilidade parasitária após tratamento com as riparinas foi determinada pelo emprego do MTT. As riparinas I, II e III testadas contra o parasita apresentaram uma IC₅₀ de 6,65 µg/mL, 3,60 µg/mL e 6,57µg/mL, respectivamente. A riparina II destacou-se entre as três riparinas testadas, apresentou melhor atividade leishmanicida, portanto, foi escolhida para os demais testes. No ensaio de MTT com célula Vero, a riparina II apresentou uma IC₅₀ de 14,54 µg/ml contra as células Vero, significando baixa citotoxicidade para a célula testada. As análises das imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das *L. amazonensis* cultivadas com riparina II na concentração 3,60 µg/mL apresentaram alterações na morfologia dos parasitas, o mesmo resultado foi obtido na microscópia óptica. Foram observados encurtamento do flagelo, arredondamento do corpo do parasita e bolhas na superfície da membrana plasmática. Essas alterações também foram observados com os parasitas cultivados na concentrações de 200µg/mL em microscópia óptica. A avaliação do perfil proteico dos parasitas cultivadas com riparina II, na concentração de 200µg/mL, demonstrou a presença de duas bandas, localizadas imediatamente abaixo dos pesos moleculares de 96KDa e 66KDa, porém, não sendo encontrada na concentração de 3,60 µg/mL . Conclui-se que a riparina II é um alcalóide com potencial ação farmacológica para estudos "in vivo" como um fármaco promissor contra a leishmaniose tegumentar.

Palavras-chave: Leishmanioses. Fitoterápicos. *Aniba riparia*.

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis is a neglected disease that affects more than 1 million people worldwide, according to the World Health Organization. In Brazil, the species of the most notorious parasite, due to its distribution and clinical severity, is *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Although it was discovered in the mid-1970s, the treatment of the disease still remains ineffective, causing several side effects in patients undergoing treatment and, consequently, abandoning therapy, contributing to the emergence of resistant parasites. Therefore, the search for less toxic and more efficient therapeutic methods, such as herbal medicines, is important. *Aniba riparia*, has a secondary metabolite that has been isolated and identified as riparine, an alkaloid alkaloid. Alkaloids belong to a group of secondary metabolites with proven leishmanicidal activity. Therefore, in this work, riparines I, II and III were evaluated for their ability to inhibit the growth of *Leishmania amazonensis* in vitro. The determination of parasite viability after treatment with riparines was determined by the use of MTT. The riparines I, II and III tested against the parasite had an IC₅₀ of 6.65 µg / mL, 3.60 µg / mL and 6.57 µg / mL, respectively. The riparina II was among the three riparines tested, presented better leishmanicidal activity, therefore, it was chosen for the other tests. In the Vero cell MTT assay, riparine II had an IC₅₀ of 14.54 µg / ml against Vero cells, meaning low cytotoxicity for the cell tested. The analysis of the images obtained by scanning electron microscopy (SEM) of *L. amazonensis* cultured with 3,60 µg / mL of riparina II presented alterations in the morphology of the parasites, the same result was obtained by light microscopy. Flagellum shortening, rounding of the parasite body and bubbles on the surface of the plasma membrane were observed. These changes were also observed with the parasites cultured at concentrations of 200 µg / mL in optical microscopy. The evaluation of the proteic profile of the parasites cultured with riparin II, at 200µg / mL, demonstrated the presence of two bands, located immediately below the molecular weights of 96KDa and 66KDa, but not found in the concentration of 3.60 µg / ml. It is concluded that riparine II is an alkaloid with potential pharmacological action for in vivo studies as a promising drug against tegumentary leishmaniasis.

Key words: Leishmaniasis. Phytotherapy. *Aniba riparia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Flebótomo do gênero <i>Lutzomyia</i> . Fonte: vectorbase.org, 2018.	15
Figura 2- Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp. Fonte: Brasil, 2017.	16
Figura 3- Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. Fonte: Brasil, 2017.	17
Figura 4- Ciclo biológico da leishmaniose. Fonte: Adaptado de http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html	18
Figura 5- Status da endemicidade de leishmanioses cutânea no mundo. Fonte: WHO, 2015. 20	
Figura 6- Casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil - 1980 a 2014. Fonte: Brasil, 2017.	20
Figura 7- A) Lesão ulcerada única, arredondada com bordas elevadas. B) Lesão cutânea múltipla e localizada. Fonte: Brasil, 2017.	21
Figura 8- LTA cutânea difusa, lesões ulceradas pequenas distribuídas na face posterior do tronco. Fonte: Brasil, 2017.	22
Figura 9- Lesão em mucosa nasal com ulceração das asas do nariz devido a leishmaniose mucosa. Fonte: Brasil, 2007.	22
Figura 10- Estrutura química do antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®). B) Estrutura química do Stibogluconato de sódio (Pentostan®). Fonte: Barbosa, 2010.	23
Figura 11- Folhas da árvore <i>Aniba riparia</i> (Neez) Mez. Fonte: floradobrasil.jbrj.gov.br	27
Figura 12- Estrutura química da riparina II.	28
Figura 13- Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica (1000x) mostrando formas promastigotas de <i>L.amazonensis</i> cultivadas em meio LIT (A) e nas concentrações de 200 μg/mL (B) e 3,60 μg/mL (C) de riparina II.	35
Figura 14- Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das formas promastigotas de <i>L.</i> <i>amazonensis</i> não tratados e tratados com riparina II após o tempo de 72 h. Em (A) parasitas não tratados, cultivados em meio LIT e em (B) parasitas não tratados cultivados em meio	

LIT-DMSO, foram observados parasitas com morfologia típica; em (C e D) parasitas tratados com 3,60 μ g/mL de riparina II, apresentaram corpo arredondado (seta azul), flagelo curto e bolhas na superfície da membrana plasmática (seta vermelha).....36

Figura 15- Eletroforese SDS-PAGE. Gel corado com comasse blue. Perfil proteico de *L. amazonensis*. LMW: marcador de pesos molecular; coluna 1: controle negativo, parasita cultivado em meio LIT; coluna 2: parasita cultivado com 200 μ g/mL de riparina II, exibindo diferença na altura de duas bandas proteicas (setas vermelhas); coluna 3: parasita cultivado com 3,6 μ g/mL riparina II (IC50).....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

Figura 16- Viabilidade das células Vero frente a diferentes concentrações de riparina II, após 72 h de incubação. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados representam a média de três experimentos independentes. O nível de significância foi de 5% pelos testes de Anova e Tukey.38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- IC50 das riparinias I, II e III frente a *L. amazonensis* ($p < 0,05$)..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Concentração de inibição de 50%
LIT	Liver Infusion Triptose
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFB	Soro Fetal Bovino
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	LEISHMANIOSES	15
2.1.1	Agente etiológico	15
2.1.2	Ciclo biológico	17
2.1.3	Formas Clínicas	19
2.1.4	Leishmaniose Tegumentar Americana	19
2.1.5	Tratamento das leishmanioses.....	22
2.2	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	24
2.2.1	Metabólitos secundários.....	26
2.3	<i>ANIBA RIPARIA</i> (NEEZ) MEZ	27
2.4	RIPARINAS.....	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	SÍNTESE DAS RIPARINAS I, II E III	30
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	30
4.2.1	Manutenção das formas promastigotas da <i>Leishmania amazonensis</i>	30
4.2.2	Atividade leishmanicida pelo método do MTT	30
4.3	MICROSCOPIA ÓPTICA DE <i>L. AMAZONENSIS</i> CULTIVADA COM RIPARINA II	31
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE PARASITAS CULTIVADOS COM RIPARINA II	31
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA RIPARINA II SOBRE CÉLULAS VERO	32
4.6	ELETROFORESE SDS-PAGE.....	32
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	34
5.2	ANÁLISE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	34

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i> CULTIVADA COM RIPARINA II	35
5.4 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE DE PROTEÍNAS DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i> CULTIVADAS COM RIPARINA II	36
5.5 ENSAIO CITOTÓXICO COM CÉLULAS VERO	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* spp. comprehende protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, responsável por causar leishmaniose. Essa doença infecciosa atinge uma série de animais, entre eles, o homem, causando lesões na pele e mucosas e, nos casos mais graves, a morte dos pacientes (SOUZA, 2010). A leishmaniose encontra-se dentro do grupo de doenças tropicais negligenciadas, sendo considerada uma das seis doenças infecciosas mais importantes pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas residem em áreas consideradas de risco de contrair a doença (WHO, 2015).

O agente etiológico da leishmaniose apresenta um ciclo de vida heteróxeno, alternando fases em um hospedeiro vertebrado, como o homem e outros mamíferos, e no invertebrado hematófago do gênero *Lutzomia*, como hospedeiro intermediário. Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor pode transmitir o agente etiológico da leishmaniose (BRASIL, 2017; CDC, 2018). As formas clínicas da leishmaniose são divididas em dois principais grupos: a Leishmaniose Visceral (LV), forma mais grave, e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (GONTIJO E CARVALHO, 2003). A LTA por sua vez é subdividida nas formas cutânea, cutânea difusa e mucosa ou muco-cutânea que atinge principalmente áreas da pele e mucosas, causando lesões ulcerosas, que variam segundo a espécie de *Leishmania* sp., o estágio de evolução da doença, o estado do sistema imunológico do hospedeiro, entre outros fatores (BRASIL, 2017).

O tratamento das leishmanioses determinado pelo Ministério da Saúde apresenta um alto grau de toxicidade e, consequentemente, efeitos colaterais que prejudicam a terapia da doença. Esse é um fato considerado na busca por novas alternativas terapêuticas que unam eficácia e menor efeito tóxico no organismo dos pacientes (CARVALHO *et al.*, 2015). Desse modo, uma das estratégias que mais crescem no mundo é a pesquisa de compostos naturais derivados de plantas que visem o tratamento das leishmanioses (ASSIS, 2015).

Segundo a OMS, cerca de 65% da população mundial utiliza plantas medicinais como conduta terapêutica e 25% dos medicamentos modernos disponíveis são derivados de plantas (CRAGG *et al.*, 2014). As plantas medicinais compreendem todo produto vegetal que é administrada ao homem ou animal e produz sobre eles uma ação farmacológica (ALMEIDA, 1993). O interesse em produtos fitoterápicos acarretou nos últimos anos o aumento nas pesquisas e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas utilizando plantas medicinais e seus derivados. O reconhecimento do potencial da fitoterapia promoveu o incentivo para sua adoção como conduta terapêutica e a inclusão na rede farmacológica do SUS (Sistema Único

de Saúde) (ASSIS, 2015; BRASIL, 2006a).

