

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

Ivan de Oliveira Pereira

Atividade leishmanicida de constituintes químicos dos frutos de
Garcinia brasiliensis

Alfenas/MG

2009

Ivan de Oliveira Pereira

Atividade leishmanicida de constituintes químicos dos frutos de
Garcinia brasiliensis

Dissertação apresentada ao programa do curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Alfenas/MG

2009

IVAN DE OLIVEIRA PEREIRA

Atividade leishmanicida de constituintes químicos dos frutos de
Garcinia brasiliensis

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em: 02 de fevereiro de 2009

Prof.º: Sérgio de Albuquerque

Instituição: Universidade de São Pulo – FCFRP **Assinatura:** _____

Prof.º: Geraldo Alves da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

Prof.º: Marcelo Henrique dos Santos

Instituição: Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

Pereira, Ivan de Oliveira.

Atividade leishmanicida de constituintes químicos dos frutos de
Garcinia brasiliensis / Ivan de Oliveira Pereira. - Alfenas, 2008.

100 f. : il. -

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal de Alfenas.
Bibliografia.

1. Garcinia. 2. Leishmania. 3. Inibidores de Proteases. 4.
Produtos Biológicos. I. Título.

CDD: 616.96

Esta dissertação é dedicada aos meus pais, Sebastião e Aparecida, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho em especial...

Aos meus pais, pela compreensão, paciência e apoio sempre! Deixando para isso muitas coisas de lado.

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Aos meus orientadores Marcelo Henrique dos Santos e Marcos José Marques, pelos conhecimentos transmitidos, ajudas constantes, confiança depositada e grande amizade, sempre levarei comigo os bons exemplos que me deram, muito além da ciência.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG, pela amizade e simpatia sempre constantes, em especial à Cláudia Quintino, Roberta Àvila, Rodrigo Silva, Sônia Figueiredo, Douglas Spury, Renan Amaro, Vanessa Gontijo e Éderson D´Martin.

Aos professores Márcia Paranho Veloso, Lira Celeste Alves, Adir Araújo, Antonio Carlos Doriguetto, Cláudio Viegas Júnior, Luiz Alberto Beijo e Ihosvany Camps Rodriguez pelo apoio científico e pela amizade.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pelo auxílio e infra-estrutura disponibilizada, em especial às técnicas Nereyda Orsi e Franciene da Silva, pela incansável ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos membros do laboratório de Parasitologia Básica, pelo auxílio e pelo espaço disponibilizado.

Aos GRANDES amigos feitos durante estes dois anos, em especial à Helineide Campos, Rudy Bonfilio, Livia Mara, Ana Paula Sabino e Emiliane Laighneri, compartilhadores de alegrias e tristezas.

À professora Maria Aparecida Juliano (Unifesp), por gentilmente ter cedido seu laboratório para a realização dos testes de inibição enzimática.

Ao grupo do Laboratório de Biofísica da Unifesp, em especial ao Diego Magno Assis, pela incansável paciência e boa vontade.

Ao professor Rodrigo Cunha (Unifesp), pela orientação no desenvolvimento dos testes de inibição enzimática.

À professora Clara Lucia Barbieri Mestriner e a técnica Simone Katz do Laboratório de Parasitologia da Unifesp, pela disponibilização do laboratório, amizade, simpatia e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Laura Pavan e Bárbara Codonho, “minhas meninas”, pela indispensável ajuda, incentivo e, principalmente, pela grande amizade que construímos.

Aos muitos amigos da UNIFAL-MG que tornaram estes dois anos agradáveis, sentirei muitas saudades de vocês.

Aos órgãos de incentivo à pesquisa e desenvolvimento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelos auxílios.

A todos, amigos e familiares, por serem AMIGOS, incentivadores e compreensivos nos momentos difíceis ou de ausência.

Por fim, àqueles que convivem próximos a mim, em especial a Michelle, pela paciência em ouvir minhas longas narrativas sobre leishmanias.

“Os parasitos são tradicionalmente considerados como grandes agressores dos quais os hospedeiros têm que se defender. É importante destacar que os tipos de relações ecológicas entre os seres vivos não são excludentes nem estáticos, não devendo, portanto, serem aceitas de forma absoluta e/ou imutável, e os parasitos nem sempre são os ‘vilões’ da estória (ou da história)”.

Henrique Lenzi

“O mistério mais maravilhoso da vida talvez seja o meio pelo qual ela criou tanta diversidade a partir de tão pouca matéria física”.

Wilson, E.O. 1992.

RESUMO

As plantas são utilizadas no tratamento e na cura de enfermidades desde a antiguidade, quando o homem começou a usar a natureza em seu favor. Estas plantas, pela sua riqueza química e farmacológica, têm sido estudadas no intuito de comprovar atividades atribuídas pela crença popular ou mesmo obter novos compostos ativos. Neste contexto, a família Clusiaceae que compreende quarenta e nove gêneros de plantas de ampla distribuição tem sido investigada. Entre eles está o gênero *Garcinia*, também conhecido como *Rheedia*, que é rico em uma considerável diversidade de compostos, tais como benzofenonas polipreniladas e flavonóides. Neste trabalho foram obtidos os extratos hexânico, acetato-etílico e etanólico do pericarpo dos frutos de *Garcinia brasiliensis*. Após avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*, o extrato hexânico se mostrou o mais ativo. Desta forma, foi fracionado e dele obteve-se três benzofenonas, 7-*epi*-clusianona, garciniafenona e guttiferona-a, que foram avaliadas quanto as suas atividades leishmanicida e toxicidade. No intuito de determinar um possível mecanismo de ação, os extratos foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir proteases isoladas de amastigotas, sendo o extrato acetato etílico o que apresentou melhor resultado. Assim, este foi fracionado e dele se obteve o biflavonóide fukugetina, que também foi avaliado quanto à capacidade de inibir proteases, apresentando resultados muito satisfatórios. Todavia, quando o extrato acetato etílico e a fukugetina foram avaliados quanto à atividade leishmanicida *in vitro* não foi observado o mesmo efeito. Com estes resultados podemos observar que a polaridade dos extratos e das moléculas testados neste estudo pode ser um fator imprescindível na atividade leishmanicida, possivelmente por dificultar o transporte destas substâncias através de membrana plasmática.

Palavras-chave: *Garcinia*. *Leishmania*. Inibidores de Proteases. Produtos Biológicos.

ABSTRACT

The plants have been used in the treatment and cure of illnesses since the antique. When the men started to use the nature in your service. These plants, due to their chemical and pharmaceutical characteristics, have been studied in order to prove their theoretical medicinal capabilities or to obtain new active components. In this context, the Clusiaceae family is made up of forty nine species that are widely distributed, have been studied. Among these species is the genus *Rheedia*, also known as *Garcinia*, which is rich in a wide range of components, such as polyprenylated benzophenones and flavonoids. In this work were obtained the hexanic, ethyl-acetate and ethanolic extracts from pericarp of fruits from *Garcinia brasiliensis*. After the evaluation of leishmanicidal activity *in vitro*, the hexanic extract shown the more active, thus, this was fractioned yielding three benzophenones - 7-*epi*-clusianone, garciniaphenone and guttiferone-a – that were evaluated how their leishmanicidal and toxicity activities. With the intention of to determine a possible mechanism of action, these components were then evaluated of their capacity of to inhibit proteases isolated from amastigote forms of *Leishmania*, have been the ethyl-acetate extract the more effective. Thus this was fractioned yielding the biflavonoid fukugetin, witch also was evaluated in relation your proteases inhibition capacity, showing results very satisfactory. However, when the ethyl-acetate extract and the fukugetin were evaluated in relation the leishmanicidal activity *in vitro*, not was find the same effect. With these results, we might realize that the hydrophilic of extracts and molecules evaluated in this study can be an essential factor in the leishmanicidal activity, possible by to make transport difficult of this compounds across the plasmatic membrane.

