

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM SAÚDE E AMBIENTE**

JEAMILE LIMA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES
VEGETAIS**

**SÃO LUÍS - MA
2006**

JEAMILE LIMA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES
VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do
Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em
Saúde e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa
Ribeiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel
Fernandes do Nascimento

SÃO LUÍS -MA
2006

Bezerra, Jeamile Lima

Avaliação da atividade leishmanicida de espécies vegetais/
Jeamile Lima Bezerra. – São Luís, 2006.

64p.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade
Federal do Maranhão.

**1. Plantas medicinais. 2. Plantas anti-*leishmania*. 3. Atividade
leishmanicida. I. Avaliação da atividade leishmanicida de
espécies vegetais** CDU 582.738: 616.993.161

JEAMILE LIMA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES
VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do
Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em
Saúde e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa
Ribeiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel
Fernandes do Nascimento

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro (Orientadora) - UFMA
Doutora em Química Orgânica

Profa. Dra. Flávia Raquel F. do Nascimento (Co-Orientadora) - UFMA
Doutora em Imunologia

Profa. Dra. Maria Celia Pires Costa - UEMA
Doutora em Físico-Química

Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo - UFPB
Doutor em Química Analítica

SÃO LUÍS – MA
2006

Ao Meu ESPOSO ROBERTO R.
VELOSO Jr., por seu amor, conselhos,
dedicação, incentivo e companheirismo em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelas melhores dádivas da vida; pela minha existência e formação; pelo amor de minha família; pela concretização de mais uma etapa de vida.

À toda a MINHA FAMÍLIA, principalmente meu pai BOSCO e minha mãe ALICE, pelos valores morais e éticos que norteiam minha vida e pelo apoio mesmo de longe durante mais essa jornada.

À Profa. Dra. MARIA NILCE DE SOUSA RIBEIRO pela orientação, dedicação, amizade e competência ao longo deste trabalho. Agradeço por me ensinar a ser uma profissional melhor e pelas valiosas lições de vida.

À Profa. Dra. FLÁVIA RAQUEL FERNANDES DO NASCIMENTO pelo auxílio na orientação, pela amizade e competência. Agradeço pelo apoio e dedicação neste trabalho.

À Profa. Dra. ROSANE NASSAR MEIRELES GUERRA pela colaboração no desenvolvimento dos ensaios biológicos.

Ao CNPq pelos recursos financeiros através do projeto “Eco-epidemiologia de doenças tropicais: Leishmaniose no alto curso do Rio Pindaré, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense”, Proc. CNPq nº 550433/2001-5 e ao Coordenador do projeto, Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo, pelos ensinamentos e apoio no trabalho desenvolvido.

À Profa. Dra. ALDINA BARRAL do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA por fornecer as cepas de *Leishmania amazonensis* utilizadas na pesquisa.

À todos do LABORATÓRIO DE FARMACOGNOSIA/UFMA, aos meus colegas de bancada pelo apoio e incentivo no trabalho, em especial ao mestrando RICHARD PEREIRA DUTRA e a farmacêutica IZABELLA CRISTINA S. CARVALHO.

À todos do LABORATÓRIO DE IMUNOFISIOLOGIA/UFMA, em especial ao graduando, bolsista de Iniciação Científica GRACIOMAR COSTA, pela responsabilidade, paciência e dedicação aos ensaios biológicos, demonstrando desde já, virtudes de um grande pesquisador e as mestrandas LUCILENE e MÁRCIA, pela amizade, ensinamentos e apoio.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de Mestrado concedida.

À todos os Professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Saúde e Ambiente que contribuíram para a minha formação profissional e engrandecimento pessoal.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	09
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1.	Objetivo geral	15
2.2.	Objetivos específicos.....	15
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1	1º ARTIGO	
	Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de plantas medicinais.....	17
3.2	2º ARTIGO	
	Atividade anti- <i>Leishmania</i> das frações obtidas do Extrato hidroalcoólico de <i>Tephrosia cinerea</i> (L) Pers.	35
4.	CONCLUSÕES.....	53
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6.	REFERÊNCIAS.....	55
7.	ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT), doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é ainda um dos maiores problemas de saúde pública afetando cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, com o registro de 1-2 milhões de novos casos anualmente. De todos os casos de LT, 90% ocorrem no Brasil, Peru, Afeganistão, Algéria, Arábia Saudita, Síria e Irã (Neves, 1998; WHO, 2002; Gontijo; Carvalho, 2003; Dujardin, 2006).

No Brasil, a leishmaniose é uma antropozoonose emergente devido principalmente às mudanças ocorridas na cadeia epidemiológica, incluindo alterações nos reservatórios, vetores e hospedeiros, em decorrência das condições sociais, econômicas e culturais da população. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem sido apontada em praticamente todos os estados brasileiros com aumento progressivo de casos nos últimos anos, registrando-se surtos nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. No período de 1994 a 1998 a região Nordeste do Brasil apresentou um aumento no número de municípios atingidos pela LTA e no Maranhão este crescimento foi de 39% no período estudado, registrando casos em 88,5% dos municípios, com coeficiente de detecção em 1999 de 55,72/100.000 habitantes e com uma média de 2.055 pacientes/ano. Em 2004 e 2005, o Maranhão apresentou o maior número de notificações de LTA no Nordeste registrando 3.123 e 3.326 casos, respectivamente. Dentre os municípios maranhenses um dos mais afetados é Buriticupu, situado na Amazônia do Maranhão distando 450 km de São Luís que, em 2004 e 2005, apresentou o maior número de registros com percentual de 5,68 e 6,13% do total de casos de LTA do estado, respectivamente (Ministério da Saúde, 2000; Rebêlo et al., 2000 a,b; Rebêlo et al., 2001 a,b; Brasil, 2006; SINAN, 2006).

As espécies de *Leishmania* induzem grande variedade de manifestações clínicas a depender da interação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenicidade do parasito (Almeida et al., 2003).

A LTA apresenta-se sob três formas clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD).

Na LC, as lesões de pele podem ser caracterizadas na forma localizada (única ou múltipla) sendo que, na maioria dos casos, a doença apresenta-se como uma lesão única ulcerada (Neves, 1998).

Na LCM, as infecções podem comprometer o trato respiratório ou digestivo alto, atingindo o nariz, nasofaringe, cavidade oral e laringe. As lesões da mucosa nasal iniciam-se por ulcerações do septo nasal, com grande potencial destrutivo e mutilante (Ministério da Saúde, 2000).

Entre as formas menos comuns da LTA, a LCD caracteriza-se por lesões nodulares e infiltrações cutâneas, que em geral não cicatrizam e são classicamente rebeldes ao tratamento medicamentoso, pela natureza crônica e por um estado de anergia seletiva da imunidade celular. *Leishmania amazonensis* é a espécie determinante da LCD, estando associada a outras manifestações clínicas incluindo LC, LCM, leishmaniose visceral e tegumentar pós-calazar (Barral et al, 1991; Aleixo et al, 2006).

Além da espécie *L. amazonensis*, foram identificados no Brasil, como causadoras de LTA humana, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania shawi* e *Leishmania lainsoni* (Neves, 1998; Ministério da Saúde, 2000). A LTA é transmitida habitualmente através da picada de insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* (Neves, 1998). O principal vetor de *L. amazonensis* é *Lutzomyia flaviscutellata*, espécie silvestre encontrada principalmente em florestas primárias e

secundárias, pouco antropofílica e de hábitos noturnos. Estudo realizado sobre a presença de flebotomíneos na Ilha de São Luís, evidenciou a presença dessa espécie nos ambientes de mata, peridomicílio e intradomicílio (Rebêlo et al. 1999).

A transmissão ocorre quando o flebotomíneo ao exercer o repasto sanguíneo, introduz no local da picada formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp.. Dentro de 4 a 8 horas estas são interiorizadas por macrófagos teciduais, diferenciando-se em formas amastigotas que irão se multiplicar por divisão binária. Os macrófagos então se rompem iniciando assim uma reação inflamatória no local. O período decorrido entre a picada do inseto e o aparecimento da primeira lesão varia de duas semanas a três meses (Neves, 1998).

O tratamento da leishmaniose é feito principalmente com medicamentos à base de antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), introduzidos como quimioterápicos na década de 40, enquanto anfotericina B e pentamidina são as de segunda escolha na terapêutica. Contudo, a utilização destas drogas é questionável em virtude da eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, o alto custo, a via de administração parenteral e a elevada toxicidade com efeitos adversos como mialgias, nefrites, alterações hepáticas, distúrbios gastrintestinais, respiratórios, cardiovasculares e até arritmias fatais e morte súbita (Croft; Coombs 2003; Paula et al., 2003; Rath et al., 2003; Ouellette et al., 2004; Oliveira et al., 2005). Além disso, há relatos de resistência dos parasitos devido a baixas dosagens e tratamentos descontínuos. Como alternativa mais recente, o miltefosine tem sido usado no tratamento da leishmaniose visceral causada por *L. donovani* com a vantagem da administração oral. Contudo, no tratamento de LTA por *L. brasiliensis*, não houve boa eficácia, ainda necessitando de estudos adicionais em relação às demais espécies de *Leishmania* (Soto et al., 2004).

A OMS tem estimulado pesquisas com drogas alternativas em virtude principalmente do aumento do número de co-infecção de LTA e AIDS, já que os imunodeprimidos não respondem bem ao tratamento convencional (WHO, 2002).

Inúmeros compostos naturais isolados de plantas tiveram e continuam tendo um grande impacto na sobrevida e no tratamento de várias enfermidades humanas. Além disso, as plantas são importantes fontes de substâncias, muitas das quais se constituem em matérias-primas ou protótipos para síntese de novos fármacos. Os compostos ativos dotados de atividade terapêutica são em geral metabólitos secundários, tais como flavonóides, alcalóides, taninos, terpenos entre outros, produzidos nas espécies (Rates, 2000; Simões et al., 2003). Estima-se que 40% dos medicamentos comercializados são desenvolvidos de fontes naturais, sendo 25% oriundos de espécies vegetais (Cragg et al., 1997). Aproximadamente 60% das drogas anti-tumorais, antiparasitárias, antibacterianas e antivirais comercializadas ou na fase dos testes clínicos são de origem natural (Shu, 1998). Apesar dos estudos já realizados, dados mostram que somente 15 a 17% da vasta diversidade florística, estimada em torno de 250 mil espécies no mundo, foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Soejarto, 1996).