Os princípios ativos encontrados nas plantas medicinais e responsáveis pela sua eficácia farmacológica resultam do seu metabolismo secundário. Esses produtos, estão relacionados com a defesa e interação do organismo vegetal com o meio ambiente e com outros organismos, por isso dá-se a esses compostos o nome de metabólitos secundários. Existem três grupos principais de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e os alcalóides (SCHUMAN, 2016).

A planta *Aniba riparia* é uma árvore nativa da região amazônica e guianas, da qual foram isolados alcalóides do tipo alcamida, denominados de riparinas em referência a planta. Esses alcalóides tem despertando o interesse na pesquisa de suas atividades biológicas. Estudos científicos comprovam que as riparinas apresentam efeitos: ansiolítico, antidepressivo (SOUZA, 2004; MELO, 2006); antimicrobiano (CATÃO et al, 2005); analgésico e anti-inflamatório (NASCIMENTO, 2016). Tem sido reportada uma outra atividade de um análogo sintético das riparinas (riparina A), contra a *Leishmania amazonensis*, destacando um efeito antiparasitário promissor nos estudos *in vitro* (ARAÚJO, 2016).

O presente trabalho, propôs avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* das riparinas I, II e III sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, na busca de novos fármacos para o enfrentamento das leishmanioses.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países, com mais de 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas consideradas de risco (WHO, 2015). As leishmanioses são um conjunto de doenças que fazem parte do grupo das doenças tropicais negligenciadas, sendo conhecidas por esse termo, por estarem fora dos interesses das empresas do ramo de saúde e da indústria farmacêutica (SOUZA, 2010). Consideradas antropozoonoses endêmicas altamente infecciosas, as leishmanioses são causadas por protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes ao gênero *Leishmania spp.* (CABEZAS *et al.*, 2015). Esse gênero de protozoários foi isolado inicialmente por William Boog Leishman em 1903 durante análises no baço de um paciente (LEISHMAN, 1903).

A transmissão da doença para o homem envolve os insetos dípteros flebotomíneos (subfamília *Phlebotominae*) do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e do gênero *Lutzomyia* (Novo mundo), sendo o gênero *Lutzomyia* (Figura 1) o principal vetor responsável pela transmissão da doença no Brasil (BRASIL, 2017). As ocorrências de casos de leishmaniose surgem, quando no local de desmatamento, ocorre a urbanização de áreas que são habitats naturais desses vetores (ROTUREAU, 2006).



Figura 1- Flebótomo do gênero *Lutzomyia*. Fonte: vectorbase.org, 2018.

2.1.1 Agente etiológico

As *Leishmanias* estão distribuídas por todo mundo, existindo 30 espécies conhecidas, das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 no Novo mundo. Dentre elas, cerca

de 20 espécies estão envolvidas no desenvolvimento de doenças no homem. Sistematicamente estão organizados na ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, Gênero *Leishmania*, divididos nos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (SHAW, 1994; NEVES, 2005).

Por estarem classificadas na ordem *Kinetoplastida* apresentam uma característica comum, de onde provém o nome da ordem, que é a presença de uma mitocôndria modificada denominada de cinetoplasto (do inglês “kinetoplast”), rico em uma rede de DNA circular essencial para a vida do microrganismo (GRIMALDI e TESH, 1993). No Brasil, as espécies do subgênero *Leishmania* com maior importância clínica são a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*, responsáveis, respectivamente, pelas Leishmanioses Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral. Do subgênero *Viannia* as principais espécies de importância são a *L. (V.) braziliensis*, responsável pela LTA muco-cutânea e cutânea, e a *L. (V.) guyanensis*, responsável apenas pela forma cutânea (GRIMALDI E TESH, 1993; BRASIL, 2007; BRASIL, 2014;). Cada espécie apresenta características clínicas únicas, assim como reservatórios, vetores e padrões epidemiológicos, que estão relacionados a cada uma das *Leishmania* sp. (VALE e FURTADO, 2005).

Duas formas evolutivas principais são diferenciadas, a forma amastigota ou aflagelada e a forma promastigota ou flagelada. A promastigota (Figura 2) é a forma flagelada extracelular, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, apresentando cinetoplasto anterior ao núcleo. O tamanho das formas promastigotas é variável, mesmo dentro de uma mesma espécie, medindo 10 a 15 μm de comprimento e 2 a 3,5 μm de largura, incluindo o flagelo que é normalmente maior que o corpo (NEVES, 2005; BRASIL, 2017).

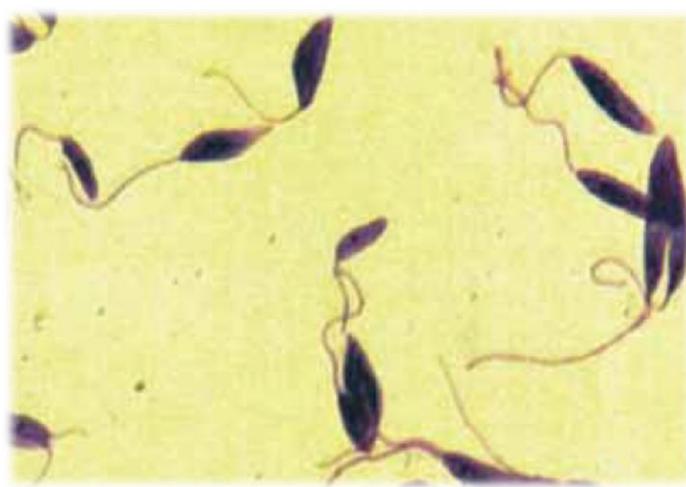


Figura 2- - Formas promastigotas de *Leishmania* sp. Fonte: Brasil, 2017.

De formato arredondado e aflageladas, as formas amastigotas (Figura 3) são observadas no hospedeiro vertebrado, multiplicando-se por divisão binária no interior dos macrófagos e

medem de 3 a 6 μm de comprimento por 4 a 6 μm de largura (NEVES, 2005; BRASIL, 2017).

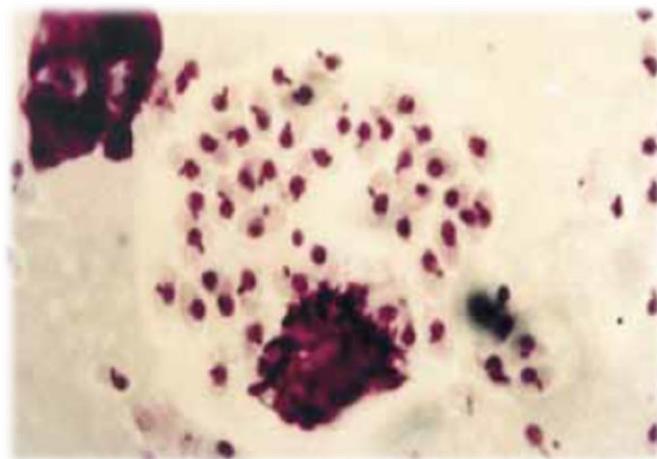


Figura 3- Formas amastigotas de *Leishmania* sp. Fonte: Brasil, 2017.

2.1.2 Ciclo biológico

O ciclo de vida da *Leishmania* sp. (Figura 4) envolve alternância entre um hospedeiro vertebrado e o flebótomo vetor, sendo denominado de ciclo heteroxeno. No hospedeiro mamífero a biologia do desenvolvimento do parasita é simples, diferentemente do ciclo no inseto vetor que é bem mais complexo e menos compreendido. O ciclo de vida não apresenta grandes variações em espécies diferentes, análise de isoenzimas e métodos de biologia molecular ajudam na identificação das diferentes espécies e no estudo dos seus respectivos ciclos (GOSSAGE, 2003; CDC, 2018).