Key-words: *Garcinia*. *Leishmania*. Proteases Inhibitors. Biological Products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Formas evolutivas do protozoário <i>Leishmania</i>	17
Figura 2-	Estrutura química do antimonial pentavalente.....	25
Figura 3 -	Estrutura química da anfotericina B.....	26
Figura 4 -	Estrutura química da pentamidina.....	27
Figura 5 -	Estrutura química da paramomicina.....	28
Figura 6 -	Estrutura química do miltefosine.....	29
Figura 7 -	Frutos de <i>Garcinia brasiliensis</i>	36
Figura 8 -	Semente e poupa de <i>Garcinia brasiliensis</i> em fruto cortado transversalmente.....	36
Figura 9 -	Anel difenilmetanona.....	37
Figura 10 -	Anel biciclo[3.3.1]nonano.....	37
Figura 11 -	Exemplos de acilfloroglucinóis proliprenilados.....	37
Figura 12 -	Estrutura da benzofenona poliprenilada garciniafenona.....	38
Figura 13 -	Estrutura do biflavonóide fukugetina.....	39

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1	ASPECTOS GERAIS – LEISHMANIOSES.....	11
1.2	LEISHMANIOSE E HIV.....	15
1.3	CICLO BIOLÓGICO DA <i>Leishmania</i>	16
1.4	INTERAÇÃO PARASITO – HOSPEDEIRO.....	18
1.5	A IMPORTÂNCIA DAS PROTEASES – seu papel nas interações entre parasitas e hospedeiros.....	19
1.6	TRATAMENTOS.....	24
1.6.1	Resistência ao tratamento.....	29
1.7	PLANTAS MEDICINAIS.....	31
1.7.1	Plantas medicinais: pesquisa e indústria farmacêutica.....	32
1.8	FAMÍLIA GUTTIFERAE.....	33
1.8.1	O gênero <i>Garcinia</i>	34
1.8.1.1	A espécie <i>Garcinia brasiliensis</i>	35
1.8.2	Estudos fitoquímicos.....	36
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
3	ARTIGO I.....	57
3.1	ARTIGO II	82

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ASPECTOS GERAIS - LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados que pertencem a ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae e gênero *Leishmania*. Este conjunto de doenças possui, além do impacto sócio-econômico, a segunda maior incidência parasitária, logo após a malária (LAINSON; SHAW, 1992). Os protozoários da ordem Kinetoplastida se caracterizam pela presença de uma estrutura rica em DNA, denominada cinetoplasto (LAINSON; SHAW, 1987).

Existem evidências de que esta doença já estivesse presente nas Américas nas civilizações pré-inca, antes da chegada dos conquistadores neste continente. Todavia, a primeira descrição científica foi feita por Leishman e Donovan em 1903.

Uma das características mais marcantes do gênero *Leishmania* é a diversidade das manifestações clínicas. As formas cutâneas, que se caracterizam por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas; a forma cutânea difusa, com lesões nodulares persistentes, no corpo inteiro; a forma mucocutânea, que afeta de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato; e as formas viscerais, que se caracterizam pelo aumento no volume do fígado e baço, anemia, perda de peso e febre, e que, se não tratada a tempo, pode ser fatal (HEPBURN, 2000).

A forma clínica cutânea da leishmaniose também é conhecida como ferida brava ou úlcera de Bauru. Esta é a forma mais comum de leishmaniose e caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas de vários tipos, geralmente manifestando-se como úlcera crônica que pode disseminar progressivamente afetando linfonodos e causando metástases (ASHFORD, 2000; HEPBURN, 2000).

Depois de um período de incubação, que varia de duas semanas a dois meses aparece a lesão inicial, que é geralmente única, crescendo lentamente e

ulcerando depois de alguns meses. As lesões podem chegar a medir vários centímetros com características típicas como contornos regulares, inodoras, pouco exsudativas e com fundo granuloso. Também se observam outros tipos de lesões como ulcero-crostosas, ectimatóides, úlcero vegetantes, verrucosas e outras. As lesões da pele podem curar espontaneamente, deixando cicatrizes visíveis após curso crônico de meses a anos (REY, 2001).

Na forma cutânea difusa, as lesões são papulosas ou nodulares deformantes, não se observando ulceração das lesões. Estas se distribuem amplamente na superfície corporal, onde são encontrados abundantes macrófagos repletos de amastigotas (WALTON, 1987). Esta forma de leishmaniose se apresenta raramente, não cura espontaneamente, é de difícil tratamento e apresenta recaída após a terapia (SOUZA et al., 2006).

A leishmaniose mucocutânea caracteriza-se por lesões tardias, que surgem geralmente meses ou anos após a cura de uma lesão cutânea (WALTON, 1987), preferencialmente no tabique auricular ou nasal, que se estende progressivamente aos tecidos moles, com inflamação e ulceração. Posteriormente a lesão se aprofunda, e nestas lesões se encontram poucos parasitos (MARKELL; JOHN; KROTASKI, 2003).

A leishmaniose visceral, também chamada Kalazar, febre negra ou esplenomegalia tropical, é uma doença crônica e endêmica em várias regiões do mundo, afetando especialmente crianças e pessoas imunodeprimidas, caracterizando-se por febre irregular e esplenomegalia (SILVA et al., 2001). O período de incubação varia de dois a oito meses. O início da doença é insidioso; com perda de apetite; palidez; aparecimento de febre alta que é o sintoma mais notável pela sua constância; aumento de volume do baço; anemia e hemorragias da gengiva e digestiva (FURTADO, 1994). A alteração do apetite leva a desnutrição grave e a evolução da doença pode ser rápida, levando à morte em algumas semanas. Além disso, a susceptibilidade a diversas infecções bacterianas pode agravar o quadro clínico (SAMUELSON, 2000). Os pacientes podem

apresentar uma forma crônica assintomática desta doença, com curso lento que pode durar anos, ou a forma aguda que é rápida e fatal.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses acometem 12 milhões de pessoas no mundo, em 88 países tropicais e subtropicais, sendo 72 desses considerados em vias de desenvolvimento. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de se contrair a leishmaniose, com 1,5 a 2 milhões de novos casos a cada ano (WHO, 2003).

Segundo a OMS, de 1 a 1,5 milhões de casos anuais correspondem a forma cutânea, ocorrendo principalmente em países em vias de desenvolvimento, na Ásia, África e América Latina. Cerca de 90% dos casos estão concentrados entre Afeganistão, Algéria, Irã, Iraque, Arábia Saudita e Síria, na África, e no Brasil e Peru, nas Américas (ASHFORD, 2000). A incidência de novos casos de leishmaniose visceral chega a aproximadamente 0,5 milhão, sendo a maioria destes na Índia, Sudão, Bangladesh e Nepal, na África e Ásia, e no Brasil, nas Américas, onde está distribuída desde os Estados Unidos até o norte da Argentina (SINGH; SINGH; SUNDAR, 2003). Esta forma da doença possui uma vasta distribuição geográfica, incluindo regiões tropicais, subtropicais, e certas zonas temperadas, sendo considerada endêmica em parte da Ásia, Índia, América Central e do Sul, Baixo Mediterrâneo e alguns países da Europa (LAINSON; SHAW, 1992).