A necessidade de identificar novos compostos anti-*Leishmania* mais eficazes e menos tóxicos em relação às drogas convencionais tem movido pesquisas na busca de produtos naturais isolados de espécies vegetais. Substâncias predominantemente das classes dos alcalóides, terpenos, flavonóides, benzopiranos, compostos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas, vem sendo identificadas nas espécies vegetais com atividade anti-leishmanial (Iwu et al., 1994; Carvalho; Ferreira, 2001; Rocha et al., 2005). Em virtude da facilidade de manutenção e produção, cultura de formas promastigotas de *Leishmania* spp. tem sido muito empregada na triagem desses compostos naturais (Fumarola et al., 2004).

Pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de averiguar a atividade leishmanicida de extratos e/ou constituintes de plantas. Quarenta e três espécies vegetais, selecionadas pelo uso na medicina tradicional ou pela relação quimiotaxonômica com outras espécies ativas para *Leishmania*, tiveram seus extratos metanólicos e aquosos testados. Destes, oito apresentaram valor de CI_{50} menor que $10\mu\text{g/mL}$ para formas promastigotas de *L. donovani* (Camacho et al, 2003).

Trinta um extratos de treze plantas medicinais do Cerrado Brasileiro foram avaliados para atividade contra promastigotas de *Leishmania donovani*. Quinze extratos mostraram-se ativos, destacando a espécie *Casearia sylvestris* var. *língua* que exibiu CI_{50} de $0,1\mu\text{g/mL}$ (Mesquita et al., 2005).

Ensaio biológico para atividade antiprotozoária de extratos etanólicos de espécies vegetais do Brasil foram realizados demonstrando maior atividade para *Nectandra falcifolia* Nees com CI_{50} de $138,5\mu\text{g/mL}$ (Truiti et al., 2005).

Da casca do caule de *Machaerium multiflorum* Spruce, espécie amazônica, foram isolados cinco substâncias hexahidrodibenzopiranos, entre as quais o machaeridiol B que demonstrou atividade para formas promastigotas de *Leishmania donovani* com CI_{50} de $0,9\mu\text{g/mL}$ (Muhammad et al, 2003).

Um novo alquil fenol isolado de *Oxalis erythrorhiza*, demonstrou inibir em 100% as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani* à concentração de $100\mu\text{g/mL}$ (Feresin et al, 2003).

As raízes de *Jatropha grossidentata*, conhecida como pião, apresentaram significativa atividade às formas promastigotas de *Leishmania*. Os diterpenos jatrogrossidiona e jatrofona foram responsáveis pela atividade com CI_{100} de $0,75\mu\text{g/mL}$ e $5\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ressalta-

se que *Jatropha gossypifolia*, o nosso pião-roxo, muito difundido no Maranhão, apresenta em sua composição esses dois diterpenos (Schmeda-Hirschmann, 1996).

O extrato bruto e as frações obtidas de folhas de *Piper regnellii*, gênero comum do Norte e Nordeste brasileiro, foram avaliados sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, exibindo a fração hexânica como a de melhor atividade anti-leishmanial com CI_{50} de 21,5 $\mu\text{g/mL}$ (Nakamura et al., 2006).

Moreira et al., (1998) ao realizar levantamento sobre a utilização de plantas no tratamento de feridas leishmanióticas no município de Buriticupu-MA, evidenciaram maior uso das espécies *Anacardium occidentale* (caju), *Stachytarpheta cayennensis* (gervão), *Allium sativum* (alho), *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e *Copaifera* ssp.(copaíba). Estudos da atividade anti-leishmanial do extrato alcoólico das folhas de gervão demonstraram a ação leishmanicida desta espécie nas concentrações de 500 e 1000 μg (Moreira et al., no prelo).

Considerando a toxicidade, resistência e eficácia variável do arsenal terapêutico atual, a endemicidade das leishmanioses no Estado do Maranhão e a diversidade da flora no Brasil, estudos químico-biológicos de espécies vegetais tornam-se essenciais para a descoberta de novas substâncias naturais com atividade anti-*Leishmania*. Assim, propomos estudos das espécies norteados por levantamentos etnobotânicos e dados quimiotaxonômicos na busca de selecionar espécies para esses estudos com ação leishmanial, que possam ser aproveitadas para o possível uso no tratamento das leishmanioses.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*Leishmania*, *in vitro*, de extratos de espécies vegetais cultivadas no Maranhão e selecionar extratos para a realização do fracionamento biomonitorado, na busca de frações e/ou substâncias bioativas, que possam ser utilizados na produção de fármacos para tratamento das leishmanioses.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contribuir com informações científicas sobre espécies vegetais que possam indicar novas drogas antileishmaniais.
- Buscar as frações e/ou princípios ativos do extrato hidroalcoólico de *Tephrosia cinerea* (L.) Pers.
- Contribuir na elaboração de monografias de espécies vegetais com atividade anti-*Leishmania*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1º ARTIGO:

Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais

Jeamile L. Bezerra, Graciomar C. Costa, Thaianá C. Lopes, Izabelle C.D.S. Carvalho, Fernando J. Patrício, Sanara M. Sousa, Flávia M.M. Amaral, José Manuel M. Rebêlo, Rosane N.M. Guerra, Maria Nilce S. Ribeiro, Flávia R.F. Nascimento.

2º ARTIGO:

Atividade anti-*Leishmania* das frações obtidas do Extrato hidroalcoólico de *Tephrosia cinerea* (L) Pers.

Jeamile L. Bezerra, Graciomar C. Costa, José Manuel M. Rebêlo, Rosane N.M. Guerra, Flávia R.F. Nascimento, Maria Nilce S. Ribeiro.

Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais

Jeamile L. Bezerra¹, Graciomar C. Costa², Thaiana C. Lopes², Izabelle C.D.S. Carvalho¹,
Fernando J. Patrício², Sanara M. Sousa², Flávia M.M. Amaral², José Manuel M. Rebelo³, Rosane
N.M. Guerra², Maria Nilce S. Ribeiro¹, Flávia R.F. Nascimento^{2*}.

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão,
Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, São Luís, Maranhão – Brasil, 65085-580.

²Laboratório de Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão,
Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, São Luís, Maranhão – Brasil, 65085-580.

³Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Biologia, Praça da Madre Deus, 2, São
Luís, Maranhão – Brasil, 65025-580

***E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br** Tel 55 98 21098548

RESUMO: Na busca de novos agentes leishmanicidas, avaliamos em culturas de promastigotas de *Leishmania amazonensis* o efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. (Fabaceae), *Dichorisandra* sp. (Commelinaceae), *Syzygium jambolanum* DC. (Myrtaceae), *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* (Euphorbiaceae), *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae), *Cecropia* sp. (Cecropiaceae), *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit (Euphorbiaceae), *Peristrophe angustifolia* Nees (Acanthaceae) e o extrato aquoso do mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart. (Arecaceae). As promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram cultivadas em presença de 31,3; 63,5; 125,0; 250,0 e 500,0 µg/mL dos extratos por 24 horas. Ao final desse período foi calculada a concentração inibitória do crescimento (CI₅₀) em relação às culturas não tratadas com os extratos. Os extratos das espécies *J. triqueter*, *Dichorisandra* sp. e *T. cinerea* apresentaram maior eficácia em induzir a morte das promastigotas, com CI₅₀ de 29,5; 32,9 e 43,6 µg/mL, respectivamente. *P. edulis*, *C. ambrosioides* e *S. jambolanum* apresentaram eficácia moderada com CI₅₀ de 150,1; 151,9 e 166,6 µg/mL, respectivamente. *P. tithymaloides* e *O. phalerata* apresentaram baixo efeito leishmanicida com CI₅₀ >500 µg/mL, enquanto *Peristrophe angustifolia* e *Cecropia* sp. não apresentaram efeito. Dessa forma, dos dez extratos testados, três apresentaram uma expressiva atividade leishmanicida *in vitro*.

Unitermos: *Leishmania amazonensis*, atividade leishmanicida, plantas medicinais.

ABSTRACT: Evaluation of the *in vitro* leishmanicidal activity of medicinal plants. In search of new leishmanicidal agents, promastigotes forms of *L. amazonensis* were cultured with the hydroalcoholic extracts obtained from the leaves of *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. (Fabaceae), *Dichorisandra* sp. (Commelinaceae), *Syzygium jambolanum* DC. (Myrtaceae), *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* (Euphorbiaceae), *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae), *Cecropia* sp. (Cecropiaceae), *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit (Euphorbiaceae), *Peristrophe angustifolia* Nees (Acanthaceae) species and the aqueous extract obtained from the mesocarp flour of *Orbignya phalerata* Mart. (Arecaceae). The *in vitro* assay was performed with promastigotes incubated during 24 hours with 31.3, 62.5, 125.0, 250.0 e 500.0 $\mu\text{g/mL}$ of each extract. Then the inhibitory concentration of the parasite growth (IC_{50}) was determined. The effectiveness of *J. triqueter*, *Dichorisandra* sp. and *T. cinerea* hydroalcoholic extracts to induce promastigotes death was intense since the IC_{50} was 29.5; 32.9 e 43.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. *P. edulis*, *C. ambrosioides* and *S. jambolanum* extracts had moderated effectiveness since the IC_{50} was 150.1; 151.9 and 166.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. *P. tithymaloides* and *O. phalerata* extracts showed a low efficacy in comparison with $\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$. *Peristrophe angustifolia* and *Cecropia* sp. extracts had no leishmanicidal effect. Thus, three from ten extracts tested showed a significant *in vitro* leishmanicidal activity.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, leishmanicidal activity, medicinal plants.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo, que afeta mais de 12 milhões de pessoas mundialmente e apresenta alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina (WHO, 2002, Dujardin, 2006).

No Brasil ocorre em todo o território, tanto a Leishmaniose visceral (LV) como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), as quais são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (Ministério da Saúde, 2000; Rath et al., 2003).

O Estado Maranhão apresenta grande incidência de leishmanioses em 88% de seus municípios, sendo o município de Buriticupu, situado na região pré-amazônica do Estado, o que apresenta os mais altos coeficientes de detecção da LTA (Silva et al., 1979; Costa et al., 1998; Rebêlo et al., 2001 a,b; Rebêlo et al., 2000 a,b; Martins, 2002; Caldas et al., 2002).

O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito (Rath et al., 2003; Croft; Coombs 2003). Novas drogas como miltefosine, um hexadecil-fosfocolina, têm demonstrado serem efetivas para o tratamento de LV, muito embora apresentem também alta toxicidade (Sindermann et al., 2004). A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a adesão ao tratamento. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos (Carvalho; Ferreira, 2001; Paula et al., 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (França et al., 1993; 1996; Mathias; Emily, 1993; Silva et al., 1995; Moreira et al., 2002). Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida e/ou anti-*Leishmania* (Iwu et al., 1994; Queiroz et al., 1996; Torres-Santos, 1999; Kam et al., 1999; Rocha et al., 2005).