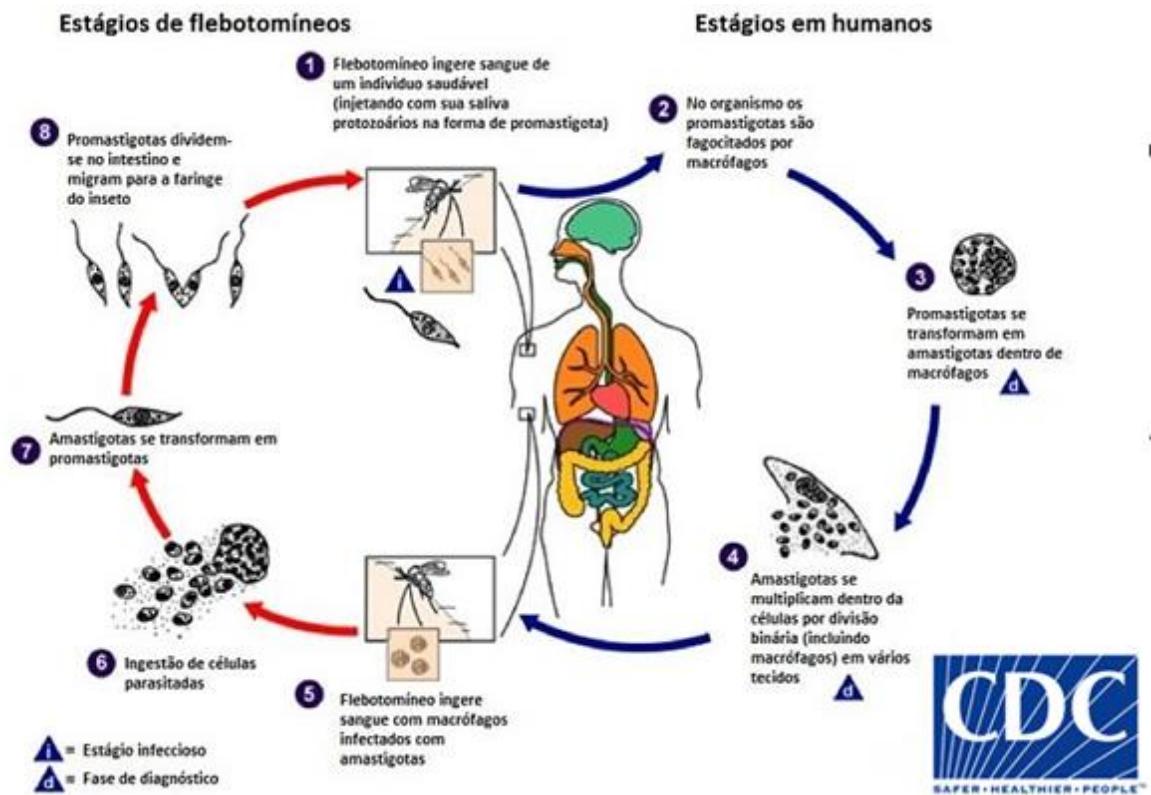


Figura 4- Ciclo biológico da leishmaniose. Fonte: Adaptado de <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Inicialmente fêmeas do flebótomo vetor, durante o repasto sanguíneo em indivíduos infectados, aspiram através da sua probóscide formas amastigotas da *Leishmania sp.* livres no sangue ou dentro dos macrófagos. No intestino médio anterior, os macrófagos se rompem e liberam as formas amastigotas. Essas sofrem sucessivas divisões binárias e se transformam na forma promastigota procíclica (formas replicantes flageladas) que também se dividem por divisões binárias. As formas promastigotas procíclicas se aderem ao epitélio intestinal por meio do flagelo e permanecem no intestino médio anterior dos flebotomíneos por cerca de cinco dias, quando, após esse período, sofrem um processo de diferenciação (metaciclogênese) para as formas promastigotas metacíclica que são infectantes para o hospedeiro vertebrado (HANDMAN E BULLEN, 2002).

Durante um novo repasto sanguíneo as fêmeas do inseto vetor, agora infectadas com *Leishmania sp.*, transferem, através do local da picada, as formas promastigotas metacíclicas para o hospedeiro. Estas formas resistem a ação do sistema complemento sendo posteriormente fagocitadas. A saliva dos flebotomíneos possui neuropeptídos vasodilatadores que, além de facilitar a alimentação do inseto, suprime a resposta imune do hospedeiro localmente, contribuindo para a infectividade das promastigotas metacíclicas. Logo após as formas promastigotas se transformam em amastigotas. Essas formas amastigotas apresentam

características que lhes concede resistência ao ambiente ácido do lisossomo. Após sucessivas multiplicações a membrana do macrófago é rompida e ocorre a liberação das formas amastigotas na corrente sanguínea, podendo infectar novas células ou ser transmitidas para novos vetores reiniciando assim o processo de transmissão (HANDMAN E BULLEN, 2002; CDC, 2018). Estudos *in vitro* mostraram que fatores como temperatura, acidez são responsáveis por ativar e inativar genes específicos desencadeando assim as diferenciações observadas (GOMES et al., 2017)

2.1.3 Formas Clínicas

A manifestação clínica ocasionada por *Leishmania sp* é dependente da espécie que está parasitando o hospedeiro e da interação entre eles. Oficialmente as formas clínicas das leishmanioses estão inclusas em dois grupos: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV) (GONTIJO E CARVALHO, 2003).

A LTA tem distribuição mundial e está relacionada com as espécies: *L. tropica* e *L. major*, no Velho Mundo. Enquanto que no Novo Mundo as espécies mais comuns são: *L. amazonensis* e *L. mexicana*, que fazem parte do subgênero *Leishmania*, e *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* que pertencem ao subgênero *Viannia* (BRASIL, 2017).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave dentro do grupo das leishmanioses, por apresentar uma alta incidência e letalidade se não tratada, sendo a *L. chagasi* uma doença crônica de aspectos clínicos diversos para cada região em que ocorre. Conhecida como Kala-Azar na Índia, palavra que na cultura indiana significa doença negra, no Brasil os primeiros casos da doença datam de 1913; a *L. chagasi* é a principal espécie envolvida com a LV no país (BRASIL, 2006).

2.1.4 Leishmaniose Tegumentar Americana

Considerada pela OMS uma das seis mais importantes doenças infecciosas, a LTA é a forma mais comum de leishmaniose e constitui problema de saúde pública em 85 países em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia). Ainda segundo a OMS, mais de 1 milhão de casos da doença foram reportados nos últimos 5 anos (Figura 5) (WHO, 2015).

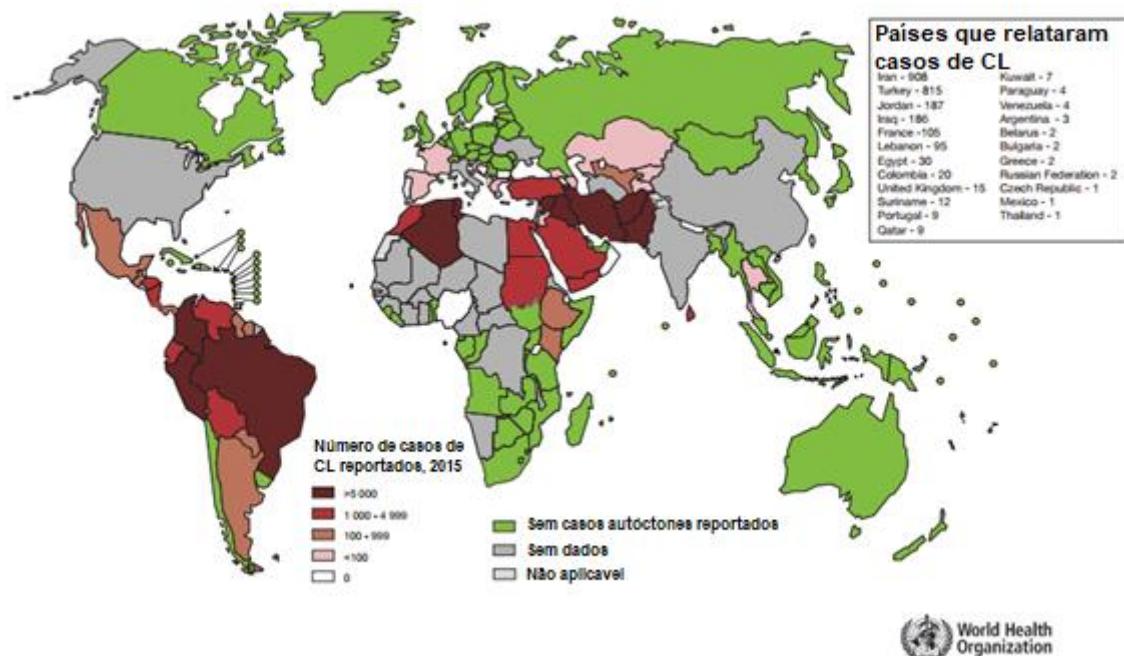


Figura 5- Status da endemicidade de leishmanioses cutânea no mundo. Fonte: WHO, 2015.

No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram um aumento no número de casos desde 1980, com uma média anual de 25.756 novos casos entre os anos de 1995 e 2014 (Figura 6). Em 2014 foram confirmados 21.959 casos da doença, a região norte apresentou o maior número de casos com um total de 11.125, seguido pela região nordeste com 5.429 casos novos de leishmaniose tegumentar americana; onde o estado de Pernambuco apresentou 241 casos descritos (BRASIL, 2017; BRASIL, 2018).

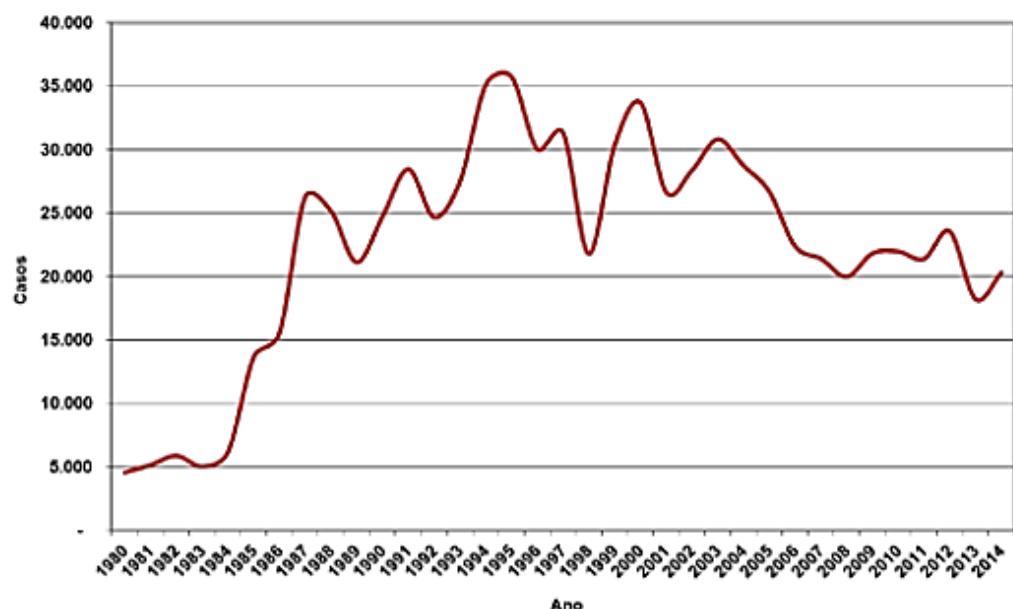


Figura 6- Casos confirmados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil - 1980 a 2014. Fonte: Brasil, 2017.

Como manifestações clínicas gerais a LTA causa lesões ulcerosas na pele ou mucosas que podem durar meses, às vezes anos. Apresenta variadas formas clínicas que dependem da região, espécie do parasito e do estado imunitário do paciente, sendo dividida em LTA cutânea, cutânea difusa e mucosa (BRASIL, 2017).

A forma cutânea é caracterizada por lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas (Figura 7) que surgem com cerca de 1 a 3 meses após a picada do mosquito vetor. Essas lesões ulcerosas apresentam uma alta densidade de parasitos em suas bordas nas fases iniciais da infecção (ALMEIDA E SANTOS, 2011). No velho mundo a leishmaniose cutânea é causada principalmente pelas espécies de *Leishmania*: *L. tropica* e *L. major*. Enquanto que no Novo Mundo tem-se: *L. amazonensis* e *L. mexicana*, que fazem parte do subgênero *Leishmania*, e *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* que pertencem ao subgênero *Viannia* (GONTIJO, 2003).