No Brasil tem-se observado, na última década, a expansão das áreas consideradas endêmicas para as leishmanioses, assim como a eclosão de surtos epidemiológicos em regiões antes consideradas livres dessas doenças. Entre os fatores que contribuem para este crescimento temos indivíduos que visitam áreas endêmicas ou indivíduos portadores que migram para outras regiões (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006), além de surtos epidêmicos associados à aceleração do desmatamento para as expansões agrícolas e urbanas, entre outras atividades (DESJEUX, 2001).

A leishmaniose (visceral e cutânea) é considerada no Brasil como a sexta doença infecciosa com maior incidência confirmada, de acordo com o Ministério da Saúde. O número de casos anuais de leishmaniose tegumentar passou de 4560 a

28712, no período de 1980 a 2004. Aumento ainda mais expressivo foi registrado em relação a leishmaniose visceral, com 163 casos em 1980 e 3366 casos em 2004. A expansão na distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no Brasil também é bem evidente, pois em 1994 havia registro de casos autóctones em 1861 municípios, distribuídos entre 20 estados da federação. Em 2002, observou-se expansão da doença para 2302 municípios, distribuídos por todos os estados. As regiões nordeste e norte são as de maior incidência, seguidas pela região centro-oeste, sudeste e sul (MS/FUNASA, 2002).

A distribuição dos casos de leishmaniose visceral no Brasil também tem sofrido alterações. Sua ocorrência, antes limitada a áreas rurais, nos estados do nordeste, está atualmente distribuída entre regiões urbanas e rurais em 19 estados da federação. A região de maior incidência é a região Nordeste, seguida pela região Sudeste, Norte e, finalmente, Centro-Oeste. A mortalidade tem se mantido em torno de 10% dos casos notificados (BRANDÃO FILHO; SHAW, 1994; MS/FUNASA, 2002).

Em relação ao agente etiológico vale destacar que os membros da família Trypanosomatidae apresentam divisão binária simples, e podem parasitar somente invertebrados, ou então apresentar um ciclo de vida heteroxênico tendo como hospedeiros tanto invertebrados quanto vertebrados. A família Trypanosomatidae compreende gêneros tais como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*, os quais são parasitos de invertebrados, vertebrados e plantas (CAMARGO et al., 1997).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Os parasitos do subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior (secção peripilária). Os parasitos do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio (secção suprapilária) (LAINSON; SHAW, 1987). O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies catalogadas, das quais 20 estão implicadas em doenças de humanos (ASHFORD, 2000).

Nas Américas, a leishmaniose cutânea é freqüentemente causada pelas espécies *L. (V.) brasiliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*; no Velho Mundo as espécies *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* são as responsáveis por esta forma clínica (GRIMALDI; TESH, 1993; WILLIAMS, 1995). A espécie mais destrutiva, causadora da forma mucocutânea é a *L. (V.) brasiliensis* (ABRAMSON et al., 1995). Na Ásia, África e Europa a leishmaniose visceral pode ser causada por *L. (L.) donovani* ou *L. (L.) infantum*, enquanto que nas Américas, *L. (L.) chagasi* é responsável por esta forma de leishmaniose (BAILY; NANDY, 1994).

Neste estudo, utilizou-se *L. (L.) amazonensis*, que é uma espécie freqüente nas florestas da Amazônia, seus hospedeiros naturais são os marsupiais e roedores silvestres como *Proechimys*, *Oryzomys*, *Marmosa*, entre outros. Seus vetores são *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca*, que têm hábitos de vôo baixo e são pouco antropofílicos (LEWIS; WARD, 1987). A forma clínica predominante na infecção por esta espécie é a forma cutânea. Por outro lado, em um pequeno número de pacientes, esta espécie está relacionada ao aparecimento da forma cutânea difusa.

1.2 LEISHMANIOSE E HIV

A co-infecção HIV/*Leishmania* é descrita em 35 países. Com aproximadamente 2000 casos notificados, 1911 ocorreram na região do Mediterrâneo, principalmente na Espanha, França, Itália e Portugal, onde a leishmaniose visceral (LV) acomete principalmente usuários de drogas endovenosas, sendo de alta prioridade para a OMS (DESJEUX; ALVAR, 2003). Nessa região, mais de 70% dos casos em adultos de LV estão relacionados a HIV/AIDS e mais de 9% dos casos de AIDS apresentaram co-infecção com *Leishmania*. A prevalência da LV em pacientes infectados pelo HIV no Mediterrâneo é de 2 a 9%, cerca de 500 vezes maior que em pacientes não infectados pelo HIV (GRADONI; SCALONE; GRAMICCIA, 1993).

Desde 1998, 28 instituições de diversos países, incluindo a região do Mediterrâneo, África e Índia, entre outros, estabeleceram uma rede de vigilância que notifica casos novos de co-infecção a OMS numa estratégia de monitoramento, padronização, melhoria nos recursos diagnósticos e manejo dos pacientes. Esta política se iniciou em 1994 quando a OMS instituiu um grupo então com 13 instituições européias na tentativa de monitorar o impacto do agravo (DESJEUX; ALVAR, 2003).

Rabello et al. (2003) analisaram 91 casos no Brasil até 2003. Desses, 7% eram usuários de drogas endovenosas, 91% do sexo masculino e quando a forma clínica foi avaliada, 63% apresentaram a forma tegumentar (20% cutâneo e 43% mucosa ou mucocutânea) e 37% formas viscerais da doença.

Relatos recentes chamam atenção para a sobreposição da distribuição geográfica da leishmaniose e pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (LUZ et al., 2001), tornando-se a *Leishmania* um organismo oportunista (WOLDAY et al., 1999). A dupla infecção produz efeito somatório na deficiência da resposta imune uma vez que *Leishmania* e HIV acometem células do sistema imunológico, aumentando exponencialmente a intensidade e conseqüências das doenças. Muitas das co-infecções relatadas nas Américas ocorrem no Brasil, onde as transmissões pelo HIV estão se espalhando para áreas rurais e a LV tem se urbanizado, aumentando o risco de sobreposição das doenças (WHO, 1991).

1.3 CICLO BIOLÓGICO DA *Leishmania*

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxeno, envolvendo um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, ou *Phlebotomus*, no Velho Mundo (ROBERTS; JANOVY, 2000). Esses pequenos dípteros têm preferência por lugares úmidos e quentes. Estima-se que existam cerca de 400 espécies de flebotomíneos nas Américas, sendo que 50 dessas parecem estar envolvidas na

transmissão da *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1999). Além de um vetor invertebrado, o parasito necessita de um hospedeiro vertebrado que atua como reservatório. Dentre esses, temos uma ampla variedade de roedores, canídeos, marsupiais e humanos. Geralmente o homem participa do ciclo de transmissão como um hospedeiro acidental, quando entra em ambientes de alta transmissão, onde a doença se mantém em função dos reservatórios naturais (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

O protozoário *Leishmania* apresenta duas formas no seu ciclo de vida: a forma extracelular promastigota, que é fusiforme, apresenta núcleo central e possui flagelo, organela relacionada à locomoção do parasito no tubo digestivo do inseto, e a forma amastigota, que é ovalada, não apresenta flagelo visível e é encontrada no interior dos fagolisossomos dos macrófagos (FIGURA 1) (ROBERTS; JANOVY, 2000; GANTT et al., 2001).

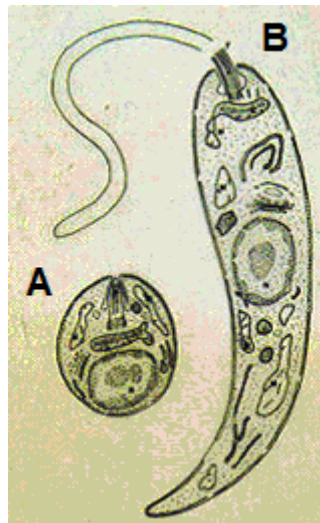


FIGURA 1: Formas evolutivas do protozoário *Leishmania*. A: amastigota; B: promastigota (FIOCRUZ, 2002).