Este trabalho avaliou o efeito leishmanicida *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos de folhas das espécies *Tephrosia cinerea* (L.) Pers., *Dichorisandra* sp., *Syzygium jambolanum* D.C., *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter*, *Passiflora edulis* Sims, *Chenopodium ambrosioides* L., *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit., *Peristrophe angustifolia* Nees, *Cecropia* sp. e do extrato aquoso do mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart., em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. (Fabaceae), *Dichorisandra* sp. (Commelinaceae), *Syzygium jambolanum* DC. (Myrtaceae), *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* (Euphorbiaceae), *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae), *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. (Euphorbiaceae), *Peristrophe angustifolia* Nees (Acanthaceae) e *Cecropia* sp. (Cecropiaceae) foram coletadas no Campus da

Universidade Federal do Maranhão (Bacanga/São Luís, MA/Brasil) no período de julho a setembro de 2004.

O pó do mesocarpo de *Orbignya phalerata* Mart. (Arecaceae) foi obtido comercialmente da empresa HENSA FARMA, São Luís, MA, Brasil. Este produto comercial foi previamente submetido a análise de autenticidade, integridade e pureza por testes físico-químicos. O pó comercial apresentou similaridade em todos os aspectos botânicos e fitoquímicos testados quando comparado com o pó de mesocarpo obtido no próprio laboratório (Batista; Ribeiro, 2003). Para identificação botânica os frutos de *O. phalerata* foram coletados em Pedreiras-MA, Brasil.

As identificações botânicas foram realizadas pela Dra. Terezinha de Jesus Almeida Rêgo, no Herbário Ático Seabra, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde as exsiccatas estão depositadas conforme numeração descrita na Tabela 1.

Preparação dos extratos

O pó do mesocarpo de *O. phalerata* (20g), foi macerado em água, filtrado, obtendo-se o extrato aquoso. Os demais extratos foram preparados a partir das folhas. As folhas foram secas em temperatura ambiente e trituradas em moinho. O pó das folhas das espécies *Dichorisandra* sp. (39,2g), *T. cinerea* (480g), *S. jambolanum* (200g), *J. triqueter* (398,6g), *P. edulis* (100g), *C. ambrosioides* (200g), e *Cecropia* sp (200g), *P. tithymaloides* (74,8g), *P. angustifolia* (127g) foram então extraídas, exaustivamente, por maceração com etanol a 70%. As soluções extrativas foram submetidas à filtração e, em seguida, concentradas em rotoevaporador à pressão reduzida. Os resíduos secos foram diluídos em solução tamponada de fosfato (PBS pH 7,2) a uma concentração final de 1mg/mL.

Atividade leishmanicida *in vitro*

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/90/BA125) foram cedidas pela Dra Aldina Barral do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPQGM), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador-BA.

As culturas de promastigotas foram mantidas a 26°C em meio NNN enriquecido com RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado a 10% (SIGMA), L-glutamina 2mM (GIBCO) e os antibióticos penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (SIGMA). Antes de cada experimento observou-se ao microscópio a motilidade flagelar dos parasitos.

Para os ensaios, o extrato previamente obtido foi diluído cinco vezes em meio Schneider completo, obtendo-se a concentração de 1mg/mL. Deste, foram retirados 100µL os quais foram diluídos seriadamente, em placas de 96 poços de fundo chato (Costar), na proporção de 1:2 em meio RPMI completo, resultando nas concentrações finais de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL.

Em cada poço foram, então, adicionados 10µL da suspensão contendo 5×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* por mL. Glucantime®, droga de referência no tratamento das leishmanioses, foi utilizado nas mesmas concentrações dos extratos. Como controle foram utilizadas as formas promastigotas cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado.

A atividade leishmanicida dos extratos foi avaliada pela inibição do crescimento de formas promastigotas após 24h de incubação a 26°C, pela contagem do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar, utilizando-se câmara de Neubauer e microscópio ótico de luz comum. A contagem foi comparada com o controle do crescimento das formas promastigotas sem os extratos. Cada concentração dos extratos foi analisada em triplicata. Os resultados foram expressos como concentração inibitória do

crescimento parasitário (CI₅₀), baseado em Schmeda-Hirschman et al., (1996) e Camacho et al., (2003).

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez. Os resultados foram expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (CI₅₀), calculados por regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos compostos químicos, isolados de extratos vegetais, têm comprovada atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* em ensaios *in vitro*. Já foi relatada a atividade leishmanicida de terpenóides (Sauvain et al., 1996; Camacho et al., 2000), aminoglicosteróides e aminosteróides (Kam et al., 1997), naftoquinonas (Fournet et al., 1992; Kayser et al., 2000), chalconas (Chen et al., 1993; Boeck et al., 2006), glicosídeos iridóides (Mittal et al., 1998), flavonóides (Araújo et al., 1998), neolignananas (Barata et al., 2000) e de alcalóides (Mahiou et al., 1994; Fournet et al., 1996; Queiroz, et al., 1996). Apesar dos vários estudos nesta área, ainda existem muitas espécies vegetais com potencial atividade leishmanicida a serem avaliadas.

Neste trabalho foi avaliado o efeito leishmanicida de dez extratos de plantas de diferentes famílias. A escolha das espécies nesse estudo foi baseada na quimiosistemática dos gêneros, no uso popular no tratamento de úlceras e na disponibilidade local.

A avaliação dos extratos das espécies mostrou que seis deles apresentaram atividade leishmanicida significativa, sendo que três espécies, *J. triqueter*, *Dichorisandra* sp. e *T. cinerea*

apresentaram maior eficácia, com base na CI_{50} (29,5; 32,9 e 43,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) como mostra a Tabela 2. Os extratos de *T. cinerea* e *J. triqueter* var. *triqueter* apresentaram 100% de atividade leishmanicida nas concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$, e *Dichorisandra* sp. apresentou 100% de atividade na maior concentração testada.

Julocroton triqueter var. *triqueter*, a espécie mais efetiva, é conhecida popularmente como velame, sendo encontrada desde a região Norte até a região Sudeste do Brasil. O pó das suas folhas é usado no tratamento de úlceras, sífilis e como depurativo (Pio Corrêa, 1984), porém, há poucos estudos farmacológicos e/ou químicos sobre essa espécie, muito embora já tenham sido identificados alcalóides no gênero *Julocroton* (Suarez et al., 2004).

Dichorisandra sp., a segunda espécie mais eficaz, é popularmente conhecida como penicilina sendo indicada popularmente para tratar infecções. Martinez et al. (1993) relataram a presença de glicosídeos de apigenina, luteolina, quercetina, 6-hidroxluteolina e tricina em três espécies do gênero *Dichorisandra*. Mittra et al. (2000) demonstraram efeito inibitório *in vitro* dos flavonóides luteolina e quercetina sobre o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani*, uma das espécies responsáveis pela leishmaniose visceral. Esses autores também demonstraram que o tratamento *in vivo*, por via oral, com essas substâncias, causou uma significativa redução da carga parasitária em baços de hamsteres infectados com *L. donovani*.

As folhas de *Tephrosia cinerea* (L.) Pers., conhecida como anil bravo, são utilizadas pela população para tratar infecções, inflamações, úlceras, afecções nervosas e diarreias (Pio Corrêa, 1994). Sharma et al. (2003) demonstraram a ação anti-leishmanial do extrato metanólico das folhas de *T. purpurea*, uma espécie medicinal indiana, frente à espécie *Leishmania donovani*.

Os extratos de *P. edulis*, *C. ambrosioides* e *S. jambolanum* apresentaram atividade leishmanicida menor que os outros três extratos citados anteriormente, com CI_{50} de 150,1; 151,9 e 166,6 μ g/mL, respectivamente (Tabela 2). O extrato de *P. edulis* apesar de ocasionar 100% de inibição no crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na maior dose testada, apresentou CI_{50} similar à detectada nos extratos de *C. ambrosioides* e *S. jambolanum*, que apresentaram respectivamente 63,6% e 88% de inibição da *Leishmania amazonensis* na maior dose testada.

Chenopodium ambrosioides conhecido vulgarmente como mastruz, tem sido usado no nordeste brasileiro no tratamento de helmintíases, bronquite, tuberculose, contusões, fraturas e feridas (França et al., 1996; Rêgo, 1995; Matos, 2000). A ação anti-helmíntica da planta foi associada ao alto teor de ascaridol, presente no óleo essencial das folhas (Sousa et al., 1991). Moreira et al. (1998), ao estudarem o conhecimento e usos de terapias alternativas para Leishmaniose Tegumentar Americana, em populações no município de Buriticupu, Maranhão, constataram ser comum o uso de plantas sobre as feridas leishmanióticas, dentre as quais se incluem as folhas de mastruz.. O dado obtido aqui pode justificar o uso popular deste vegetal no tratamento das úlceras leishmanióticas.

Passiflora edulis conhecida como maracujá, é tradicionalmente utilizada como calmante, pela população de todos os países ocidentais. É uma espécie cultivada no nordeste brasileiro para aproveitamento industrial do fruto (Matos, 2000). O efeito leishmanicida apresentado por esta espécie pode estar relacionado com a presença dos compostos flavonoídicos e/ou terpenóides evidenciados nas folhas desses vegetais (Dhawan et al, 2004).

Syzygium jambolanum, conhecido vulgarmente como jambolão, apresenta intensa atividade antibacteriana (Loguercio et al., 2005). O extrato das folhas apresentou efeito

leishmanicida moderado, o que poderia ser justificado pela presença de saponinas e taninos condensados e hidrolisáveis nas folhas (Alberton et al., 2001).

O extrato de *Pedilanthus tithymaloides*, cuja CI_{50} foi $>500 \mu\text{g/mL}$, não apresentou atividade leishmanicida tão intensa quanto o extrato de *J. triqueter*, apesar da espécie pertencer à família Euphorbiaceae. Da mesma forma, o extrato de *O. phalerata* apresentou atividade leishmanicida muito baixa ($CI_{50} >500$), mantendo-se na faixa de 20% de morte das promastigotas em todas as concentrações testadas.

Os extratos de *P. angustifolia* e de *Cecropia* sp. não inibiram o crescimento das formas promastigotas, em nenhuma das concentrações testadas, havendo ainda um aumento do número de promastigotas viáveis, no caso do extrato de *Cecropia* sp., caracterizando assim um possível efeito pró-*Leishmania* desse extrato.

De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro relato na literatura no qual os extratos das espécies aqui avaliadas são submetidos a ensaios de atividade leishmanicida. As plantas testadas são comuns no Brasil, algumas nativas, outras introduzidas e já bem aclimatadas, outras cultivadas, portanto, fáceis de serem encontradas, o que nos estimula a continuidade de estudos químicos biomonitorados na busca dos princípios ativos associados à atividade leishmanicida detectada. Esses dados sugerem que tratamentos alternativos podem ser eficientes no controle das leishmanioses.