Figura 7- A) Lesão ulcerada única, arredondada com bordas elevadas. B) Lesão cutânea múltipla e localizada.
Fonte: Brasil, 2017.

A leishmaniose tegumentar americana cutânea difusa (LCD) (Figura 8) é uma forma clínica rara e grave, apresentando-se em pacientes com comprometimento da resposta imune celular. Caracteriza-se pela presença de múltiplas lesões ulcerosas cobrindo grandes extensões do corpo. Está associada a uma deficiência imunológica do hospedeiro, onde a resposta imune celular encontra-se por algum motivo deprimida e consequentemente não há resposta aos tratamentos tradicionais, logo a doença tem curso crônico e progressivo por toda a vida do paciente. É causada principalmente pela espécie *L. (L.) amazonensis* (VIEIRA-GONÇALVES, 2008; BRASIL, 2017).



Figura 8- LTA cutânea difusa, lesões ulceradas pequenas distribuídas na face posterior do tronco. Fonte: Brasil, 2017.

A LTA mucosa caracteriza-se por lesões que causam grave dano nas regiões mucosas principalmente das vias superiores dos pacientes acometidos, algumas vezes está relacionada com extensão de lesão cutânea adjacente (Figura 9). Dentre os casos de leishmaniose tegumentar a forma mucosa pode representar entre 3% dos casos e 25% em áreas endêmicas, está relacionada com a espécie *L. (V.) braziliensis*, porém *L (V.) guyanensis* pode também causar lesão mucosa (BRASIL, 2017).



Figura 9- Lesão em mucosa nasal com ulceração das asas do nariz devido a leishmaniose mucosa. Fonte: Brasil, 2007.

2.1.5 Tratamento das leishmanioses

Os medicamentos preconizados pelo Ministério da Saúde para tratamento das leishmanioses produzem efeitos hepato, cardio e nefrotóxico, sendo as drogas de primeira

escolha os antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) (Figura 10A) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) (Figura 10B). A efetividade dessas drogas está relacionada com a interferência que elas provocam na atividade bioenergética dos parasitas, interferindo na produção de energia nas formas amastigotas da *Leishmania* (CARVALHO, 2015).

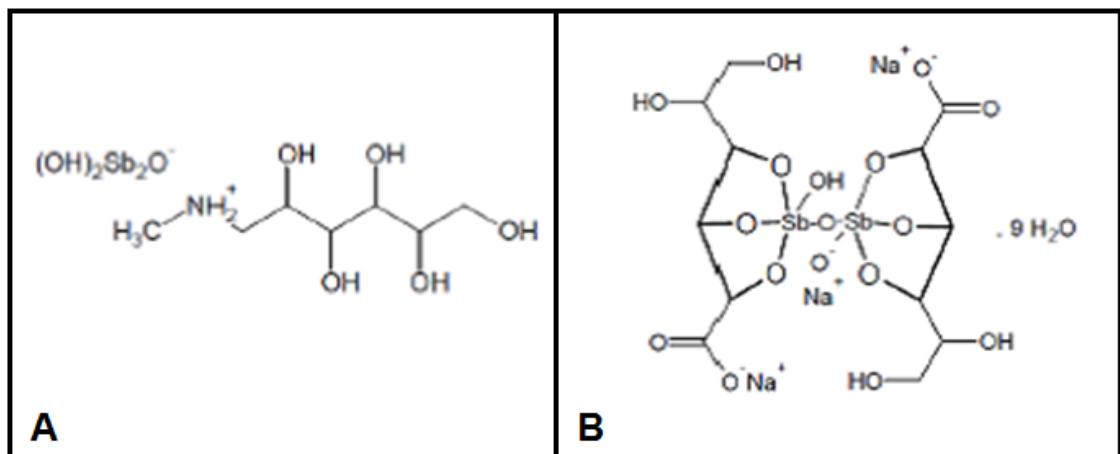


Figura 10- Estrutura química do antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®). B) Estrutura química do Stibogluconato de sódio (Pentostam®). Fonte: Barbosa, 2010.

O uso de antimoniais para o tratamento das leishmanioses teve início com a descoberta de Vianna (1912) que observou a eficácia do tártaro emético (antimonal trivalente) contra LTA. Devido aos graves efeitos colaterais do tártaro emético, como intolerância gastrintestinal e cardiototoxicidade, esse medicamento foi substituído por compostos pentavalentes, primeiramente o Pentostam® em 1936 por Schmit, e durante a Segunda Guerra Mundial surgiu na França um medicamento alternativo comercializado como Glucantime®. Enquanto o Pentostam® é distribuído nos países de língua inglesa, o Glucantime® é comercializado no Brasil e em países de língua francesa e espanhola (RATH, 2003).

Os efeitos colaterais observados em pacientes, estimula a interrupção do tratamento, promovendo o aparecimento de cepas do parasita resistentes as drogas utilizadas como primeira escolha. Faz então o uso de medicamentos denominados como de segunda linha de tratamento; no Brasil utiliza-se a Pentamidina, a Anfotericina B e a Miltefosina como segundas opções (PONTE-SUCRE, 2017; BRASIL, 2017).

A Pentamidina age interferindo na síntese de DNA, alterando morfologicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial (KAUR e RAJPUT, 2014). Classicamente a dosagem utilizada é de 4mg/Kg/dia, por via intramuscular a cada dois dias. A toxicidade está relacionada a dose acumulada, por isso não é recomendado que a dose total utilizada não ultrapasse 2g, e os efeitos colaterais incluem dor, induração (rigidez em resposta à

inflamação) e abcessos no local de aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, cefaleia, hipoglicemias e hiperglicemias, devido a ação do medicamento no metabolismo da glicose (BRASIL, 2017).

Outro medicamento utilizado como segunda escolha para as leishmanioses é o desoxicolato de Anfotericina B, um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular, é administrado por via endovenosa, diluída em soro glicosado 5% e infundida em quatro horas. Os primeiros relatos da eficácia da Anfotericina B foram publicados em 1960, dez anos depois um estudo avaliou o fármaco em 49 pessoas com leishmaniose muco-cutânea obtendo resultados excelentes. O mecanismo de ação se dá pela sua interação específica com o ergosterol causando mudança de sua permeabilidade seletiva para K^+ e Mg^{2+} e consequentemente a morte do parasito. A droga tem eficácia contra as espécies de *Leishmania*, mas é tóxica para as células de mamíferos (KAUR e RAJPUT, 2014; MENDONÇA, 2018).

A miltefosina é um composto anticancerígeno que sofreu avaliações experimentais que comprovaram sua eficácia para o tratamento de leishmanioses visceral, sendo a primeira droga de uso oral usada no tratamento do kalazar por *L. donovani*. A atividade leishmanicida da miltefosina está relacionada à indução de morte celular semelhante a apoptose, com degradação do DNA, e com alterações na biossíntese de fosfolipídios e no metabolismo de lipídeos (PARIS, 2004; KAUR e RAJPUT, 2014). Estudo recente demonstrou o potencial da miltefosina na inibição do crescimento *Leishmania major* *in vitro* após 48 hrs de incubação (NAZARI-VANANI, 2018).

No entanto, deve-se observar as contraindicações; estudos indicam um perigoso potencial de teratogenicidade, impossibilitando o uso por mulheres grávidas e em mulheres de idade fértil que não estejam usando medicamentos anticoncepcionais, devendo manter a contracepção por dois meses após o tratamento, pois resíduos do medicamento podem ser identificados no corpo por vários meses após o fim do uso. Outro ponto importante na discussão do uso de miltefosina é a sua capacidade de desenvolver, nas Leishmanias, resistência ao medicamento (DORLO, 2008; BRASIL, 2016).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

A utilização de plantas e outros recursos naturais como alternativa para tratamento de moléstias pode ser observada desde as civilizações antigas com registros que datam de 2600 a.C. Durante a pré-história o homem utilizava conhecimentos básicos sobre plantas para

distinguir entre as próprias para o consumo e as que poderiam ser danosas a sua saúde, assim como as que ajudavam na cura de feridas e moléstias. Papiros datados de 1600 a.C. destacavam a importância e o emprego pelos egípcios de produtos naturais para cura de doenças e diminuição de sintomas (FRANCESCHINI FILHO, 2004).

Outros povos como os chineses, que usam o conhecimento sobre princípios ativos de plantas a mais de cinco séculos, criaram, assim como Indus, egípcios e gregos, um tipo de categorização para ervas medicamentosas a partir de características como cor, sabor, forma, colocando atribuições mágicas as suas propriedades curativas (LIMA, 2006). Até os dias atuais, produtos extraídos de plantas são usados para tratamento de uma gama de doenças variando entre um resfriado a infecções parasitárias (CRAGG E NEWMAN, 2013).

A partir do século XIX o desenvolvimento da química farmacêutica e a produção de medicamentos sintéticos acarretou uma diminuição das pesquisas com ervas medicinais (FRANCESCHINI FILHO, 2004).

No Brasil, o uso de plantas medicinais tem origens indígenas, mas a relação desses povos com o negro e o branco permitiu a construção de uma forte cultura popular sobre o emprego de produtos naturais como fonte terapêutica (ALVES, 2013). O país é detentor da maior biodiversidade do planeta, com uma diversidade enorme de flora, além de apresentar raízes culturais que estimularam o uso de plantas medicinais. No entanto, mesmo apresentando uma vastidão de mais de 55 mil espécies de plantas, o conhecimento sobre suas potencialidades é escasso (BRASIL, 2006; DUTRA, 2016). No Brasil, entre 1940 e 1950, o uso de produtos vegetais bioativos diminuiu frente ao processo de industrialização e uso de drogas sintéticas (BRUNNING *et al*, 2012).

Nos últimos anos tem se observado o retorno pelo interesse, por parte da indústria farmacêutica, nas potencialidades das plantas medicinais, evidenciando um crescente número de publicações científicas nesta área. Ainda assim a maioria das espécies vegetais do planeta é desconhecida do ponto de vista científico (ASSIS, 2015). Segundo a OMS cerca de 65% da população mundial utiliza plantas ou derivados como conduta terapêutica primaria. Dos medicamentos modernos estima-se que cerca de 25% sejam derivados de plantas (CRAGG *et al.*, 2014).