O vetor pode se infectar ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo macrófagos que possuem amastigotas no seu interior. Após a lise do macrófago infectado as amastigotas transformam-se em promastigotas, as quais aderem às microvilosidades do intestino médio do inseto. Nesta fase, os parasitos

são denominados procíclicos, e caracterizam-se por se multiplicarem rapidamente por divisão binária, transformando-se, após alguns dias em promastigotas metacíclicos, que são muito móveis e não têm a capacidade de se dividir. Os promastigotas metacíclico, infectantes, migram para a probóscida do inseto e são injetados com a saliva durante o próximo repasto sanguíneo (BATTES, 1994; SACKS; KAMHAWI, 2001).

Os promastigotas inoculados sobrevivem aos mecanismos de defesa inatos do hospedeiro e então infectam os macrófagos. Dentro dos macrófagos forma-se o fagossomo, onde as formas promastigotas metacíclicas sobrevivem e estabelecem as condições favoráveis para a diferenciação em amastigotas, que se dividem, lisam o macrófago e infectam novas células, repetindo o ciclo (BATTES, 1994; GANTT, 2001; SACKS; KAMHAWI, 2001). A sobrevivência intracelular do parasito pode estar relacionada à rapidez de sua transformação em amastigota (LEWIS, 1974), uma vez que estas formas encontram-se melhor dotadas bioquímica e enzimaticamente para resistirem aos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos (PEARSON et al., 1983).

1.4 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

As formas amastigotas localizadas no interior dos macrófagos são organismos acidófilos, capazes de resistirem à ação microbicida das hidrolases ácidas, liberando lisoenzimas para sobreviver e multiplicar-se por divisão binária, até causar a lise da célula, sendo então fagocitadas novamente por outros macrófagos (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994).

Sobre a infecção do homem e de várias outras espécies de mamíferos por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, existe a dependência de complexas interações entre o parasito e o hospedeiro vertebrado, que determinam a apresentação clínica e o curso evolutivo das leishmanioses. Estas interações se realizam entre duas formas do ciclo evolutivo do parasito e os macrófagos do hospedeiro (HARKER, 1992).

Na última década, as proteases dos parasitos receberam considerável atenção dos pesquisadores. Este fato levou à análise de sua importância na interação parasito-hospedeiro. Um parasito bem sucedido deve conseguir penetrar e sobreviver no interior do hospedeiro, assimilando os componentes necessários à sua nutrição e conseguindo escapar da resposta imunológica do mesmo. As proteases participam de muitos dos mecanismos que os parasitos utilizam para persistirem no hospedeiro. Nos últimos anos, houve avanços no conhecimento sobre mecanismos de degradação protéica intracelular, tendo sido descritas várias novas famílias de proteases (POWERS, 2002).

1.5 A IMPORTÂNCIA DAS PROTEASES - seu papel nas interações entre parasitos e hospedeiros

Os parasitos garantem sua perpetuação dentro de seus hospedeiros através da produção de muitas moléculas, que ativam mecanismos de sobrevivência. Entre essas moléculas, as proteases são cruciais no ciclo de vida e patogenia, em especial da leishmaniose (ROSENTHAL, 1999; SADIJ; MCKERROW, 2002). Estas enzimas têm sido implicadas em uma grande variedade de mecanismos de adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, que incluem modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, disseminação do parasito, e aquisição de nutrientes essenciais que assegurem a sobrevivência e proliferação para manter a infecção (COOMBS; MOTTRAM, 1997; ROSENTHAL, 1999; SADIJ; MCKERROW, 2002).

Proteases ou peptídeo-hidrolases são enzimas capazes de provocar a quebra de ligações peptídicas, tendo uma ampla distribuição filogenética. Com base no tipo de reação catalisada, as proteases são classificadas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades amino e carboxila terminal das proteínas, enquanto que as endopeptidases, também chamadas proteinases, efetuam a clivagem no meio da cadeia polipeptídica. Com base no mecanismo de ação e comparação entre os sítios ativos, quatro classes de proteases são reconhecidas pela União

Internacional e Bioquímica: serino proteases, cisteíno proteases, aspartato proteases e metaloproteases (GRZONKA et al., 2001; POWERS, 2002).

As serino proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima, acompanhado de um resíduo de ácido aspártico e outro de histidina formando uma tríade catalítica. A catálise ocorre via formação de um estado de transição tetraédrico durante as etapas de acilação e desacilação. A tripsina, a quimiotripsina, a elastase e as calicreínas são exemplos de serino proteases (POWERS, 2002; BODE; HUBER, 1992).

As cisteíno proteases apresentam um resíduo de cisteína no centro ativo da enzima, que atua de forma semelhante ao resíduo de serina das serino proteases. A catálise ocorre via um intermediário tiol-éster e é facilitada pelos resíduos adjacentes de histidina e ácido aspártico. São exemplos de cisteíno proteases, a papaína, as catepsinas e as calpaínas, sendo que as principais funções fisiológicas destas moléculas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas, e estas enzimas também estão envolvidas em várias patologias (SEGUNDO, 1993). Uma característica importante das serino e cisteíno proteases é a formação de ligação covalente do substrato com a enzima (GRZONKA et al., 2001).

Nas aspartato proteases existem dois resíduos de ácido aspártico no centro ativo da enzima, um dos quais, na faixa de pH ótimo (em torno de 2 a 3) encontra-se ionizado, enquanto o outro não. São exemplos de proteases pertencentes a esta classe, a pepsina e a renina (COOPER, 2002; SIMÕES; FARO, 2004).

As metaloproteases caracterizam-se por possuir um átomo de metal, comumente o zinco, localizado no centro ativo da enzima. O metal é essencial para a catálise, fornecendo uma forte atração eletrofílica para auxiliar o ataque à ligação peptídica de uma molécula de água. A carboxipeptidase e a termolisina são exemplos desta classe de proteases (DECLERCK, 2000).

As cisteíno proteases são um dos potenciais alvos para diagnóstico, e candidatos para desenvolvimento de drogas e vacinas sendo extensivamente estudados em diferentes organismos patogênicos. Elas têm sido reportadas em bactérias (MORIHARA, 1974), vírus (BAZAN; FLETTERICK, 1988), fungos (APODACA; MCKERROW, 1989) e protozoários (OMARA-OPYENE; GEDAMU,

1997; ROBERTSON; COOMBS, 1994). Estas proteases de parasitos também estão implicadas em muitos processos, incluindo diferenciação, nutrição, infecção da célula hospedeira e fuga da resposta imune do hospedeiro (KLEMBA; GOLDBERG, 2002; MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004; SAJID; MCKERROW, 2002). As cisteíno proteases (CPA e CPB) tipo catepsina L têm-se mostrado necessárias para a sobrevivência de *Leishmania mexicana* dentro de macrófagos *in vitro* (DENISE et al., 2003), uma vez que ela é predominantemente expressa e ativa em amastigotas e menos intensamente em promastigotas metacíclicas (MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998). Essa observação, junto com o fato da *Leishmania* não crescer dentro de macrófagos na presença de inibidores de CP, sugerem que as CP são necessárias para o parasitismo intracelular ser bem sucedido (MOTTRAM et al., 1996).