CONCLUSÃO

Em nossa investigação para atividade leishmanicida com dez plantas encontradas na flora maranhense, três apresentaram uma expressiva atividade *in vitro* para *L. amazonensis*. Esses

resultados indicam a necessidade de estudos futuros para a avaliação do caráter citotóxico dos extratos, da atividade em infecções, *in vivo*, bem como o fracionamento na busca das substâncias responsáveis pela ação leishmanicida encontrada.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro (Proc n° CNPq n° 550433/2001-5 e Proc. n° 620081/2004-0 ACT), pelas bolsas PIBIC para G.C.Costa, I.C.D.S.Carvalho, F.J.Patrício, S.M. Sousa e pela bolsa de Pós-doc de R.N.M.Guerra. À Capes pela bolsa de doutorado de F.M.M Amaral. À FAPEMA pela bolsa de mestrado de J.L. Bezerra. À Dra. Aldina Barral do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA, por fornecer as formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizadas neste estudo. À Profa. Bárbara T. Silva do Departamento de Ciências Fisiológicas/UFMA pela concessão do extrato da espécie *Passiflora edulis*.

REFERÊNCIAS

- Alberton JR, Ribeiro A, Sacramento LVS, Franco SL, Lima MAP 2001. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Rev Bras Farmacogn* 11: 37-50.
- Araújo CAC, Alegrio LV, Leon LL 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* 49:751-754.
- Barata LES, Santos LS, Ferri PH, Phillipson JD, Paine A, Croft SL 2000. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 55:589-595.
- Batista SM, Ribeiro MNS. 2003. Controle de qualidade de *Orbignya phalerata* Mart. In: Seminário de Iniciação Científica, 15. São Luís. *Resumos*. São Luís-MA, p.23.

- Boeck P, Falcão CAB, Leal P C, Yunes RA, Cechinel Filho V, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B. 2006. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic Med Chem* 14: 1538–1545.
- Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A 2002. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in Northeast Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hig* 96:21-28.
- Camacho MR, Phillipson JD, Croft LS, Kirby GC, Warhurst DC, Solis PN 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry* 56:203-210.
- Camacho MR, Phillipson SL, Croft PN, Marshall SJ, Ghazanfar SA 2003. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol* 89: 185-191.
- Carvalho PB, Ferreira EI 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 72: 599-618.
- Chen M, Brogger Christensen S, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG, Kharazmi A 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2550-2556.
- Costa JML, Balby IAT, Rocha EJS, Silva ARS, Rebêlo JMM, Ferreira LA, Gama EA, Branco MRFC, Burattini MN, Soares NJS 1998. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia)-Brasil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 31: 279-288.
- Croft S, Coombs G. 2003. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502–508.
- Dhawan K, Dhawan S, Sharma A 2004. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol* 94: 1-23.
- Dujardin J-C 2006. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol* 22: 4-6

- Fournet A, Barrios AA, Munõz V, Hocquemiller CA 1992. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Annals Trop Med Parasitol* 43: 219-222.
- Fournet A, Ferreira ME, Rojas AA, Torres de OS, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A 1996. *In vitro* efficacy of oral and intralésional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2447-2451.
- França F, Cuba CA, Moreira EA, Almeida M, das Virgens ML, Marsden PD 1993. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentale*) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Brasil Med Trop* 26:151-155.
- França F, Lago EL, Marsden PD 1996. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 29: 229-232.
- Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG 1994. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitol Today* 10: 65-68.
- Kam TS, Sim KM, Koyana T, Toyoshima M, Hayash M, Komiyama K. 1997. Cytotoxic and Leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. *J Nat Prod* 61: 1332-1336.
- Kam TS, Sim KM, Koyano T, Toyoshima M, Komiyama K 1999. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry* 50: 75-79.
- Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H, Croft SL 2000. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 77: 307-314.
- Loguercio AP, Battistin A, Castagna de Vargas A, Niura AH, Witt M 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells) *Ciência Rural*, Santa Maria, 35: 371-376.

- Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A, Rojas de Arias A, Inchausti A, Yaluff G, Fournet A 1994. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *J Nat Prod* 57: 890-895.
- Martins LM. *Ocorrência da leishmaniose tegumentar e sua relação com impactos ambientais em Buriticupu, Amazônia do Maranhão*. Dissertação (Saúde e Ambiente), Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. São Luís. 70p, 2002.
- Matos FJA 2000. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 2ª ed. Fortaleza: IU.
- Martínez MA, Del P, Swain T 1993. *Flavonoids and chemotaxonomy of the Commelinaceae*. *Biochem System Ecol* 13: 391-402.
- Matthias LA, Emily A. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará - Brazil 1993. *J Ethnopharmacol* 40:53-75.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (FUNASA) 2000. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA, MS.
- Mittal N, Gupta N, Saksena S, Goyal N, Roy U, Rastogi A K 1998. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sci* 63: 1823-1834.
- Mittra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal, S, Mukhopadhyay S, Bandypadhyay S, Majumder HK 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase ii-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Molecular Med* 6: 527-541.
- Moreira RCR, Costa JML, Saldanha AC, Silva AR 1998. Projeto Buriticupu Maranhão II. Plantas usadas como terapêutica da leishmaniose tegumentar americana na região de Buriticupu-Maranhão. *Rev Soc Brasil Med Trop* 31(Suplemento I): T248, 126.

- Moreira RCR, Rebêlo JMM, Gama MEA, Costa JML 2002. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pub* 18: 187-195.
- Paula CDR, Sampaio JHD, Cardoso DRC, Sampaio RNR 2003. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Brasil Med Trop* 36:365-371.
- Pio Corrêa P 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, vol. 5. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, Brasil.
- Queiroz EF, Roblot F, Cave A 1996. Pesseoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *J Nat Prod* 59: 438-440.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím Nova* 26: 550-553.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LAA, Silva AR 2000a. Plebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Rev Soc Brasil Med Trop* 33:11-19.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS 2000b. Flebotomíneos da Amazônia Maranhense. IV - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. *Entomol Vect.* 7: 61-72.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LAA, Silva AR 2001a. Flutuações dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de colonização recente do Município de Buriticupu, Amazonia maranhense, Brasil. *Rev Bras Entomol* 45:11-16.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Silva FS, Costa JML 2001b. Sandflies (Diptera, Psychodidae) of the Amazonia of Maranhão.V. Seasonal occurrence ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. *Rev Bras Biol* 61:107-115.

- Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa Filho JM 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12: 514-535.
- Rego TJAS 1995. *Fitogeografia de plantas medicinais do Maranhão*. São Luis:Edufma. 133p.
- Sauvain M, Kunesch N, Poisson J, Gantier J-C, Gayral P, Dedet J-P 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dellineaceae) *Phytother Res* 10:1-4.
- Schmeda-Hirschmann G, Razmilic I, Sauvain M, Moretti C, Munoz V 1996. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentada* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytother Res* 10: 375-378.
- Sharma P, Rastori S, Bahatnager S, Srivastava JK, Dube A, Guru PY, Kulshreshtha DH, Dhawan BN 2003. Antileishmanial action of a plant *Tephrosia purpurea* against experimental visceral leishmaniasis. *Drug Development Res* 60: 285-293.
- Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C, Engel J 2004. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl.)*193: 173-180.
- Silva SAG, Da Costa SS, Mendonça, SCF, Silva EM, Moraes VLG, Rossi-Bergman B 1995. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica* 60: 201-210.
- Silva AR, Martins G; Melo GEN, Araújo P, Mendes MG 1979. Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (Estado do Maranhão), Brasil. *Rev Inst Med Trop* 21: 1-62
- Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA 1991. *Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza:EUFC.
- Suarez AI, Blanco Z, Delle Monache F, Compagnone RS, Arvelo F 2004. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Nat Prod Res* 18: 421-426.

Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Bergmann BR 1999. Selective Effect of 2,6-Dihydroxy-4-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1234–1241.

World Health Organization. 2002. The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>. Consultado em 10/11/05.

**Atividade anti-*Leishmania* das frações obtidas do extrato hidroalcoólico de
Tephrosia cinerea (L.) Pers.**

Jeamile L. Bezerra¹, Graciomar C. Costa², José Manuel M. Rebêlo³, Rosane N.M. Guerra², Flávia
R.F. Nascimento², Maria Nilce S. Ribeiro^{1*}.

¹Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão,
Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, São Luís, Maranhão – Brasil, 65085-580.

²Laboratório de Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão,
Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses s/n, São Luís, Maranhão – Brasil, 65085-580.

³Laboratório de Entomologia e Vetores, Departamento de Biologia, Praça da Madre Deus, 2, São
Luís, Maranhão – Brasil, 65025-580

***E-mail: mnribeiro@ufma.br** Tel 55 98 2109 8592

RESUMO: A atividade anti-*Leishmania* das frações do extrato hidroalcoólico de *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. em concentrações de 500 a 15,62 µg/mL, foram testadas em ensaios *in vitro* utilizando formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A partir da partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico, obteve-se a fração clorofórmica (F-CHCl₃) e a fração acetato de etila (F-AcOEt) que exibiram atividade anti-*leishmania*, com CI₅₀ de 81,59 e 79,97µg/mL, respectivamente. Fracionamento cromatográfico da F-CHCl₃, em sílica gel, originou seis grupos de sub-frações, sendo a sub-fração 7-9 a de maior atividade no ensaio biológico, exibindo ação leishmanicida em todas as concentrações testadas, com CI₅₀ de 10,99µg/mL. Detectou-se por abordagem fitoquímica a presença de flavanóides nesta sub-fração. As demais sub-frações mostraram atividade leishmanial dose-dependente. Do extrato hidroalcoólico e da F-AcOEt separou-se, por precipitação, as substâncias flavanoídicas, TC-1 e TC-5, as quais não apresentaram inibição do crescimento de *L. amazonensis*. Os resultados demonstram que o fracionamento biomonitorado do extrato hidroalcoólico de *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. permitiu encontrar a sub-fração responsável pela atividade anti-*Leishmania* verificada no extrato inicialmente e sugere a realização de estudos em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*, assim como a identificação das substâncias bioativas desta sub-fração.

Unitermos: *Leishmania amazonensis*, atividade leishmanicida, *Tephrosia cinerea*, flavanoides.