Segundo Almeida (1993), toda planta que é administrada ao homem ou animal e produz sobre eles uma ação farmacológica é denominada planta medicinal. Porém, a utilização desses produtos deve ser realizada com cautela, pois, diferentemente do que é vinculado pela mídia e empresas de produtos naturais, nenhum desses produtos estão livres de efeitos colaterais que possam colocar em risco a saúde do paciente. É necessária máxima atenção nas etapas de

produção de produtos e medicamentos derivados de plantas medicinais com o objetivo de garantir qualidade, segurança e eficácia no seu uso (SILVEIRA *et al*, 2008; BOCHNER *et al*, 2012). Com o objetivo de garantir a qualidade de vida da população, o Ministério da Saúde mudou em 2006 a Política de Práticas Integrativas e Complementares e a Política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que abrangem práticas de acupuntura, homeopatia, plantas medicinais e fitoterapia. Essas políticas estabelecem diretrizes que visam a disponibilidade de forma segura e eficaz, com capacitação de profissionais de saúde, para identificar e adequar a utilização dessas terapias alternativas dentro do sistema único de saúde (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

Os fitoterápicos, diferentemente das plantas medicinais que são utilizadas integras ou em partes, são medicamentos derivados de plantas medicinais ou seus derivados, e apresentam eficácia comprovada, assim como conhecimento sobre seus riscos à saúde (BRASIL, 2009). O interesse na fitoterapia fez com que ela crescesse e evoluísse nos últimos anos, indo além dos interesses terapêuticos voltados para uso popular. O conhecimento científico aplicado a essa temática permitiu o aperfeiçoamento e regulamentação de fitoterápicos em todo mundo, com representação significativa na conduta terapêutica de diversas doenças (BRASIL, 2006).

2.2.1 Metabólitos secundários

As potencialidades biológicas atribuídas às plantas se devem a presença de variados compostos denominados “princípio ativo” que são substâncias com potenciais efeitos farmacológicos originados do metabolismo das células vegetais. No interior das células vegetais acontece um conjunto de reações químicas que recebe o nome de metabolismo, o qual é dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário envolve um conjunto de processos metabólicos que são essenciais para o vegetal e envolve compostos como carboidratos e nucleotídeos. O metabolismo secundário origina compostos que não desempenham funções vitais para a planta, mas que estão envolvidos na relação entre a planta com meio ambiente ou outros organismos, exercendo principalmente o papel de proteção do organismo vegetal, apresentam ampla diversidade estrutural e suas funções não são completamente esclarecidas (DEWICK, 2009).

Por estarem envolvidos na interação entre organismos, os metabólitos secundários apresentam atividades biológicas importantes. São conhecidos e estudados três principais grupos de metabólitos secundários, são eles: terpenos, compostos fenólicos e os alcalóides (SCHUMAN, 2016). O grupo dos alcalóides se destaca por apresentarem potencial para a

terapêutica da leishmaniose, com vários estudos apresentando substâncias com atividade leishmanicida (GIL *et al.*, 2008; ARAUJO, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017).

2.3 *Aniba riparia* (Neez) Mez

A. riparia (Figura 11) é uma árvore pertencente à família Laurácea sendo típica da região Amazônica e Guianas onde é popularmente conhecida como “louro”. Vários constituintes químicos foram isolados dessa espécie vegetal, como flavonoides, neolignanas e alcamidas. Os estudos referentes a *A. riparia*, estão relacionados principalmente a bioatividade das riparinas, alcaloides isolados do fruto verde da espécie, que após elucidação de sua estrutura química passaram a ser sintetizados pelo Laboratório de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (BARBOSA-FILHO, 1987; SOUZA *et al.*, 2008).

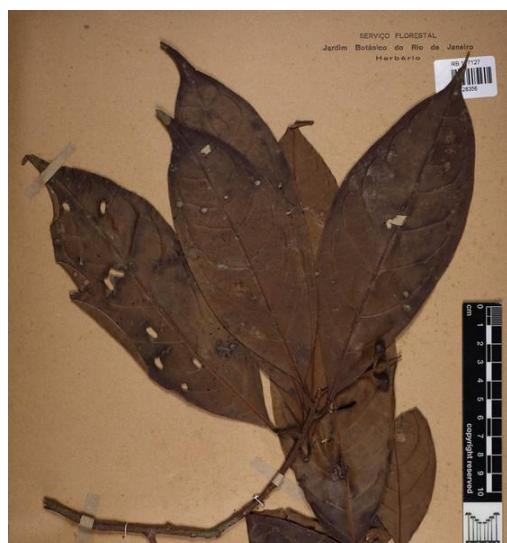


Figura 11- Folhas da árvore *Aniba riparia* (Neez) Mez. Fonte: floradobrasil.jbrj.gov.br

2.4 RIPARINAS

A partir de frutos verdes de *Aniba riparia* foram isoladas três substâncias: N-beonzoiltiramina, N- (2-hidroxibenzoil)-tiramina e N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina, sendo chamadas de riparinas I, II e III, respectivamente, em referência à planta. As riparinas são alcaloides do tipo alcamida que apresentam características químicas e potencialidades biológicas vistas em poucos constituintes na natureza. Após elucidação estrutural de um dos compostos, denominado Riparina II ((O-metil-)-N-(2-hidroxibenzoil) tiramina) (Figura 12), verificou-se que a molécula é resultado da condensação entre o éter metílico da tiramina e o

ácido salicílico, despertando a partir daí, o interesse em sua potencialidade farmacológica (BARBOSA-FILHO, 1987).

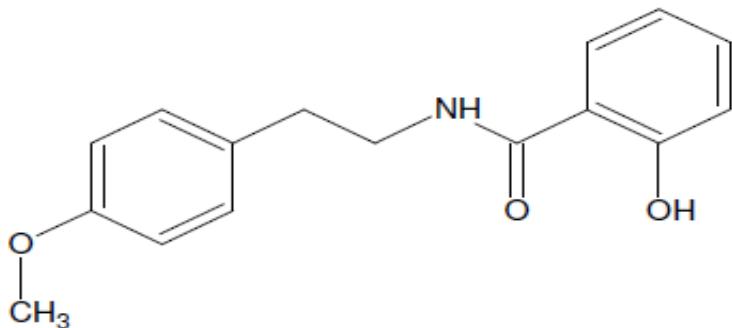


Figura 12- Estrutura química da riparina II.

Compostos isolados de plantas apresentam um rendimento muito baixo, logo, muitas vezes recorre-se a produção sintética dessas substâncias. Devido a essa questão, após isolamento e caracterização químicas, a produção sintética passou a ser a principal via de obtenção das riparinas (COSTA, 2016). As atividades biológicas observadas nessas alcamicidas incluem: efeitos ansiolítico e antidepressivo (SOUZA, 2004; MELO, 2006); antimicrobiano (CATÃO et al, 2005); analgésico e anti-inflamatório (NASCIMENTO, 2016).

Em estudo realizado com a riparina II por Carvalho et al. (2013), foi observado efeito anti-inflamatório em murinos, indicando uma inibição direta ou indireta da liberação de marcadores pró-inflamatórios envolvidos na geração da inflamação. A ação antidepressiva também foi demonstrada em camundongos (MELO et al., 2005). Riparina A, um análogo sintético de riparinas, demonstrou atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* em testes realizados por Araújo e colaboradores (2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o potencial leishmanicida das riparinas I, II e III frente a *Leishmania amazonensis* em ensaios *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a IC₅₀ das riparinas I, II e III sobre a forma promastigota da *Leishmania amazonensis*, através do ensaio de MTT;
- Analisar as alterações morfológicas da *L. amazonensis*, frente a ação da riparina com menor IC₅₀, através de microscopia eletrônica de varredura;
- Investigar o perfil proteico da *L. amazonensis* cultivada com a riparina de menor valor de IC₅₀, através da eletroforese de SDS-PAGE;
- Determinar a atividade citotóxica da riparina com menor valor de IC₅₀ contra células Vero.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS RIPARINAS I, II E III

As riparinas foram sintetizadas no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica- UFPB e gentilmente cedidas pelo grupo do Prof. Dr. José Maria Barbosa-Filho. O processo de produção das substâncias ocorreu pela condensação, sob agitação magnética (30min) em temperatura ambiente, do éter metílico da tiramida com o cloreto de metila, salicilato de metila ou com o ácido 2-6-dihidroxibenzóico para obtenção das riparinas I (O-Metil-N-benzoiltiramina), II (O-Metil-N-(2-hidroxibenzoil)-tiramina) e III (O-Metil-N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina), respectivamente. Posteriormente a esse processo ocorreu a purificação por métodos cromatográficos (cromatografia em coluna e em camada delgada), liofilização e a identificação através de ressonância magnética nuclear (BARBOSA-FILHO, 1990).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO*

4.2.1 Manutenção das formas promastigotas da *Leishmania amazonensis*

As formas promastigotas da *Leishmania amazonensis* (NHON/77/LTB0016) foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose – Himedia Laboratories) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen Corporation) inativado, 0,2% de hemina e 0,1% de antibióticos [10000U/mL de penicilina e 10000 µg/mL de estreptomicina (Gibco by Life Technologies) a 26°C em estufa B.O.D. (Demanda bioquímica de oxigênio).

4.2.2 Atividade leishmanicida pelo método do MTT

A obtenção da IC₅₀ (concentração da amostra teste que inibe 50% do crescimento dos parasitas em relação ao controle) foi realizada a partir do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). O MTT possibilita avaliar a atividade metabólica das células com base na redução desse sal por desidrogenases, resultando na produção de cristais de formazan intensamente corados no interior das células. A produção do cristal de formazan é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Este método foi descrito pela primeira vez por Mosmann (1983).

Os parasitas em fase exponencial de crescimento foram distribuídos numa concentração de 2 x 10⁶ parasitas/mL (100 µL) em placas de 96 poços de fundo chato junto com as riparinas a serem testadas. As substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec

Química Fina LTDA) para obtenção de uma solução-estoque, em seguida diluídas em meio LIT nas concentrações de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e adicionadas à placa (100 μL). A Anfotericina B (Sigma) foi utilizada como controle positivo e como controles negativos foram utilizados meio de cultura LIT e LIT com o solvente DMSO. A placa contendo os parasitas e as riparinas seguiram para incubação a 26°C em estufa B.O.D (Caltech Indústria e Comércio LTDA) durante 72 horas.