Em estudos recentes têm também sido demonstrados que estas proteases agem ainda como moduladoras da resposta imune do hospedeiro à *L. mexicana* (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; BUXBAUM et al., 2003). Outros estudos, como os de inibição em *Leishmania chagasi*, indicam que cisteíno proteases ajudam na infecção e sobrevivência de amastigotas dentro de macrófagos (MUNDODI; KUCKNOOR; GEDAMU, 2005).

As cisteíno proteases estão, ainda, implicadas na invasão de eritrócitos humanos por *Plasmodium falciparum* (MAYER et al., 1991) e são consideradas como fatores de virulência na patogênese da *Entamoeba histolytica* (QUE; REED, 2000). A atividade de cisteíno proteases é necessária para a sobrevivência da *Leishmania (L.) mexicana* (COOMBS; BAXTER, 1984; DENISE et al., 2003) e *Trypanosoma cruzi*, *in vitro* (HARTH et al., 1993). Estudos iniciais têm confirmado a eficácia de inibidores de cisteíno proteases no tratamento da infecção por *T. cruzi*, *P. falciparum* e *L. (L.) major* (MCKERROW; MCGRATH; ENGEL, 1995; ROSENTHAL, 1987; MAEKAWA et al., 1998).

As proteases têm um papel importante nos mecanismos patogênicos e nos eventos de diferenciação de protozoários parasitas. O papel principal da atividade proteolítica de proteases na regulação da homeostase celular foi muito bem

descrito em várias espécies de leveduras e eucariotos superiores, como também no tripanosoma africano, *T. brucei* (HUA et al., 1996; TO; WANG, 1997).

Algumas modificações que ocorrem durante o ciclo de vida dos protozoários podem estar condicionadas à presença de proteases. Isto porque uma característica marcante do ciclo de vida dos protozoários parasitos é o profundo remodelamento morfológico que eles sofrem durante o seu desenvolvimento nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Algumas das mudanças mais marcantes ocorrem quando os parasitos deslocam-se de um meio extracelular para um meio intracelular. Todas estas mudanças morfológicas envolvem a reestruturação de organelas, como flagelos e cinetoplastos; e o rearranjo do citoesqueleto para acomodar as variações de forma. Um bom exemplo desta função das proteases foi estudado por Gonzáles et al. (1999), que demonstraram que as proteases são necessárias para o encistamento de *Entamoeba invadens*, um protozoário de répteis.

O papel das proteases no remodelamento de protozoários parasitos também foi descrito em *T. cruzi*. Foi demonstrado que a lactacistina inibe a transformação de tripomastigotas em amastigotas e também o desenvolvimento de amastigotas em tripomastigotas. Em relação à infectividade dos parasitos, estes autores demonstraram que a lactacistina não afeta a invasão de mioblastos por tripomastigotas; entretanto, o desenvolvimento intracelular dos parasitos é inibido (GONZALEZ et al., 1996). Resultados similares foram obtidos com outros protozoários parasitos como o *Plasmodium sp.*, mostrando que este tratamento inibe o seu desenvolvimento em formas exoeritrocitárias mas não altera sua capacidade de invasão (GANTT et al., 1998).

Também em *Toxoplasma gondii*, o tratamento dos taquizoítos com lactacistina não interferiu na entrada dos parasitos na célula hospedeira e nem no estabelecimento do vacúolo parasitóforo. Entretanto, o crescimento e replicação dos parasitos foram bloqueados (SHAW et al., 2000). Além disso, o bloqueio da invasão em muitos parasitos, incluindo *Plasmodium falciparum* (ROGGWILLE et al., 1996) e *Toxoplasma gondii* (CONSEIL; SOETE; DUBREMETZ, 1999) tem sido observado devido ao uso de inibidores específicos de serino proteases. Entre

Tripanosomatídeos, uma serino peptidase extracelular de *Trypanosoma cruzi* (denominada Tc 80) foi relatada (SANTANA et al., 1997). Esta enzima é essencial para a disseminação do parasito pelos tecidos do hospedeiro, porque ela foi altamente ativa contra proteínas de tecidos conectivos como colágeno tipo I e IV, conseqüentemente foi identificado como um bom alvo terapêutico para a doença de Chagas (SANTANA et al., 1997).

A importância da proteólise intracelular em protozoários do gênero *Leishmania* foi até hoje demonstrada apenas na espécie *Leishmania mexicana*. Robertson (1999) observou a inibição do crescimento *in vitro* de promastigotas e amastigotas após tratamento com inibidores de proteases. Durante seu desenvolvimento no hospedeiro, *Leishmania* libera antígenos em seu ambiente, especialmente proteínas que têm sido consideradas como fatores de virulência (CHANG et al., 2003).

As proteases extracelulares do parasito têm um papel crucial no seu ciclo de vida e na patogenia causada por ele (MCKERROW et al., 1993). Elas têm sido associadas a uma ampla variedade de mecanismos de adaptação, para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, que além da modulação da resposta do sistema imune, incluem a invasão e destruição de tecidos, capacidade do parasito migrar para locais específicos para o crescimento e desenvolvimento e/ou adquirir nutrientes essenciais que garantem a sobrevivência e proliferação para manutenção da infecção (ROUGGWILLE et al., 1996; COOMBS; MOTTRAM, 1997; ROSENTHAL, 1999; BURLEIGH; WOOLSEY, 2002).

A descrição de proteases em protozoários, principalmente em protozoários parasitos, em particular no *T. cruzi*, e a sugestão da sua participação em processos celulares essenciais para o estabelecimento desses parasitos em seus hospedeiros, levaram-nos à hipótese de semelhante importância em um outro tripanosomatídeo, a *Leishmania (L.) amazonensis*. Assim, nos propusemos avaliar a capacidade inibitória sobre proteases isoladas de amastigotas como um possível alvo terapêutico das substâncias químicas avaliadas neste estudo. Considerando a grande porcentagem de cisteíno proteases conhecidamente presentes em Leishmanias, e a fundamental importância desta para a sobrevivência e virulência

do parasito (COOMBS; MOTTRAM, 1997), este grupo de proteases representou um importante alvo no desenvolvimento deste trabalho.

1.6 TRATAMENTOS

O antimônio foi introduzido na terapêutica médica no século XV, empregado para diversas afecções. Sua toxicidade e ineficácia em muitos pacientes fizeram com que seu uso fosse proibido. Em 1630, o sal de antimônio trivalente, denominado emético, foi introduzido na medicina. Sua utilização foi novamente abandonada nos séculos XVIII e XIX, até que, em 1907, foi relatada a atividade do tártaro emético contra tripanossomas africanos. Em 1912 foram publicados os resultados obtidos por Vianna no tratamento da úlcera de Bauru e, cerca de três anos depois, o tártaro emético já estava sendo amplamente empregado no tratamento da leishmaniose visceral na Índia, sendo responsável pela redução da mortalidade dessa doença, de cerca de 90 para 5% dos pacientes (BRYCESON, 2000).

Os antimoniais trivalentes, extremamente tóxicos, foram, a partir de 1920, substituídos pelos antimoniais pentavalentes e, a partir dos anos 40, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumine passaram a representar os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (CROFT; YARDLEY, 2002).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está bem esclarecido. Dentre os vários alvos potenciais, descritos como responsáveis pela atividade anti-*Leishmania* estão a glicólise (BERMAN; GALLALEE; BEST, 1987), DNA topoisomerase I (LUCUMI et al., 1998), oxidação de ácidos (BERMAN et al., 1989) e tripanotiona redutase (CUNNINGHAM; ZVELEBIL; FAIRLAMB, 1994). Esta última é uma enzima análoga a glutatona redutase em mamíferos, que participa na proteção celular contra o estresse oxidativo, comprometendo o potencial redox da célula e induzindo o acúmulo de disulfitos (CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 1995). Há ainda evidências de que antimoniais poderiam agir desencadeando apoptose (SERENO et al., 2001).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{V}) são administrados por via parenteral. No interior do macrófago, são convertidos em antimoniais trivalentes (Sb^{III}), compostos mais tóxicos contra os dois estágios de *Leishmania* (FREZARD et al., 2001) e também para o homem.