ABSTRACT: The anti-*Leishmania* activity of hidroalcoholic extracted fractions from *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. The anti-*Leishmania* activity of hidroalcoholic extracted fractions from *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. in concentrations from 500 to 15,62 µg/mL, were tested in assays using promastigotes forms of *Leishmania amazonensis in vitro*. From the partition liquid-liquid of the hidroalcoholic extract, was obtained the chloroform fraction (F-CHCl₃) and the ethyl-acetate fraction (F-AcOEt) that showed leishmanicid activity, with IC₅₀ of 81,59 and 79,97µg/mL, respectively. The F- CHCl₃ was chromatographed on silica gel, originated six sub-fraction groups, being the subfraction 7-9 the one of grater activity in the biological assay, showing leishmanicid action in all tested concentrations, with IC₅₀ of 10,99µg/mL. Phytochemical screening of this fraction identified flavonoids compounds. The other subfractions showed leishmanicidal doses-dependent activity. Two substances identified as glycosidic flavonoids (TC-1 and TC-5) were isolated, however don't showed inhibition of the *L. amazonensis* growth. The results showed that the bioassay fractionations of the hidroalcoholic extract of *Tephrosia cinerea* (L.) Pers. permitted find a fraction responsible by the anti-*Leishmania* activity verified in the that extract and suggests the accomplishment of studies in infection models *in vitro* and *in vivo* and identification of active principe that sub-fraction.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, leishmanicidal activity, *Tephrosia cinerea*, flavonoids.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que se manifesta sob as formas cutânea, cutânea difusa e mucocutânea (Neves, 1998). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose ocorre em 88 países e está entre as seis doenças parasitárias de maior importância. De todos os casos de Leishmaniose tegumentar, 90% ocorrem no Brasil, Peru, Afeganistão, Algéria, Arábia Saudita, Síria e Irã (WHO, 2002; Dujardin, 2006).

No Nordeste do Brasil, observou-se nos últimos anos, um avanço progressivo no número de casos de LTA, destacando-se o Estado do Maranhão que em 2003 notificou 3988 casos representando o segundo maior registro no país (Brasil, 2005). O aumento de casos de leishmaniose deve-se as modificações ambientais provocadas principalmente pelos desmatamentos, ocorrendo alterações nos reservatórios, vetores e hospedeiros (Ministério da Saúde, 2000).

A LTA está associada a diferentes e múltiplos agentes causais, sendo que *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* são as principais espécies que causam a doença no Brasil (Lainson; Shaw, 1987; Grimaldi Jr. et al., 1989). *Leishmania amazonensis* tem sido associada com manifestações clínicas diferentes, incluindo as formas cutânea, muco-cutânea e cutânea difusa, forma anérgica de difícil tratamento por não responder à terapêutica convencional (Barral et al., 1991; Ministério da Saúde, 2000; Aleixo et al., 2006).

Os quimioterápicos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), enquanto a anfotericina B e pentamidina são os de segunda escolha. Contudo, a utilização destas drogas é questionável em virtude da eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, toxicidade elevada com relatos de óbitos, inconvenientes na administração e por induzirem resistência do parasito

(Croft; Coombs 2003; Paula et al., 2003; Rath et al., 2003; Ouellette et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

Inúmeras investigações são realizadas objetivando encontrar compostos oriundos de plantas medicinais que sejam mais eficazes e menos tóxicos em relação às drogas convencionais. Substâncias predominantemente das classes dos alcalóides, flavanoides, benzopiranos, compostos fenólicos e terpenos vêm sendo identificadas nas espécies vegetais com atividade anti-leishmanial (Fournet et al., 1992; Iwu et al., 1994; Akendengue et al., 1999; Carvalho; Ferreira, 2001; Rocha et al., 2005).

Recentemente, foi demonstrado por nosso grupo que de dez extratos vegetais testados, três apresentaram expressiva atividade anti-leishmanial contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo *Tephrosia cinerea* uma das espécies de maior atividade apresentando Concentração Inibitória 50% de 43,6 µg/mL (Bezerra et al., no prelo).

O gênero *Tephrosia* (Fabaceae), com cerca de 300 espécies, é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais destas, 30 são nativas da América do Sul. A literatura descreve atividades inseticida, pesticida, antihelmíntica, anticancerígena, antiúlcera e anti-*Leishmania* para espécies do gênero (Chang et al., 2000; Sharma et al., 2003; Jang et al., 2003; Bezerra et al., no prelo). Estudos químicos têm identificado isoflavonas, flavonóis, flavonas, chalconas, biflavanoides, pterocarpanos, rotenóides e derivados cumestanos (Tarus et al., 2002; Niassy et al., 2005). Os flavanoides 7-O-metilglabranina e glabranina isolados de *T. madrensis*, *T. viridiflora* e *T. crasifolia*, em concentração de 25µM, apresentaram 70% de inibição no crescimento do vírus da dengue em ensaios *in vitro*. Tefororina A e teforosona isolados de *Tephrosia purpurea* e os flavanoides isoliquiritigenina e α -toxicarol isolados de *T. toxicaria* induziram a ação da enzima quinona redutase, exibindo propriedades preventivas contra iniciação tumoral (Chang et al., 2000; Jang et al., 2003).

Tephrosia cinerea (L.) Pers (*Cracca cinerea* (L.) Morong., *Galega cinerea* L., *Tephrosia littoralis* (Jacq.) Pers.), conhecida popularmente como anil bravo, é um arbusto utilizado na medicina tradicional para infecções, inflamações, úlceras, afecções nervosas e diarreias (Pio Corrêa, 1984). Rosado-Vallado et al. (2000) verificaram a ação do extrato metanólico das folhas de *T. cinerea* em *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*.

Considerando que o extrato hidroalcoólico de *T. cinerea* apresenta atividade anti-leishmanial, o objetivo desse estudo foi o fracionamento biomonitorado do respectivo extrato na busca de frações e/ou compostos responsáveis pela atividade encontrada.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

O material vegetal cultivado no Horto do Herbário Atico Seabra no Campus da Universidade Federal do Maranhão (Bacanga/ São Luís-MA-Brasil), foi coletado em julho de 2004. A identificação foi realizada pela Dra Terezinha Rego, sendo a exsicata depositada no Herbário Ático Seabra (UFMA) sob o número 1256.

Extração e fracionamento

As folhas de *Tephrosia cinerea* (480 g) foram secas em estufa com circulação de ar, temperatura de 40°C durante 96 horas e, após pulverizadas, forneceram um pó (95 g) que foi extraído por maceração com EtOH a 70% por 72h. Da solução extrativa, separou-se um precipitado amarelo (TC-1, 193 mg). A solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, fornecendo 27 g de extrato hidroalcoólico (EHATc). O EHATc (14,3 g) foi submetido a partição com hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se respectivamente as frações hexânica (F-Hex, 961,8 mg), fração clorofórmica (F-CHCl₃, 2,91 g) e

fração acetato de etila (F-AcOEt, 1,26 g). Da F-AcOEt precipitou TC-5 (620 mg). A F-CHCl₃ foi fracionada em coluna cromatográfica de gel de sílica 60, usando como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puro ou como mistura binária em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se 20 sub-frações, que através de análises em CCD, permitiu separar 06 grupos de sub-frações: 1-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-19 e 20 (Fig.1). A sub-fração 7-9 foi submetida a abordagem fitoquímica (fenólicos, flavanoides, antocianinas, leucoantocianos, taninos, antraquinonas, cumarinas, alcalóides, triterpenos e esteróides) (Matos, 1988).

As frações de *T. cinerea* foram diluídas em solução tamponada de fosfato (pH 7,2) a uma concentração de 1mg/mL e estocados a -20°C para a realização dos testes de atividade anti-leishmanial.

Atividade anti-Leishmanicida *in vitro*

A atividade leishmanicida do extrato, frações e precipitados foram avaliadas pela inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/90/BA 125) gentilmente cedidas por Dra. Aldina Barral do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-CPqGM/FIOCRUZ-BA. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider (Sigma) suplementado com soro fetal bovino inativado (Sigma), urina humana estéril, L-glutamina 2mM (Gibco) e antibióticos [100 U/mL penicilina, 100µg/mL de streptomina (Sigma)]. Antes de cada experimento observou-se ao microscópio a motilidade flagelar dos parasitos. As formas promastigotas foram lavadas em salina estéril, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 5x10⁶/mL.

Para os ensaios, extratos, frações e precipitados foram diluídos cinco vezes em meio Schneider completo, obtendo-se a concentração de 1mg/mL. Deste, foram retirados 100µL, os

quais foram diluídos seriadamente, em placas de 96 poços de fundo chato (Costar), na proporção de 1:2 em meio Schneider completo, resultando nas concentrações finais de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. Em cada poço, foram então adicionados 10µL de uma suspensão de formas promastigotas de *L. amazonensis* contendo 5×10^6 células/mL. As mesmas concentrações foram usadas com o Glucantime® que foi utilizado como droga de referência. O controle negativo foi obtido a partir de cultura das formas promastigotas, em meio Schneider completo.

A atividade leishmanicida foi avaliada pela inibição do crescimento de formas promastigotas após 24h de incubação a 26°C, pela contagem do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar, utilizando-se câmara de Neubauer e microscópio ótico de luz comum. A contagem foi comparada com o controle do crescimento das formas promastigotas sem a amostra testada. Os extratos, frações e precipitados foram analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (CI₅₀), baseado em Schmeda-Hirschman et al., (1996) e Camacho et al., (2003).

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez, sendo expressos como concentração inibitória do crescimento parasitário (CI₅₀) calculado por regressão linear. Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. O nível de significância aceito foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Este trabalho buscou avaliar a atividade *in vitro* das frações e substâncias isoladas do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. cinerea* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. As

frações F-AcOEt e F-CHCl₃ apresentaram CI₅₀ de 79,97 µg/mL e 81,59µg/mL respectivamente, não ocorrendo diferença significativa entre as médias obtidas no teste destas frações (Fig. 2). Os 5 grupos de sub-frações (1-6; 7-9; 10-12; 16-19; 20) foram submetidos a testes *in vitro* para atividade anti-*Leishmania* e as CI₅₀ estão descritas na tabela 1. A sub-fração 7-9 demonstrou maior atividade com CI₅₀ de 10,99µg/mL, inibindo totalmente o crescimento de *L. amazonensis* nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62 µg/mL. Todas as sub-frações apresentaram ação inibitória significativa nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL com efeito dose-dependente (Fig.3). Essas sub-frações mostraram-se mais ativas do que a F-CHCl₃, sendo a sub-fração 20 de menor atividade, apresentando CI₅₀ semelhante a do extrato original (43,66 µg/mL). F-Hex e a sub-fração 13-15 não foram testadas em virtude da solubilidade parcial em solução tamponada de fosfato. TC-1 e TC-5 foram inativas nos testes para atividade anti-leishmanial (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Produtos naturais têm um grande potencial na pesquisa de novas drogas para o tratamento de doenças causadas por protozoários e alguns isolados de extratos vegetais, têm comprovada sua atividade leishmanicida em ensaios *in vitro*. Dentre estes, destacam-se os flavanoides, metabólitos secundários importante e diversificado com ampla distribuição no reino vegetal (Wright; Phillipson, 1990). Atividades antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, tripanossomicida e leishmanicida são atribuídas a essa classe de compostos (Chang et al., 2000; Zuanazzi; Montanha, 2003; Tasdemir et al., 2006)

Espécies da família Fabaceae possuem compostos flavanoídicos e tem demonstrado atividade antiprotozoária. Salem; Werbovetz (2005, 2006), isolaram chalconas e isoflavonas dos extratos de *Psorothamnus polydenius* e *Psorothamnus arborescens* que exibiram atividade *in*

in vitro contra amastigotas de *L. donovani*. Precanсона B e dimetilprecanсона B, isoladas do extrato das raízes de *Tephrosia aequilata*, mostraram-se ativas para amastigotas de *L. donovani* com CI₅₀ 17,2 e 9,0µg/mL, e isentas de citotoxicidade para macrófagos. O extrato butanólico das cascas de *Tephrosia purpurea* inibiu, na concentração de 100µg/mL, 62% do desenvolvimento das amastigotas de *L. donovani in vitro*, enquanto a fração 62, isolada deste extrato, mostrou atividade antileishmanial por via oral tanto em hamsteres (50mg/kg) como em macacos infectados (100mg/kg), sem apresentar toxicidade (Sharma et al., 2003).