Após o tempo de 72 horas de incubação, seguiu a adição, em cada poço, de 20 μL de MTT (5mg/mL) sendo as placas posteriormente incubadas por 3 horas em estufa de BOD a 26°C. Após esse período, fez-se a aspiração do meio de cultura e o excesso do MTT para adição de 100 μL de DMSO, por poço, durante 30 minutos, para dissolver os cristais de formazan. A leitura da placa foi então realizada, para obtenção das absorbâncias dos poços, em um leitor de microplacas (BioRad Mark Microplate Spectrophotometer) com comprimento de onda de 595 nm. A densidade óptica (D.O.) média dos poços com o composto foi comparada com a dos poços controles. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA DE *L. amazonensis* CULTIVADA COM RIPARINA II

As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas por 72 horas em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose – Himedia Laboratories) contendo as concentrações de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 3,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de riparina II. *L. amazonensis* cultivadas apenas em meio LIT foram utilizadas como controle negativo. Após o período de incubação foi realizada a montagem das lâminas, com adição das amostras em forma de estiraço. Seguiu-se com a fixação em metanol e coloração das amostras com o corante Giemsa. As preparações foram analisadas em microscópio óptico Motic BA200 (Motic Electric, China) e em seguida realizada a captura de imagens utilizando uma câmera digital Moticam 1000. As imagens foram processadas utilizando o software Motic Images Plus (Motic Electric, China).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE PARASITAS CULTIVADOS COM RIPARINA II

Formas promastigotas de *L. amazonensis* controles e tratada na concentração de 3,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de riparina II foram lavadas em tampão fosfato e fixadas *overnight* em uma solução contendo glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,4 por 12 horas em temperatura ambiente e processadas para Microscopia eletrônica de

varredura (MEV). As formas promastigotas fixadas foram colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-L-lysina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Após 20 min. as lamínulas foram lavadas 3 vezes a cada 10 minutos no mesmo tampão para retiradas das células não aderidase pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2 por 1 hora. Em seguida as células foram desidratadas em séries crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e submetidas à secagem através do ponto crítico no Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Tokyo, Japan), cobertas com 20 nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol, Tokyo, Japan) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200 (Jeol, Tokyo, Japan) no Laboratório de Biologia Celular e Molecular coordenado pelo Prof.^o Dr. Fabio Brayner.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA RIPARINA II SOBRE CÉLULAS VERO

A linhagem das células Vero foram mantidas em meio DMEM com alta concentração de glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (HimediaLabs®), suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (Gibco Invitrogen®) e 1% de antibióticos (estreptomicina e penicilina-Gibco Life Technologies®).

Para realizar os testes, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços (100 μl / poço) na concentração de 2×10^5 células\mL. Após 24 horas, as substâncias com concentrações seriadas de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foram adicionados (100 μL /poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foi adicionado em cada poço 20 μL da solução de MTT na concentração de 5mg/ml seguido por incubação por 3 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. A leitura da absorbância foi então realizada, após dissolução do precipitado (cristais de formazan) com DMSO absoluto (100 μL /poço), em espectrofotômetro (BioRad Mark Microplate Spectrophotometer) no comprimento de onda de 595nm. Cada amostra foi testada em triplicata.

4.6 ELETROFORESE SDS-PAGE

A análise do perfil proteico das formas promastigotas de *L. amazonensis* foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O preparo do gel de resolução (15% de acrilamida) foi feito com 15 mL de solução “resolving”, ao qual se misturou, em um Becker, 150 μL de persulfato de amônio e 15 μL de TEMED.

Posteriormente o gel foi montado em cuba vertical de eletroforese com tampão “running buffer” 1x (248 mM Trisma, 1.92 M glycine, 1% w/v SDS). Foi realizada a preparação do gel de empilhamento (4% de acrilamida), para aplicação das amostras, através da homogeneização em becker de 5 mL de solução Stakin, juntamente com 100 μ L de persulfato de amônio e 10 μ L de TEMED. O gel de empilhamento é mais poroso para permitir que as proteínas migrem livremente e se concentrem no início do gel de resolução até ser adicionado o campo elétrico para início da corrida eletroforética.

Amostras previamente preparadas, contendo concentração conhecida de formas promastigotas de *L. amazonensis* (2×10^5) após 72 horas de incubação em meio LIT contendo concentrações de 200 e 3,60 μ g/ml de riparinas II, foram centrifugadas e posteriormente adicionadas em 50 μ L de L2x (tampão de amostra), fervidas por três minutos e aplicadas no gel. Foi utilizado como controle o marcador molecular LMW para comparação dos pesos moleculares das bandas eletroforéticas. Uma vez aplicada as amostras e marcador o LMW no gel ligou-se a fonte de tensão com uma voltagem de 300V (35mA) por 1 hora e 10 minutos para que ocorresse a migração das proteínas no gel de resolução.

Após a corrida, o gel foi retirado da cuba de eletroforese vertical e corado com Coomassie Brilliant Blue sob agitação por 10 minutos. O gel foi colocado overnight em solução “destain” para descoloração e visualização das bandas eletroforéticas. O ensaio foi realizado pela equipe do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (PE).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram feitas através do programa Graph Pad Prism 7.0 (GraphPad Software) utilizando o método de Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey para comparações múltiplas com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A obtenção da IC_{50} foi realizada por regressão não linear.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO*

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cultivadas com as riparinas I, II e III, por um período de 72 horas, apresentaram IC₅₀ de 6,65 µg/mL, 3,60 µg/mL e 6,57 µg/mL, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo, cultivadas apenas com meio LIT (Tabela 1). A riparina II apresentou a menor IC₅₀ entre as riparinas estudadas, portanto, apresentou maior atividade leishmanicida, em consequência desse resultado, a riparina II foi selecionado para os demais ensaios. A IC₅₀ da Anfotericina B, utilizada como controle positivo, foi de 0,44 µg/mL.

Tabela 1- IC₅₀ das riparinas I, II e III frente a *L. amazonensis* (p < 0,05).

IC ₅₀		
RIPARINA I	RIPARINA II	RIPARINA III
6,65 µg/mL	3,60 µg/mL	6,57 µg/mL

5.2 ANÁLISE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis* POR MICROSCOPIA ÓPTICA

A análise realizada com uso do microscópio óptico das *L. amazonensis* cultivadas com riparina II, mostrou alterações na morfologia do parasita. Os parasitas cultivados em meio LIT apresentaram morfologia típica de formas promastigotas, corpo e flagelo alongados (Figura 14 A). Os parasitas cultivados em concentrações de 200 µg/mL e 3,60 µg/mL de riparina II, apresentaram uma forma arredondada e flagelo curto (Figura 13 B e C).

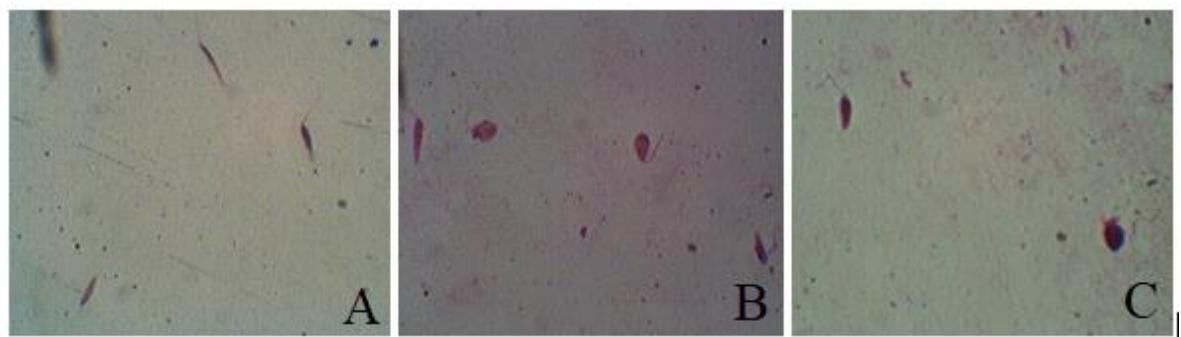


Figura 13- Fotomicrografias obtidas por microscopia óptica (1000x) mostrando formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT (A) e nas concentrações de 200 µg/mL (B) e 3,60 µg/mL (C) de riparina II.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Leishmania amazonensis* CULTIVADA COM RIPARINA II

A análise da microscopia eletrônica de varredura das formas promastigotas de *L. amazonensis*, cultivadas por 72 horas com riparina II, demonstrou alterações na superfície do parasita. Alguns parasitas perderam sua forma alongada, apresentando uma forma arredondada, encurtamento do flagelo e bolhas distribuídas ao longo da membrana plasmática. Nenhuma alteração morfológica foi observada nos parasitas cultivados em meio LIT ou meio LIT-DMSO (Figura 14).