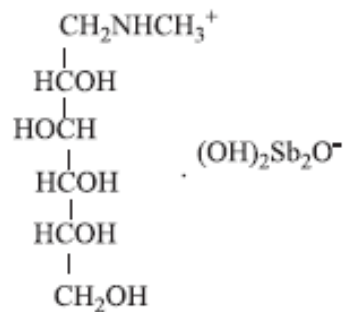


FIGURA 2: Estrutura química do antimonial pentavalente

Estas drogas induzem uma variedade de efeitos adversos (alguns deles bem graves) tais como: artralgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, dor abdominal, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitações, insônia, nervosismo, insuficiência renal, arritmias, anemia e tosse (RAVDIN, 1990; KHAW; PANOSIAN, 1995). Outros efeitos como supressão da medula óssea, hepatotoxicidade e pancreatite química também podem ocorrer (HEPBURN, 2000). A eficácia destas drogas é variável devido à dosagem baixa e descontínua, sendo as causas de maior importância no número de recaídas e resistência de *Leishmania* (SUNDAR et al., 2001).

A anfotericina B (FIGURA 3) é a droga de segunda escolha, sendo altamente efetiva no tratamento das leishmanioses resistentes aos antimoniais (OLLIARO; BRYCESON, 1993). O metabolismo dos esteróis em *Leishmania* é particular, sendo o ergosterol o mais importante esteroide de membrana neste parasito, o que o diferencia da célula hospedeira, onde o colesterol é o componente esteroide predominante na membrana plasmática (BEACH; GOAD; HOLZ, 1998). O macrolídeo anfotericina B tem alta afinidade por episterol, que é um precursor do ergosterol (SINGH; PANDEY; SUNDAR, 2006), o que leva a uma alteração na composição da membrana, produzindo poros e alterando a

permeabilidade, causando o escape de íons e, portanto, morte do parasito (LYMAN; WALSH, 1992; BALANA-FOUCE, 1998).

A anfotericina B é administrada por via endovenosa, sendo seu uso limitado devido à sua toxicidade, apresentando efeitos como anafilaxia, trombocitopenia, anorexia, anemia, dor muscular, febre, tremor, calafrio, disfunção renal, entre outros (KHAW; PANOSIAN, 1995). Novas formulações de anfotericina B associada a lipídeos conferem propriedades peculiares resultando na preferencial sensibilidade a macrófagos infectados por *Leishmania* além de apresentarem grande redução da toxicidade (DAVIDSON et al., 1994; HAY, 1994; SEAMAN et al., 1995).

Entre essas formulações, temos a anfotericina B lipossomal (Ambisome[®]), anfotericina B em complexos lipídicos (Abelcet[®]) e anfotericina B colesterol dispersão (Anfotec[®]), que estão sendo aplicadas com êxito para leishmaniose visceral. Existem diferenças regionais na resposta a essas formulações que podem ser devidas à espécie de *Leishmania*, carga parasitária ou idade do paciente. Na Índia, onde o kalazar ocorre em crianças e adultos, a melhor resposta é obtida com Ambisome[®] e Abelcet[®]. No Brasil, onde a maioria dos casos se dá em crianças, Anfotec[®] parece ser mais efetivo, enquanto no Mediterrâneo, onde crianças jovens são atingidas, altas doses de Ambisome[®] são necessárias (MURRAY et al., 2005). Entretanto, o alto custo é o principal fator limitante em países onde a doença é endêmica (BERMAN, 1998).

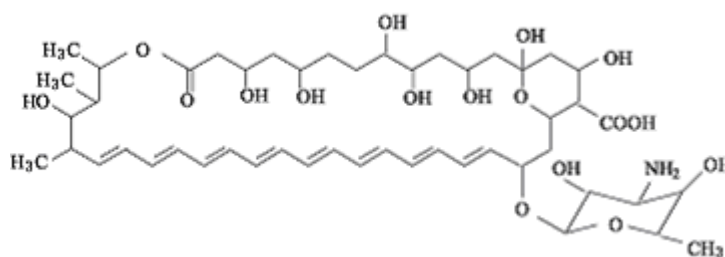


FIGURA 3: Estrutura química da anfotericina B

A pentamidina (FIGURA 4) é uma diamina aromática que pode ser usada em casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais (SANDS; KRON, 1985;

HERWALDT, 1999). Tem sido aplicada no Brasil principalmente para o tratamento de infecções por *L. (V.) guyanensis*, que geralmente respondem mal ao tratamento com antimonialis. Seu mecanismo de ação não está bem definido, mas parece ocorrer inibição da síntese das poliaminas arginina, petruscina e espermidina (BRAY et al., 2003). Esta droga também pode atuar como intercalante de DNA do cinetoplasto e da mitocôndria (HENTZE; KOBAYASHI, 1977), interferindo na replicação, transcrição, ou ambas (SANDS; KRON, 1985; KANDPAL et al., 1995; BASSELIN; BADET-DENISOT; ROBERT-GERO, 1998). Estudos recentes têm demonstrado que a mitocôndria é um importante alvo desta droga (BASSELIN et al., 2002), afetando também o potencial de membrana (VERCESI; DOCAMPO, 1992; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Esta diamina pode ser administrada por via endovenosa, e com frequência produz efeitos adversos como taquicardia, hipotensão, dor de cabeça, vômitos, náuseas, erupção cutânea, disfunção renal e outros como hipoglicemia ou hiperglicemia (CONTE, 1991). Menos frequentemente, induz arritmias, alucinações, leucopenia, febre e hipocalcemia (VOHRINGER; ARASTH, 1993).

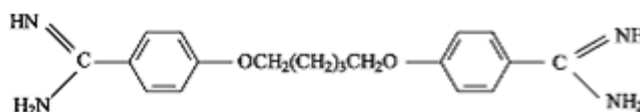


FIGURA 4: Estrutura química da pentamidina

A paromomicina (FIGURA 5) é um antibiótico da família dos aminoglicosídeos que, além da aplicação parenteral, está sendo avaliada por via tópica em leishmaniose cutânea (EL-ON et al., 1992). Seu mecanismo de ação é desconhecido, mas sabe-se que altera a síntese de proteína e sugeriu-se que interfere na cascata mitocondrial, com a perda do potencial de membrana e respiração, através da inibição no abastecimento de substratos para o metabolismo da mitocôndria (MAAROUF et al., 1997a). Existem também evidências de que este antibiótico altere a captação de precursores de

macromoléculas dificultando o crescimento do parasito. E de que altere a composição de lipídeos na membrana, provocando diminuição na fluidez (MAAROUF et al, 1997b).