Neste trabalho, a sub-fração 7-9 exibiu 100% de inibição do crescimento das promastigotas de *L. amazonensis* em todas as concentrações testadas, com CI₅₀ de 10,99µg/mL, sendo possivelmente a fração responsável pela ação encontrada no extrato hidroalcoólico. Segundo Cardona et al., 2006 compostos com CI₅₀ <50 µg/mL são considerados promissores, o que sugere a potencialidade da sub-fração 7-9, isolada do extrato hidroalcoólico de *T. cinerea*. Abordagem fitoquímica dessa sub-fração evidenciou a presença de compostos flavanoídicos, tal como já relatados em outras espécies do gênero *Tephrosia* (Tarus et al., 2002; Niassy et al., 2005).

Observamos que dentre as sub-frações isoladas da F-CHCl₃, depois da 7-9 a atividade leishmanicida diminui a medida que aumenta a polaridade das sub-frações isoladas.

Os resultados demonstram que o fracionamento biomonitorado do extrato hidroalcoólico de *Tephrosia cinerea* (L) Pers permitiu encontrar a sub-fração com atividade inibitória sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Estudos devem ser continuados para avaliar os efeitos dos flavanoides bioativos em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*, assim como a identificação dos princípios ativos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Aldina Barral do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA, por fornecer as formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizadas neste estudo. À Fundação de Amparo de Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de mestrado de J.L. Bezerra. Ao CNPq pelos recursos financeiros (Proc. CNPq nº 550433/2001-5 e Proc nº 620081/2004-0), pelas bolsas de Iniciação Científica para G.C.Costa e pela bolsa de Pós-doc de R.N.M.Guerra.

REFERÊNCIAS

- Akendengue B, Ngou-milama E, Laurens A, Hocquemiller R 1999. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* 6:3-8.
- Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AMO, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SMB 2006. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg* 100:79-82.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM 1991. Leishmaniasis em Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg* 44:536-46.
- Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício, FJ, Sousa SM, Amaral FMM, Rebelo JMM, Guerra RNM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF 2006. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacognosia* (Artigo no prelo).
- Brasil. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação: Maranhão / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

- Camacho MR, Phillipson SL, Croft PN, Marshall SJ, Ghazanfar SA 2003. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol* 89: 185-191.
- Cardona W, Quiñones W, Robledo S, Vélez I D, Murga, J, García-Fortanet J, Carda M, Cardona D, Echeverri F 2006. Antiparasite and antimycobacterial activity of passifloricin analogues. *Tetrahedron* 62: 4086–4092.
- Carvalho PB, Ferreira EI 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 72: 599-618.
- Chang LC, Chavez D, Song LL, Farnsworth NR, Pezzuto JM, Kinghorn D 2000. Absolute configuration of novel bioactive flavonoids from *Tephrosia purpurea*. *Organic letters* 4: 515-518.
- Croft S, Coombs G. 2003. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502–508.
- Dujardin J-C 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol* 22: 4-6
- Fournet A, Barrios AA, Muñoz V, Hocquemiller CA 1992. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Annals Trop Med Parasitol* 43: 219-222.
- Grimaldi Jr. G, Tesh RB e Macmohon-pratt D 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med and Hig* 41:687-725.
- Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG 1994. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitol Today* 10: 65-68.
- Jang DS, Park EJ, Kang YH, Hawthorne ME, Vigo JS, Graham JG, Cabieses F, Fong HHS, Mehta RG, Pezzuto JM, Kinghorn AD 2003. Potencial cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. *J Nat Prod.* 66: 1166-1170.

- Lainson, R.; Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The leishmaniasis. London, N. Y., v.1, p.1-128,1987.
- Matos, FJ de A 1988. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: EUFC, 128p.
- Ministério da Saúde (FUNASA) 2000. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA, MS.
- Neves, DP 1998. *Parasitologia humana*. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 420p.
- Niassy B, Lobstein A, Um BH, Anton R, Koné MMEK 2005. Flavonoids from *Tephrosia deflexa* and *T. albifoliolis* 2005. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 309-312.
- Oliveira MC, Amorim RFB, Freitas RA, Costa ALL 2005. Óbito em caso de leishmaniose cutâneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. *Rev Soc Brasil Med Trop* 38: 258-260.
- Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* 7: 257–266.
- Paula CDR, Sampaio JHD, Cardoso DRC, Sampaio RNR 2003. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metilglucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Brasil Med Trop* 36:365-371.
- Pio Corrêa P 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, vol. 5.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím Nova* 26: 550-553.
- Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa Filho JM 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12: 514-535.
- Rosado-Vallado M, Brito-Loeza W, Mena-Rejón GJ, Quintero-Marmol E, Flores-Guido JS 2000. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. *Fitoterapia* 71: 570-573.

- Salem MM, Werbovetz KA 2005. Antiprotozoal compounds from *Psorothamnus polydenius*. *J Nat Prod.* 68:108-111.
- Salem MM, Werbovetz KA 2006. Isoflavonoids and other compounds from *Psorothamnus arborescens* with antiprotozoal activities. *J Nat Prod.* 69: 43-49.
- Schmeda-Hirschmann G 1996. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytother. Res.* 10: 375.
- Sharma P, Rastori S, Bahatnager S, Srivastava JK, Dube A, Guru PY, Kulshreshtha DH, Dhawan BN 2003. Antileishmanial action of a plant *Tephrosia purpurea* against experimental visceral leishmaniasis. *Drug Development Res* 60: 285-293.
- Tarus PK, Machocho AK, Lang'at-Thoruwa CC, Chhabra SC 2002. Flavonoids from *Tephrosia aequilata*. *Phytochemistry* 60: 375-379.
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1352-1364.
- World Health Organization. 2002. The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>. Consultado em 10/11/05.
- Wright CW, Phillipson JD 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 4: 127-139.
- Zuanazzi JAS, Montanha JA 2003. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.577-614.

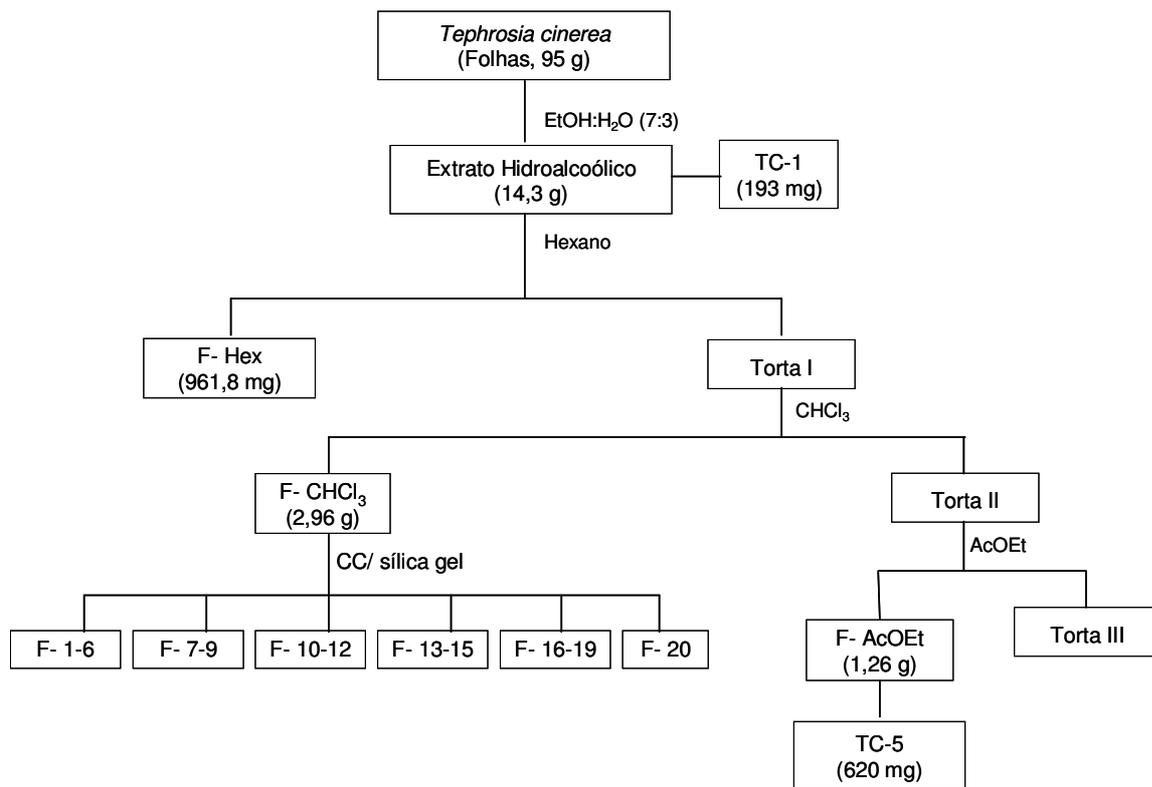


Figura 1. Fracionamento do extrato hidroalcoólico de *Tephrosia cinerea*.