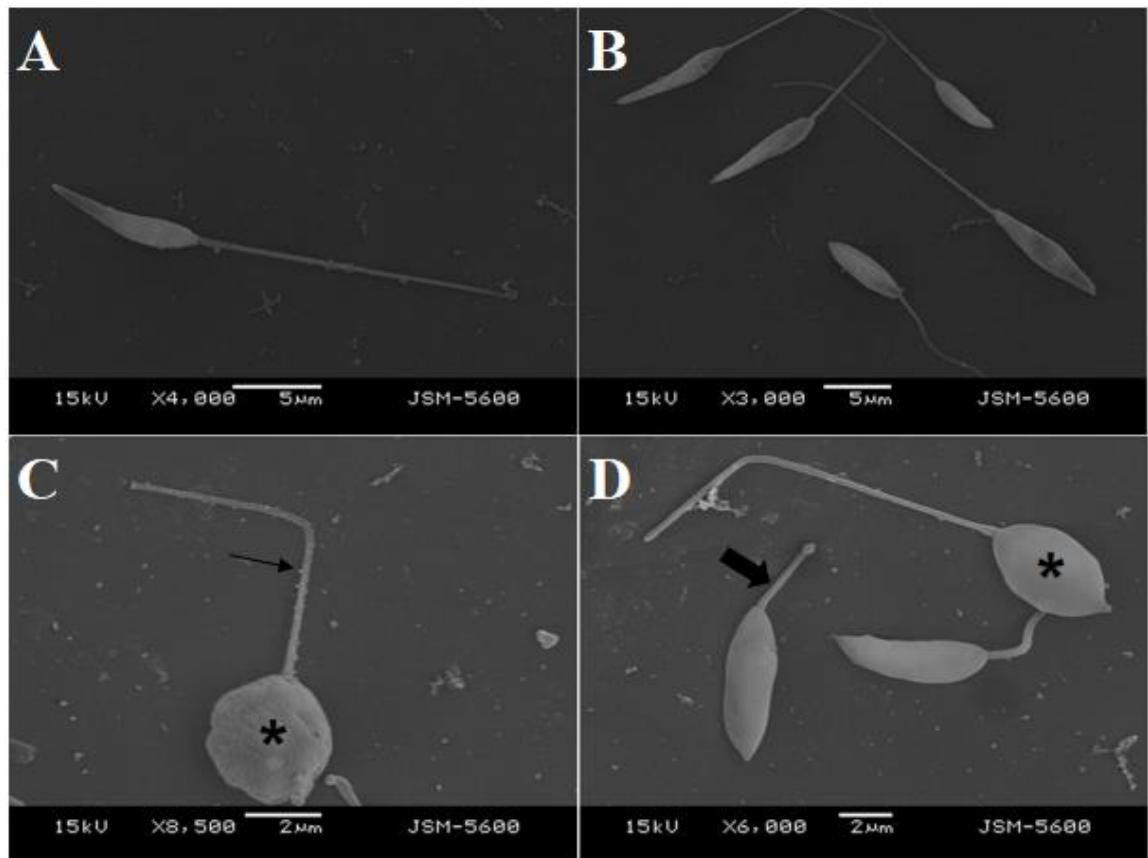


Figura 14- Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das formas promastigotas de *L. amazonensis* não tratados e tratados com riparina II após o tempo de 72 h. Em (A) parasitas não tratados, cultivados em meio LIT e em (B) parasitas não tratados cultivados em meio LIT-DMSO, foram observados parasitas com morfologia típica; em (C e D) parasitas tratados com 3,60 μ g/mL de riparina II, apresentaram corpo arredondado (asteriscos), flagelo curto (seta maior) e bolhas na superfície da membrana plasmática (seta menor).

5.4 ELETROFORESE EM GEL SDS-PAGE DE PROTEÍNAS DE *Leishmania amazonensis* CULTIVADAS COM RIPARINA II

O perfil proteico das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas e não tratadas com riparina II foi obtido por eletroforese vertical. A análise do perfil proteico mostrou alterações no padrão de migração na amostra de *L. amazonensis* cultivada com 200 μ g/mL de riparina II, em comparação com as amostras cultivadas com 3,60 μ g/mL (IC₅₀) e sem tratamento, cultivado em meio LIT-DMSO (Figura 15).

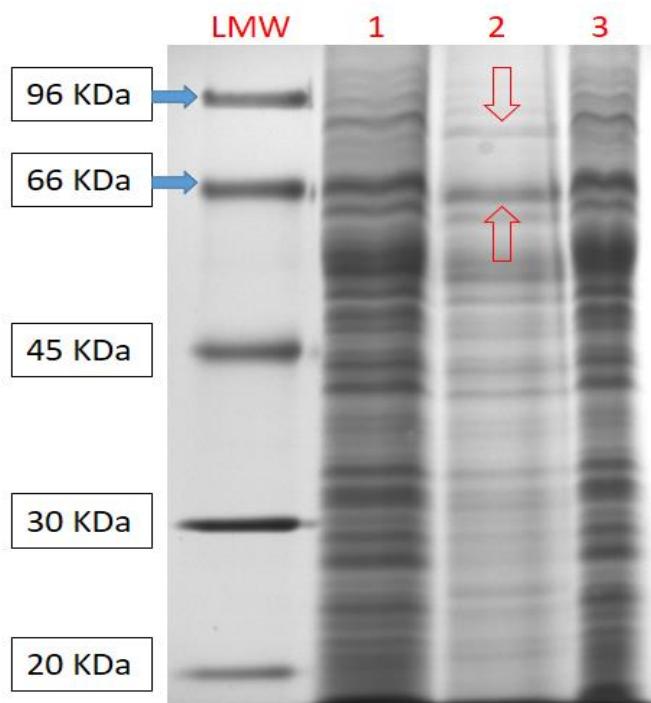


Figura 15- Eletroforese SDS-PAGE. Gel corado com comasse blue. Perfil proteico de *L. amazonensis*. LMW: marcador de pesos molecular; coluna 1: controle negativo, parasita cultivado em meio LIT; coluna 2: parasita cultivado com 200 µg/mL de riparina II, exibindo diferença na altura de duas bandas proteicas (setas vermelhas); coluna 3: parasita cultivado com 3,6 µg/mL riparina II (IC₅₀).

5.5 ENSAIO CITOTÓXICO COM CÉLULAS VERO

O ensaio de citotoxicidade da riparina II com células Vero resultou em uma CC₅₀ de 14,54 µg/mL (Figura 16).

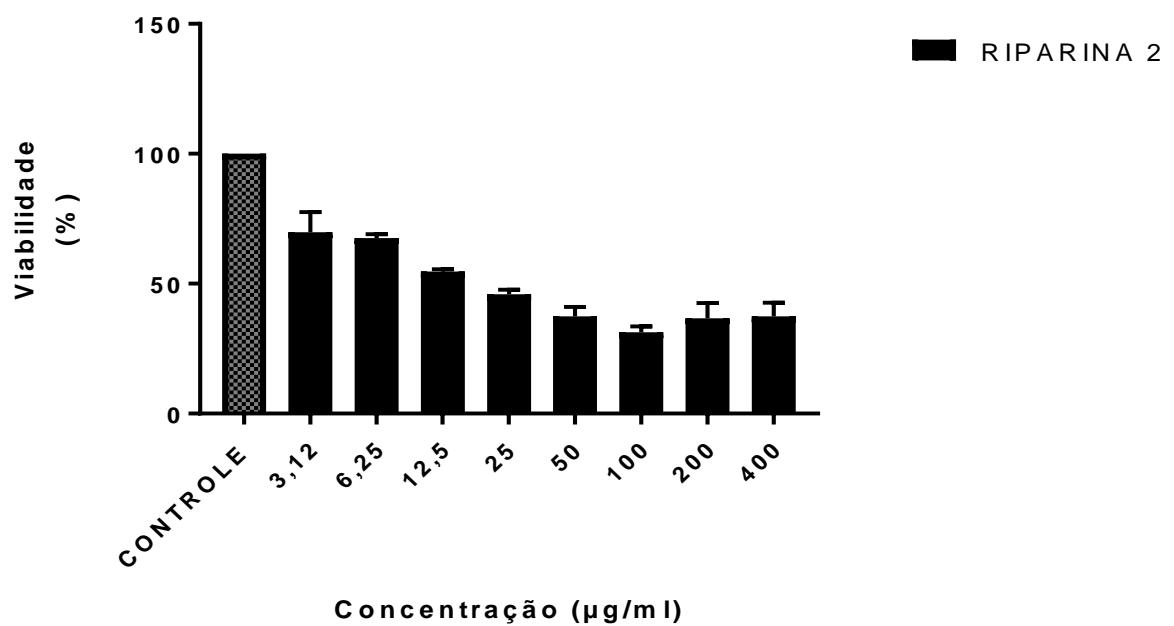


Figura 16- Viabilidade das células Vero frente a diferentes concentrações de riparina II, após 72 h de incubação. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados representam a média de três experimentos independentes. O nível de significância foi de 5% pelos testes de Anova e Tukey.

6 DISCUSSÃO

As drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses são substâncias com alta toxicidade, causando nos indivíduos diversos efeitos colaterais, tornando a conduta terapêutica difícil de ser adotada pelos pacientes, além do surgimento de cepas resistentes. Em decorrência desse quadro atual, a busca por novas drogas é primordial, com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento contra as leishmanioses, como também diminuir a toxicidade e consequentemente os efeitos colaterais causados aos pacientes (BRASIL, 2017).

O homem tem nas plantas medicinais uma importante fonte de novos compostos, com potencialidades biológicas curativas sobre diversas doenças que atingem o mundo moderno. (CRAGG E NEWMAN, 2013; ASSIS, 2015). Esses compostos são produtos do metabolismo dos vegetais, principalmente do seu metabolismo secundário. Dentre os metabólitos secundários, que se destacam como fonte possíveis medicamentos para tratamento da leishmaniose, estão os alcalóides (GIL, 2008; SILVA E OLIVEIRA, 2016).

Neste trabalho, a atividade leishmanicida da riparina II (IC_{50} 3,60 μ g/mL), um alcalóide do tipo alciamida, observada contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* em comparação com as riparinas I (IC_{50} 6,65 μ g/mL) e III (IC_{50} 6,57 μ g/mL), apresentou melhor resultado. Todas as três riparinas apresentaram atividade leishmanicida, esses resultados corroboram com o ensaio realizado com o alcalóide cefaelina, isolado de *Psychotria klugii*, que demonstrou atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. donovani*, com uma IC_{50} de 0,03 μ g/mL (MUHAMMAD, 2003). Segundo Araújo *et al.* (2016), a riparina A, análogo sintético da riparina III, apresentou uma IC_{50} em 81,8 μ g/mL sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. As IC_{50} das riparinas I, II, e III foram menores do que a descrita para riparina A, portanto, apresentaram melhor atividade leishmanicida frente a *L. amazonensis*.

Nos testes de citotoxicidade sobre células Vero, as riparinas apresentaram CC_{50} de 14,54 μ g/mL. Essa concentração é 4 vezes maior do que a que foi obtida como IC_{50} para as formas promastigotas de *L. amazonensis* (IC_{50} = 3,60 μ g/mL). Estudo realizado por Kagan, *et al.* (2012) analizaram a citotoxicidade da anfotericina B, obtendo resultados que demonstraram uma alta toxicidade contra linhagem de células Vero (CC_{50} = 4,0 μ g/mL). Constatou-se então que, em comparação com a anfotericina B, a riparina II apresenta menor atividade citotóxica contra células animais.