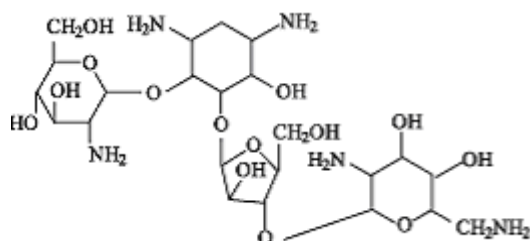


FIGURA 5: Estrutura química da paramomicina

O miltefosine é um derivado alquil-lisofosfolipídico, com atividade antiproliferativa, que foi inicialmente testado por suas propriedades anti-tumorais. Recentemente, começou a ser utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral, constituindo-se na primeira droga bem sucedida por via oral (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Esta droga está sendo avaliada em diferentes partes do mundo. Os testes realizados na Índia indicaram boa atividade contra leishmaniose visceral, com eficácia de 95% (BHATTACHARYA et al., 2007). Já nas Américas, testada para o tratamento de leishmaniose cutânea, apresentou diferentes resultados clínicos. Na Colômbia, sua utilização levou a cura em 91% dos pacientes, enquanto que na Guatemala a eficácia foi de 53% (SOTO; BERMAN, 2006). A atividade do miltefosine contra *Leishmania* está relacionada à alteração da composição da membrana, com redução do conteúdo de fosfatidilcolina e ergosterol (RAKOTOMANGA et al., 2007).

As reações adversas mais freqüentes, relacionadas ao uso de miltefosine são distúrbios gastrintestinais transitórios como vômitos e diarréia. A maior limitação ao seu uso até o momento está relacionada aos efeitos teratogênicos (CROFT; COOMBS, 2003; BHATTACHARYA et al., 2004).

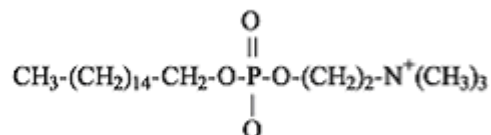


FIGURA 6: Estrutura química do miltefosine

Um outro grupo de drogas em estudo na atualidade é representado por bifosfonatos, como residronato e pamidronato. Estes compostos parecem interferir na síntese de farnesil pirofosfato e geranil pirofosfato, que são metabólitos chave para a isoprenilação de proteínas (MARTIN et al., 2001). São compostos com atividade leishmanicida, mas também apresentam alta toxicidade (RODRIGUES et al., 2002).

A atividade leishmanicida foi também demonstrada para compostos azólicos, tais como cetoconazol e itraconazol (BERMAN et al., 1986; URBINA, 1997), mas testes clínicos revelaram ineficácia no tratamento de leishmaniose humana (NAVIN et al., 1992; MURRAY et al., 2005; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Mais recentemente, um outro fármaco desse grupo, o fluconazol, está sendo testado para a forma cutânea com resultados favoráveis, devido a sua alta concentração na pele. O mecanismo de ação destes compostos esta baseado na inibição da síntese do lanosterol (NAVIN et al., 1992; OLLIARO; BRYCESON, 1993). Seus efeitos colaterais são geralmente hepatotoxicidade, prejuízo na produção de testosterona e disfunção renal (VIDAL-PUIG et al., 1994).

O alopurinol é utilizado como substrato de várias enzimas na via das purinas em tripanosomatídeos, podendo ser seletivamente incorporado em vários nucleotídeos intermediários no parasita e, portanto, levando a inibição da síntese de novas purinas (MARR, 1991). Usado no tratamento de leishmaniose canina, tem pouca eficácia em humanos, devido ao rápido metabolismo e excreção do fármaco, mas poderia ter aplicação em combinação com outras drogas (NELSON et al., 1979).

1.6.1 Resistência ao tratamento

Durante mais de 70 anos, apesar de sua alta toxicidade, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados como drogas de primeira escolha para tratar leishmanioses cutânea e visceral. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosine são drogas de interesse por representarem novas alternativas de tratamento contra esta doença, no entanto, problemas com efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação, seguem sendo os grandes problemas.

Além da toxicidade que possuem os medicamentos anti-*Leishmania*, outro grave problema que dificulta o tratamento da doença recai no desenvolvimento de resistência pelo parasito (NARE et al., 1997; MCKEROW, 1990; THAKUR et al., 2001). Temos assim, que o uso de antimoniais como primeira linha de tratamento em muitas partes do mundo está ameaçado, dado o desenvolvimento de resistência nos últimos 15 anos. Recentemente, estudos demonstraram que na Índia quase 80% dos parasitos isolados são resistentes aos antimoniais (SUNDAR et al., 2001). Um dos mecanismos de resistência induzida aos antimoniais já identificados é a amplificação do gene que codifica um transportador do tipo ABC, responsável pela extrusão da droga (HAIMEUR; OUELLETTE, 1998). Outros mecanismos, entretanto, parecem estar associados à resistência natural (SINGH; SINGH; SUNDAR, 2003).

No caso das drogas de segunda escolha, como a anfotericina B e a pentamidina, não parece que a resistência seja um limitante para seu uso clínico (PEREZ VICTORIA et al., 2006). Até o momento, não existem registros de resistência aos compostos ainda em fase de avaliação para o tratamento de leishmaniose como paromomicina, azóis e bifosfonatos, possivelmente devido a seu uso limitado até o momento. Entretanto, sabe-se que a obtenção de cepas resistentes *in vitro* ao miltefosine é bastante fácil, pelo que as expectativas de seu uso em larga escala se tornam um tanto quanto limitadas.

Neste contexto, a busca por compostos ativos, que possam dar origem a novas drogas anti-*Leishmania* apresenta-se como uma necessidade urgente, dada a ineficácia dos tratamentos atuais, sua alta toxicidade e o aparecimento cada vez

mais comum de cepas resistentes às terapias convencionais. Assim, substâncias químicas provenientes de recursos naturais representam uma grande fonte de compostos, os mais variáveis possíveis, que merecem ser investigadas quanto as suas atividades biológicas, na esperança da obtenção de uma entidade química mais eficaz para o tratamento das leishmanioses e menos tóxica para o hospedeiro humano.

1.7 PLANTAS MEDICINAIS

Segundo Ferreira (1998), plantas medicinais são aquelas que possuem uma determinada atividade biológica, contendo um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana.

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. E, ainda nos dias de hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

Existem relatos do uso de plantas medicinais, inclusive nas mais antigas fontes escritas médico-científicas, como as provenientes da Mesopotâmia e Egito, ou mesmo da medicina tradicional chinesa. A exemplo, pode-se citar o Papiro de Ebers, datado de 1550 a.C., com mais de 20 metros de comprimento, que relaciona mais de 7000 substâncias medicinais presentes em mais de 800 fórmulas quantitativas (DIAS, 2005).

Os manipulados vegetais consistem no ponto forte da farmácia chinesa, principalmente em razão da diversidade dos climas na China que proporciona uma flora diversificada. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se, ao longo dos tempos, com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O uso popular de plantas medicinais contribui de forma relevante para a obtenção de informações terapêuticas importantes, que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal despertou, e ainda desperta, o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares sobre a flora mundial (MACIEL et al., 2002), em especial a flora brasileira (PINTO et al., 2002).

1.7.1 Plantas medicinais: pesquisa e indústria farmacêutica

A partir da publicação, em 1673, da “Histoire Général des Drogues” pelo farmacêutico Pierre Pomet, o estudo das plantas entrou no período científico, ao adotar a classificação e a descrição taxonômica, o que se traduziu numa identificação mais precisa das plantas utilizadas na medicina. No final do século XVIII começou, então, o isolamento e a determinação da estrutura dos constituintes ativos dos produtos de origem natural dotados de propriedades medicinais (DA CUNHA, 2008).

Até então a pesquisa de novos medicamentos era realizada através do *screening* de extratos e plantas. Este consistia no rastreamento de compostos ou extratos frente a diferentes atividades (DA CUNHA, 2008).

Além da herança cultural e da riqueza molecular, outros fatores foram e são responsáveis pelo incremento na pesquisa sobre plantas medicinais, tais como: insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis de muitos dos medicamentos alopáticos (CZEPULA, 2006).