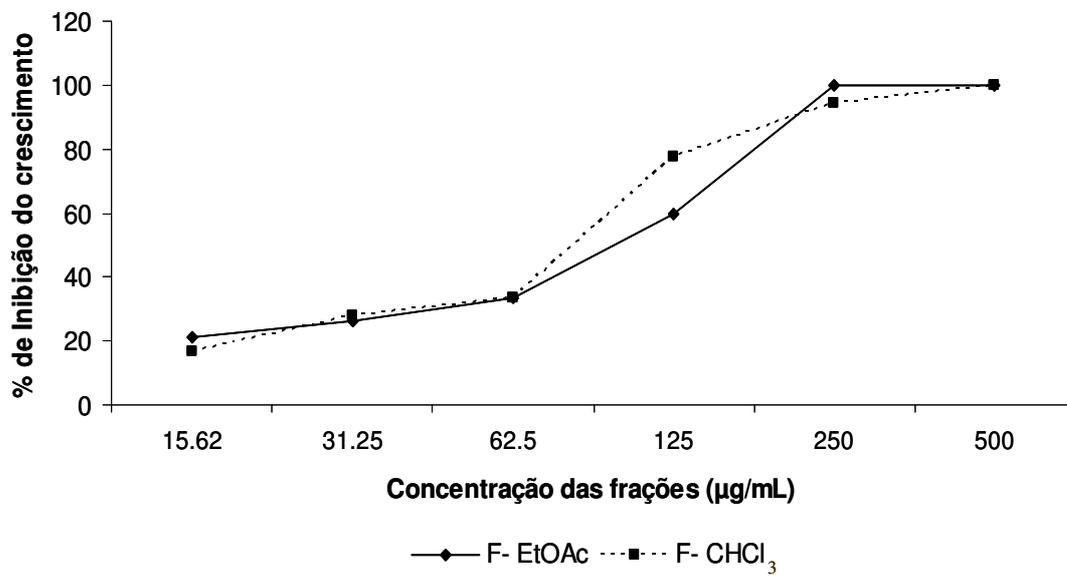


Figura 2. Efeito da fração clorofórmica (F-CHCl₃) e fração acetato de etila (F-AcOEt) do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. cinerea* sobre formas promastigota de *Leishmania amazonensis*.

Tabela 1. Atividade leishmanicida dos extratos, frações e sub-frações isoladas de *T.cinerea*.

AMOSTRA TESTADA	ATIVIDADE LEISHMANICIDA CI₅₀ (µg/mL)
Ext. Hidroalcoólico	43,66
F-.CHCl ₃	81,59
F- AcOEt	79,97
Sub-fração 1-6	11,65
Sub-fração 7-9	10,99
Sub-fração 10-12	12,77
Sub-fração 16-19	21,87
Sub-fração 20	43,66
TC-1	s/ atividade
TC-5	s/ atividade
Glucantime®	440,3

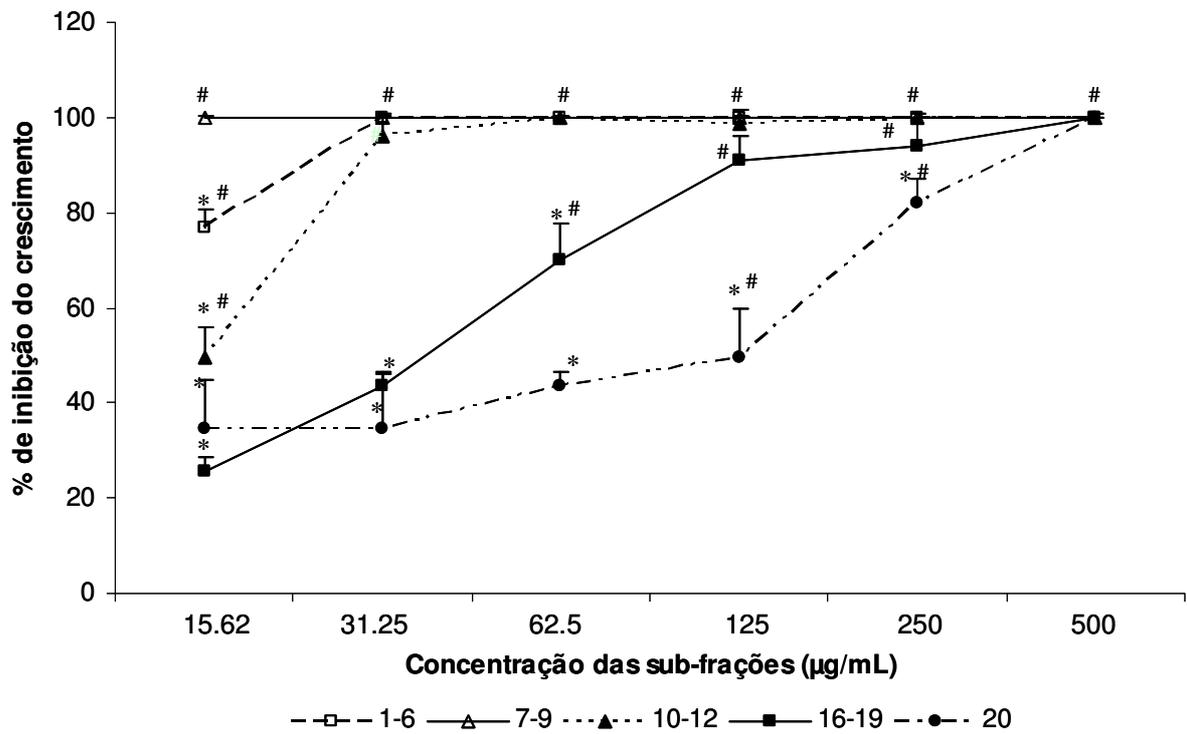


Figura 3. Efeito das sub-frações (1-6; 7-9; 10-12; 16-19 e 20) da fração clorofórmica do extrato hidroalcoólico de *Tephrosia cinerea* sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* nas concentrações de 15.62, 31.35, 62.5, 125, 250 e 500µg/mL. Os valores estão expressos em média \pm DP. (# $p < 0,05$ em relação ao controle; * $p < 0,05$ em relação a sub-fração 7-9).

4. CONCLUSÕES

- Dos dez extratos testados, os das espécies *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter*, *Dichorisandra sp.*, *Tephrosia cinerea* (L.) Pers., *Passiflora edulis* Sims, *Chenopodium ambrosioides* L. e *Syzygium jambolanum* DC. apresentaram atividade contra promastigotas de *L. amazonensis.*, sendo as três primeiras as de resultados mais expressivos.

- Os extratos hidroalcoólicos de *P. angustifolia* e *Cecropia sp.* não inibiram o crescimento das promastigotas, mostrando um possível efeito pró-*leishmania*.

- Os extratos das espécies *P. tithymaloides* e *O. phalerata* não foram consideradas ativas em virtude da CI_{50} ser maior do que 500 μ g/mL.

- Da partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico das folhas de *T. cinerea*, obtivemos duas frações que foram ativas, fração clorofórmica (F- $CHCl_3$) e fração acetato de etila (F-AcOEt) com CI_{50} de 81,59 μ g/mL e 79,97 μ g/mL, respectivamente.

- O fracionamento cromatográfico da F- $CHCl_3$, permitiu a separação de seis grupos de sub-frações, dos quais cinco foram testados (1-6; 7-9; 10-12; 16-19; 20), exibindo atividade leishmanicida inversamente proporcional ao aumento de polaridade na maioria das frações.

- A sub-fração 7-9, rica em flavanóides, demonstrou atividade em todas as concentrações testadas exibindo CI_{50} de 10,99 μ g/mL, sendo possivelmente a responsável pela ação encontrada no extrato.

- As frações TC-1 e TC-5 não foram ativas nos ensaios biológicos.

Esses resultados abrem perspectiva para a continuação dos estudos nas espécies vegetais que mostraram ação leishmanicida, na busca de substâncias que possam produzir novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Procuramos neste trabalho estudar espécies conhecidas e cultivadas no Maranhão. São poucos os estudos químico-biológicos realizados em espécies vegetais considerando a vasta diversidade existente principalmente no Brasil.

Assim, os resultados disponíveis poderão indicar:

- Novos produtos naturais anti-leishmaniais, que poderão servir para a elaboração de novos fármacos;
- Indicar substâncias químicas extraídas de plantas nordestinas, com atividade leishmanicida, menos tóxicas e mais eficazes do que os atuais medicamentos.
- Gerar novos conhecimentos sobre plantas utilizadas pela população, servindo para elaboração de monografias das espécies estudadas.

Ressaltamos que outros dados deste trabalho ainda estão sendo analisados e resultarão no terceiro artigo a ser publicado.

Levando-se em consideração que a bioprospecção de substâncias ativas a partir de produtos naturais requer tempo e uma abordagem multidisciplinar, propomos como metas de continuação deste trabalho a identificação das substâncias bioativas das sub-frações; o fracionamento biomonitorado das demais espécies ativas *in vitro*; a realização dos ensaios de toxicidade *in vivo* bem como, a avaliação da atividade leishmanicida em modelos de infecção *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

- Akendengue B, Ngou-milama E, Laurens A, Hocquemiller R 1999. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* 6:3-8.
- Alberton JR, Ribeiro A, Sacramento LVS, Franco SL, Lima MAP 2001. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Rev Bras Farmacogn* 11: 37-50.
- Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AMO, Wilson ME, Pearson RD, Jeronimo SMB 2006. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg* 100:79-82.
- Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M 2003. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 861-870.
- Araújo CAC, Alegrio LV, Leon LL 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* 49:751-754.
- Barata LES, Santos LS, Ferri PH, Phillipson JD, Paine A, Croft SL 2000. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 55:589-595.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM 1991. Leishmaniasis em Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg* 44:536-46.
- Batista SM, Ribeiro MNS. 2003. Controle de qualidade de *Orbignya phalerata* Mart. In: Seminário de Iniciação Científica, 15. São Luís. *Resumos*. São Luís-MA, p.23.
- Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício, FJ, Sousa SM, Amaral FMM, Rebelo JMM, Guerra RNM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF 2006. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* (no prelo).

- Boeck P, Falcão CAB, Leal P C, Yunes RA, Cechinel Filho V, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B. 2006. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic Med Chem* 14: 1538–1545.
- Brasil. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação: Maranhão / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.
- Brasil. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de situação: Maranhão / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 2 ed.- Brasília : Ministério da Saúde, 2006.
- Caldas AJM, Costa JML, Silva AAM, Vinhas V, Barral A 2002. Risk factors associated with asymptomatic infection by *Leishmania chagasi* in Northeast Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hig* 96:21-28.
- Camacho MR, Phillipson JD, Croft LS, Kirby GC, Warhurst DC, Solis PN 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry* 56:203-210.
- Camacho MR, Phillipson SL, Croft PN, Marshall SJ, Ghazanfar SA 2003. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol* 89: 185-191.
- Cardona W, Quiñones W, Robledo S, Vélez I D, Murga, J, García-Fortanet J, Carda M, Cardona D, Echeverri F 2006. Antiparasite and antimycobacterial activity of passifloricin analogues. *Tetrahedron* 62: 4086–4092.
- Carvalho PB, Ferreira EI 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 72: 599-618.
- Chang LC, Chavez D, Song LL, Farnsworth NR, Pezzuto JM, Kinghorn D 2000. Absolute configuration of novel bioactive flavonoids from *Tephrosia purpurea*. *Organic letters* 4: 515-518.
- Chen M, Brogger Christensen S, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG, Kharazmi A 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against

human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2550-2556.