O mecanismo de ação da riparina no relaxamento do músculo liso foi descrito como inibidor de canais de Ca^{2+} e da liberação de Ca^{2+} do estoque intracelular, sendo independente do aumento dos níveis de AMP cíclico (THOMAS *et al.*, 1994). Esse mecanismo de ação sugere

que a atividade leishmanicida da riparina II sobre as formas promastigotas de *L. Amazonensis*, que ocasionou alterações na morfologia e o surgimento de bolhas na membrana plasmática, observado através da microscopia eletrônica de varredura, provavelmente foi em consequência da diminuição da concentração de cálcio intracelular, promovendo alterações do citoesqueleto do parasita. As mesmas alterações foram observadas com a warifiteina, um alcalóide bisbenzilisoquinolínico, sobre a *Leishmania chagasi* (SILVA et al., 2012). Tempone et al., 2009. descreveram a atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi*, de um bloqueador de canais de cálcio, a nimodipina, com alterações semelhantes a encontrada com a riparina II, descrita neste trabalho.

Tem sido descrito a existência de proteínas importantes que estão relacionadas com a virulência de parasitas, sendo expressas em fases infectantes desses microrganismos, e proteínas que têm seus perfis de expressão modificados quando a célula é exposta a estresse (SOARES et al., 2003). Provavelmente, a modificação no perfil proteico da *L. amazonensis*, observada no ensaio de eletroforese de gel de SDS-PAGE deve-se a exposição do parasita ao estresse químico da riparina II. Essas modificações no perfil proteico de *L. amazonensis*, estão relacionadas ao surgimento de duas bandas proteicas, observadas nas amostras dos parasitas cultivados com a riparina II na concentração de 200 μ g/mL, que não foram observadas nas amostras dos parasitas cultivados com riparina II na concentração 3,60 μ g/mL (IC₅₀) e no controle negativo. Essas bandas estão localizadas abaixo do peso molecular de 96KDa e o de 66KDa.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que todas as três riparinas testadas possuem atividade leishmanicida contra o parasita *Leishmania amazonensis*, entretanto, a riparina II apresentou melhor atividade leishmanicida, além de apresentar abaixa atividade citotóxica frente a célula Vero, uma linhagem não cancerígena. Dessa forma, a riparina II pode ser classificada como um alcalóide promissor no combate ao parasita causador da Leishmaniose Tegumentar Americana, colocando-se como uma fármaco promissor para estudos mais detalhados sobre seu mecanismo de ação e potencialidades em estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais Brasileiras. Ed. Hemus, SP, Brasil, p. 341, 1993.
- ALMEIDA, O.L.S; SANTOS, J.B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 497-506; 2011.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. Rev. Virtual Quim., v.5, n.3, p. 450-513; 2013.
- ARAUJO, E.J.F. et al. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkamides from *Aniba riparia* (Lauraceae). Acta Amzon. v. 46, n.3, p. 309-314; 2016.
- ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. F.; PIMENTA, F.P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. Revista Fitos, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 1-72; 2015.
- BARBOSA, T. P. Síntese de novos adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: hibridação molecular como ferramenta para obtenção de drogas leishmanicidas. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 129 f.; 2010.
- BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Benzoul esters and amides, styrylpyrone and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. Phytochemistry. v. 26, p. 2615; 1987.
- BARBOSA-FILHO JM, YOSHIDA M, GOTTLIEB OR. The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products. Latinoamr. Quim. v. 21, p. 5-7; 1990.
- BOCHNER, R. et al. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no mercado de madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. Revista Bras, Pl. Med., v. 14, n. 3, p. 537-547; 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Brasília, DF; 2006a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC). Relatório de Recomendação. Miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar; 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 136 p; 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso

eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 189 p.; 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1 ed., 5a reimpressão. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de informação epidemiológicas e mortalidade. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>. Acesso em 18 jan. 2018.

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

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 1. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu (Paraná): a visão dos profissionais de saúde. Ciência e Saúde coletiva, v. 17, n. 10, p. 2.675-2.685; 2012.

CABEZAS Y. et al. Leishmania cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. Org Biomol Chem, v. 13, n. 31, p. 8393–8404; 2015.

CARVALHO et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. Chemico-Biological Interactions, v. 205, p. 165–172; 2013.

CARVALHO, A.S.; DUARTE, S.L.; COSTA, J.C.S.; BOECHAT, N. Um Novo Processo para a Obtenção do Antimoniato de Meglumina, Visando a Produção do Medicamento Genérico. Revista Virtual de Química, v. 7, n. 2; 2015.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Sthaphylococcus aureus* e *Encherichia coli* multirresistentes. RBAC. v. 37, n. 4, p. 247-249; 2005.

COSTA, L.M et al. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. Journal of Applied Microbiology; 2016.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v.1830, n. 6, p. 3670-3695; 2013.

CRAGG, G.M; GROTHAUS, P.G., NEWMAN, D.J. New horizons for old drugs and drug leads. Journal of Natural Products. Cincinnati, v. 77, p. 703-723; 2014.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd ed; 2009.

- DORLO, T.P.C. et al. Pharmacokinetics of Miltefosine in Old World Cutaneous Leishmaniasis Patients. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, v. 52, n. 8, p. 2855–2860; 2008.
- DUTRA, R.C.; et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112; 2016.
- FERREIRA, C. et al. Leishmanicidal activity of the alkaloid-rich fraction from Guatteria latifolia. *Exp. Parasitol.* v. 156, p. 51-60; 2017.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 19 jan. 2018
- FRANCESCHINI FILHO, S. Plantas terapêuticas. São Paulo: Editora Organizações Andrei; 2004.
- GIL, E.S.; PAULA, J.R.; NASCIMENTO, F.R.F.; BEZERRA, J.C.B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Ver, Ciênc, Farm. Básica.* v. 29, n.3, p. 223-230; 2008.
- GOMES, C. B. et al. Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: first evidence of modulation during morphological transition. *Biochimie.* v. 133, p. 28-36; 2017.
- GONTIJO, B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71–80; 2003.
- GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Intern J Parasitol*, Liverpool, v.33, n.10, p.1027-1034; 2003.
- GRIMALDI, J.R.G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 6, p. 230–250; 1993.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the hort macrophage. *Trends Parasitol*, v. 18, p. 332 – 334; 2002.
- KAGAN, S. et al. Toxicity Mechanisms of Amphotericin B and Its Neutralization by Conjugation with Arabinogalactan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.56, n.11, p. 5603-5611. 2012.
- KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. *Journal of Parasitology Research*, v. 2014; 2014.
- LEISHMAN, W.B. (1903). On the possibility of the occurrens of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal*, v.1, p. 1252-1254; 1903.
- LIMA, G.R. Proposta de resolução específica para manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos. (Monografia de Especialização). Brasília (DF), Universidade de Brasília. 2006.

MELO, C. T. V. et al. Estudo da atividade antidepressiva de riparina I, riparina II e riparina III de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) em camundongos. In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2005.

MELO, C.T.V. Anxiolytic-like effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in mice. *Biol. Pharm. Bull.* v. 29, n.3, p. 451-454; 2006.

MENDONÇA, D. V. C. et al. Comparing the therapeutic efficacy of different amphotericin B-carrying delivery systems against visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 186, p. 24-35; 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Jornal Immunol Methods*. v.55, p.55-63. 1983.

MUHAMMAD, I. et al. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. ACS Publications. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 962-967; 2003.

NANARI-VANANI, R. et al. Investigation of anti-leishmanial efficacy of miltefosine and ketoconazole loaded on nanosomes. *Acta Tropica*, v. 185, p. 69-76, 1018.

NASCIMENTO, O.A. et al. Pharmacological properties of riparin IV in models of pain and inflammation. *Molecules*. v. 21, p. 1757; 2016.

NEVES, D.P.; MELO, A. L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana*, 11^a ed. São Paulo: Atheneu, p. 47; 2005.

PARIS, C; LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Miltefosine induced apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 852; 2004.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 11, n. 12; 2017.

RATH, S. et al. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: state of the art. *Quim. Nova*, v. 26, n. 4, p. 550-555; 2003.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 74, n. 1, p. 81-96; 2006.

SCHUMAN, M.C.; et al. How does plant chemical diversity contribute to biodiversity at higher trophic levels? *Current Opinion in Insect Science*, Amsterdam, v. 14, p. 46-55; 2016.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 471-478; 1994.

SILVA, et al. Antileishmanial Activity of Warifteine: A Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from *Cissampelospermum podialis* Eichl. (Menispermaceae). *The Scientific World Journal*. 2012.

SILVA, T.F.; OLIVEIRA, A.B. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão. Revista Fitos, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p. 220-372; 2016.

SILVEIRA, P.F; BANDEIRA, M.A.E; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.4, p. 618-626; 2008.

SOARES, R. M. A. et al. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. Experimental Parasitology. v.104, p. 104–112; 2003.

SOUSA, C.T.V. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. Pharmacology, Biochemistry and Behavior v.78, p.27; 2004.

SOUSA, F.C.F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 4, p. 642-654; 2008.

SOUZA, W. Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências e tecnologia para o desenvolvimento nacional. Estudos estratégicos, 56p; 2010.

TEMPONE, A. G.;TANIWAKI, N. N.; REIMÃO, J. Q. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania* (L.) chagasi treated with the calcium channel blocker nimodipine. Parasitol Res. V. 105, p. 499-505. 2009.

THOMAS G. L.; BRANCO U. J.; BARBOSA FILHO J. M.; BACHELET M.; VARGAFTIG B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl)tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. J Pharm Pharmacol. v. 46, n. 2, p. 103-107. 1994.

VALE, E.C.S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisao historica da origem, expansao e etiologia. An Bras Dermatol, v. 80, n. 4, p. 421-428; 2005.

VIEIRA-GONÇALVES R. et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia) braziliensis in Paraty, Rio de Janeiro. Int J Dermatol, v. 47, p. 926-932; 2008.

WHO. Controlo f Neglected Tropical Deseases (NTD). Status of endemicity of cutaneus leishmaniasis worlwide, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis>. Acesso em: 17 jan. 2018.