Costa JML, Balby IAT, Rocha EJS, Silva ARS, Rebêlo JMM, Ferreira LA, Gama EA, Branco MRFC, Burattini MN, Soares NJS 1998. Estudo comparativo da leishmaniose tegumentar americana em crianças procedentes das áreas endêmicas de Buriticupu (Maranhão) e Corte de Pedra (Bahia)-Brasil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 31: 279-288.

Croft S, Coombs G. 2003. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502–508.

Cragg GM, Newman DJ, Snader KM 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60: 52-60.

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A 2004. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol* 94: 1-23.

Dujardin J-C 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol* 22: 4-6.

Feresin GE, Tapia A, Sortino M, Zacchino S, Arias AR, Inchausti A, Yaluff G, Rodriguez J, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G 2003. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. *J ethnopharmacol* 88: 241-245.

Fournet A, Barrios AA, Munõz V, Hocquemiller CA 1992. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Annals Trop Med Parasitol* 43: 219-222.

Fournet A, Ferreira ME, Rojas AA, Torres de OS, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A 1996. *In vitro* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2447-2451.

França F, Cuba CA, Moreira EA, Almeida M, das Virgens ML, Marsden PD 1993. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentale*) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Brasil Med Trop* 26:151-155.

- França F, Lago EL, Marsden PD 1996. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 29: 229-232.
- Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio, O 2004. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res in Microbiol* 155: 224–230.
- Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Brasil Med Trop* 36: 71-80.
- Grimaldi Jr. G, Tesh RB e Macmohon-pratt D 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med and Hig* 41:687-725.
- Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG 1994. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitol Today* 10: 65-68.
- Jang DS, Park EJ, Kang YH, Hawthorne ME, Vigo JS, Graham JG, Cabieses F, Fong HHS, Mehta RG, Pezzuto JM, Kinghorn AD 2003. Potencial cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. *J Nat Prod.* 66: 1166-1170.
- Kam TS, Sim KM, Koyana T, Toyoshima M, Hayash M, Komiyama K. 1997. Cytotoxic and Leishmanicidal aminoglycoesteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. *J Nat Prod* 61: 1332-1336.
- Kam TS, Sim KM, Koyano T, Toyoshima M, Komiyama K 1999. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry* 50: 75-79.
- Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H, Croft SL 2000. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 77: 307-314.
- Lainson, R.; Shaw, JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: the Leishmaniasis. London, N. Y., v.1, p.1-128,1987.

- Loguercio AP, Battistin A, Castagna de Vargas A, Niura AH, Witt M 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells) *Ciência Rural*, Santa Maria, 35: 371-376.
- Mahiou V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A, Rojas de Arias A, Inchausti A, Yaluff G, Fournet A 1994. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *J Nat Prod* 57: 890-895.
- Martínez MA, Del P, Swain T 1993. *Flavonoids and chemotaxonomy of the Commelinaceae*. *Biochem System Ecol* 13: 391-402.
- Martins LM. *Ocorrência da leishmaniose tegumentar e sua relação com impactos ambientais em Buriticupu, Amazônia do Maranhão*. Dissertação (Saúde e Ambiente), Universidade Federal do Maranhão. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. São Luís. 70p, 2002.
- Matos FJA 1988. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: EUFC, 128p.
- Matos FJA 2000. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 2ª ed. Fortaleza: IU.
- Matthias LA, Emily A 1993. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará - Brazil 1993. *J Ethnopharmacol* 40:53-75.
- Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS 2005. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 783-787.
- Ministério da Saúde (FUNASA) 2000. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA, MS.
- Mittal N, Gupta N, Saksena S, Goyal N, Roy U, Rastogi A K 1998. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sci* 63: 1823-1834.
- Mittra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal, S, Mukhopadhyay S, Bandypadhyay S, Majumder HK 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial

agent that acts by inducing topoisomerase ii-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Molecular Med* 6: 527–541.

Moreira RCR, Costa JML, Saldanha AC, Silva AR 1998. Projeto Buriticupu Maranhão II. Plantas usadas como terapêutica da leishmaniose tegumentar americana na região de Buriticupu-Maranhão. *Rev Soc Brasil Med Trop* 31(Suplemento I): T248, 126.

Moreira RCR, Rebêlo JMM, Gama MEA, Costa JML 2002. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pub* 18: 187-195.

Moreira RCR, Costa GC, Lopes TC, Bezerra JL, Guerra RNM, Rebêlo JMM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Costa JML 2006. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). *Rev Bras Farmacognosia* (Artigo no prelo).

Muhammad I, Li X, Jacob MR, Tekwani BL, Dunbar DC, Ferreira D 2003. Antimicrobial and Antiparasitic (+)-trans-Hexahydrodibenzopyrans and analogues from *Machaerium multiflorum*. *J. Nat. Prod.* 66: 804-808.

Nakamura CV, Santos AO, Vendrametto MC, Luize PS, Dias Filho BP, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T 2006. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Rev Bras Farmacogn* 16: 61-66.

Neves, DP 1998. *Parasitologia humana*. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 420p.

Niassy B, Lobstein A, Um BH, Anton R, Koné MMEK 2005. Flavonoids from *Tephrosia deflexa* and *T. albifoliolis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 309-312.

Oliveira MC, Amorim RFB, Freitas RA, Costa ALL 2005. Óbito em caso de leishmaniose cutâneo-mucosa após o uso de antimonial pentavalente. *Rev Soc Brasil Med Trop* 38: 258-260.

Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* 7: 257–266.

- Paula CDR, Sampaio JHD, Cardoso DRC, Sampaio RNR 2003. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Brasil Med Trop* 36:365-371.
- Pio Corrêa P 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, vol. 5.
- Queiroz EF, Roblot F, Cave A 1996. Pesseoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *J Nat Prod* 59: 438-440.
- Rates SMK 2000. Review: Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím Nova* 26: 550-553.
- Rebêlo JMM, Araújo, JAC, Carvalho, ML, Barros VLL, Silva FS, Oliveira ST 1999. Flebotomos (Diptera, Phlebotominae) da Ilha de São Luis, zona do Golfão Maranhense, Brasil. *Rev Soc Brasil Med Trop* 32: 247-253.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LAA, Silva AR 2000a. Plebotominae (Diptera: Psychodidae) de Lagoas, município de Buriticupu, Amazônia Maranhense. I - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização recente. *Rev Soc Brasil Med Trop* 33:11-19.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS 2000b. Flebotomíneos da Amazônia Maranhense. IV - Riqueza e abundância relativa das espécies em área de colonização antiga. *Entomol Vect.* 7: 61-72.
- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Barros VLL, Silva FS, Costa JML, Ferreira LAA, Silva AR 2001a. Flutuações dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área de colonização recente do Município de Buriticupu, Amazonia maranhense, Brasil. *Rev Bras Entomol* 45:11-16.

- Rebêlo JMM, Oliveira ST, Silva FS, Costa JML 2001b. Sandflies (Diptera, Psychodidae) of the Amazonia of Maranhão. V. Seasonal occurrence ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. *Rev Bras Biol* 61:107-115.
- Rêgo TJAS 1995. *Fitogeografia de plantas medicinais do Maranhão*. São Luis:Edufma. 133p.
- Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa Filho JM 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12: 514-535.
- Rosado-Vallado M, Brito-Loeza W, Mena-Rejón GJ, Quintero-Marmol E, Flores-Guido JS 2000. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. *Fitoterapia* 71: 570-573.
- Salem MM, Werbovetz KA 2005. Antiprotozoal compounds from *Psorothamnus polydenius*. *J Nat Prod* 68:108-111.
- Salem MM, Werbovetz KA 2006. Isoflavonoids and other compounds from *Psorothamnus arborescens* with antiprotozoal activities. *J Nat Prod*. 69: 43-49.
- Sauvain M, Kunesch N, Poisson J, Gantier J-C, Gayral P, Dedet J-P 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dellineaceae) *Phytother Res* 10:1-4.
- Schmeda-Hirschmann G 1996. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytother. Res.* 10: 375.
- Sharma P, Rastori S, Bahatnager S, Srivastava JK, Dube A, Guru PY, Kulshreshtha DH, Dhawan BN 2003. Antileishmanial action of a plant *Tephrosia purpurea* against experimental visceral leishmaniasis. *Drug Development Res* 60: 285-293.
- Shu YZ 1998. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* 61: 1053-1071.

- Sindermann H, Croft SL, Engel KR, Bommer W, Eibl HJ, Unger C, Engel J 2004. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl.)*193: 173–180.
- Silva SAG, Da Costa SS, Mendonça, SCF, Silva EM, Moraes VLG, Rossi-Bergman B 1995. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica* 60: 201-210.
- Silva AR, Martins G; Melo GEN, Araújo P, Mendes MG 1979. Surto epidêmico de leishmaniose tegumentar americana ocorrido na colonização agrícola de Buriticupu (Estado do Maranhão), Brasil. *Rev Inst Med Trop* 21: 1-62.
- SINAN-Sistema de Informação de Agravos Notificáveis 2006. <http://www.ministeriodasaude.gov.br>. Consultado em 16/09/2006.
- Soejarto DD, 1996. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. *J Ethnopharmacol* 51: 1-15.
- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sinderman H 2004. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical infectious diseases* 38: 1266-1272.
- Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA 1991. *Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza:EUFC.
- Suarez AI, Blanco Z, Delle Monache F, Compagnone RS, Arvelo F 2004. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Nat Prod Res* 18: 421-426.
- Tarus PK, Machocho AK, Lang'at-Thoruwa CC, Chhabra SC 2002. Flavonoids from *Tephrosia aequilata*. *Phytochemistry* 60: 375-379.
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1352–1364.

- Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Bergmann BR 1999. Selective Effect of 2,6-Dihydroxy-4-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1234–1241.
- Truiti MCT, Ferreira ICP, Zamuner MLM, Nakamura CV, Sarragiotto MH, Souza MC 2005. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. *Braz J Med Biol Res* 38: 1873-1878.
- World Health Organization. 2002. The leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infections. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>. Consultado em 10/11/05.
- Wright CW, Phillipson JD 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 4: 127-139.
- Zuanazzi JAS, Montanha JA 2003. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.577-614.