Apesar do grande interesse nos produtos naturais, as indústrias farmacêuticas brasileiras ainda enfrentam alguns problemas em tal área, tais como: a necessidade de grandes esforços da indústria nacional para atender às diretrizes impostas pela política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos; os diminutos investimentos em pesquisa e desenvolvimento; a baixa qualificação de recursos humanos; e, a dificuldade no suprimento, armazenamento e

padronização de matérias-primas. Como resultado a Universidade Brasileira é o centro de pesquisas e eventualmente do desenvolvimento de medicamentos de plantas medicinais (FERREIRA, 1998).

Vistas as grandes dificuldades no tratamento de doenças ocasionadas por protozoários, em especial a leishmaniose, este estudo se propoz a avaliar a atividade leishmanicida de extratos do pericarpo de *Garcinia brasiliensis*, buscando o isolamento de moléculas com grande potencial terapêutico para uso no tratamento das leishmanioses, uma vez que substâncias com potencial antiparasitário vêm sendo isoladas de plantas desta família nos últimos anos, como polifenóis de *G. vieillardii* (HAY et al., 2008), xantonas de *G. livingstonei* (MBWAMBO et al., 2006) e alcalóides isolados de *G. lucida* (FOTIE et al., 2007).

1.8 FAMÍLIA GUTTIFERAE

A família Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae, pertence à classe das Angiospermas e é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies. A família Guttiferae possui 49 gêneros (por exemplo: *Vismia* (NGUEMEVINGA et al., 2006), *Garcinia* (DEACHATHAI et al., 2006), *Clusia* (DIASA et al., 2006), *Cratoxylum* (BOONSRIA et al., 2006), *Harungana* (TIH et al., 2006), *Mesua* (UAWONGGUL et al., 2006), *Hypericum* (MÁRTONFI; REPČÁK; ZANVIT, 2006), *Kielmeyera* (ZAGOTOA et al., 2006) e mais de 1000 espécies distribuídas em 6 subfamílias, todas com representantes no Brasil (JOLY, 1993).

As plantas desta família são lenhosas, arbóreas ou arbustivas, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas, isoladas ou reunidas em inflorescência. Flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial (JOLY, 1993).

A família Guttiferae é dotada de uma ampla variedade de metabólitos biologicamente ativos como: antraquinonas, flavonóides, xantonas, floroglucínóis (BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001) e benzofenonas (OLIVEIRA et al., 1999). Graças a essa gama de constituintes, às espécies desta família têm sido relatadas atividades como antidepressiva (ZAGOTOA et al., 2006; MEDINA et al., 2006), antibacteriana (ALMEIDA et al., 2008), citotóxica (BOONSRIA et al., 2006), antimalárica (LEE et al., 2003), antioxidante (RAO et al., 2004), antiaflatoxinogênica (JOSEPH et al., 2005) e tripanocida (LENTA et al., 2007a; LENTA et al., 2007b; ABE et al., 2004;).

1.8.1 O Gênero *Garcinia*

O gênero *Garcinia*, também denominado como *Rheedia*, é constituído por diversas espécies, podendo-se citar: *Garcinia cowa*, *Garcinia gardneriana*, *Garcinia mangostana* e *Garcinia brasiliensis*. Estudos de tais espécies têm demonstrado uma considerável diversidade de atividades e constituintes químicos (BRAZ-FILHO et al., 1970; DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1988).

Extratos de *Garcinia pedunculata* demonstraram atividade antioxidante e antimutagênica (JAYAPRAKASHA; NEGI; JENA, 2006); a *Garcinia cambogia* vem sendo utilizada no tratamento de obesidade (HAYAMIZU et al., 2003); o extrato aquoso de *Garcinia mangostana* demonstrou *in vitro* atividade antileucêmica (CHIANG et al., 2004) e o extrato de *Garcinia pedicillata* apresentou atividade contra a forma amastigota de *L. amazonensis* (BILLO et al., 2005), assim como o extrato bruto de *Garcinia lucida*, que apresentou atividade sobre formas promastigotas de *L. donovani* (FOTIE et al., 2007) e compostos isolados de *G. livingstonei*, que apresentaram atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. infantum* (MBWANBO et al., 2006).

Dos frutos de *Garcinia cowa*, Panthong e colaboradores (2006), isolaram as cowaxantonas A-E, e a elas foi atribuída a atividade antibacteriana. Guttíferonas isoladas de diferentes gêneros e espécies da família Guttiferae demonstraram, *in vitro*, efeitos citopáticos contra o HIV (GUSTAFSON et al., 1992). O ácido gambógico, isolado da resina extraída da árvore de *Garcinia hanburyi*, apresentou, segundo GUO et al. (2006), atividade anticâncer; sementes de *Garcinia kola* contêm uma complexa mistura de biflavonóides, benzofenonas preniladas e xantonas (IWU et al., 2002). Estudos químicos de frutos de *Rheedia gardneriana* demonstraram a presença de alguns constituintes com considerável poder antioxidante, como os biflavonóides (fukugetina), xantonas, benzofenonas poliisopreniladas, triterpenos e cumarinas (SANTOS et al., 1996).

1.8.1.1 A espécie *Garcinia brasiliensis*

A espécie *Garcinia brasiliensis* Mart., ou *Rheedia brasiliensis* Planch e Triana, é cultivada em todo o território brasileiro, sendo conhecida popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari no Brasil, e como guapomo na Bolívia. É uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (MORTON, 1987).

O bacuparizeiro é uma árvore em forma de pirâmide rica em um látex amarelo. As folhas são em formato de lança. As flores são abundantes e polígamas. Os frutos são comestíveis (POTT; POTT; SOBRINHO, 2004) (FIGURA 7), ovais com a casca (pericarpo) elástica e amarela que pode ser facilmente removida, a polpa é branca, suave, saborosa e possui 2 a 3 sementes (MORTON, 1987). Como descrito por Villagómez Rojas (1990), as sementes apresentam forma elipsoidal, com coloração externa castanha e com linhas claras, longitudinalmente, bem visíveis, semelhantes a nervuras. Internamente, são de coloração branco-amarelada e exsudam látex amarelo (NASCIMENTO; CARVALHO; MÜLLER, 2002) (FIGURA 8). Cerca de 8 a 9% do peso das sementes é referente ao óleo que é utilizado em cataplasmas para o tratamento

de feridas e panarício (espécie de furúnculo). A infusão da polpa possui ação narcótica semelhante à nicotina (MORTON, 1987). Os frutos são ainda utilizados no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1926; CORRÊA; PENNA, 1984). Compostos isolados do pericarpo desta planta já apresentaram atividade tripanocida contra *T. cruzi* (ALVES et al., 1999), entretanto, não existe relato na literatura de avaliações dos extratos do pericarpo desta planta, ou de compostos isolados deste sobre *Leishmania*.



FIGURA 7 - Frutos de *Garcinia brasiliensis*



FIGURA 8- Semente e poupa de *Garcinia brasiliensis* em fruto cortado transversalmente

1.8.2 Estudos fitoquímicos

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que o gênero *Garcinia*, é rico em compostos fenólicos, nomeadamente as benzofenonas, xantonas e flavonóides (DELLE MONACHE et al., 1983; DELLE MONACHE et al., 1984).

As benzofenonas poliisopreniladas caracterizam-se pela presença do núcleo difenilmetanona (FIGURA 9) substituído por grupo(s) isoprenila(s) (3-metil-2-butenila). Muitos dos representantes desta classe apresentam um padrão de oxigenação tríplice em um dos anéis aromáticos do cerne difenilmetanona e uma ciclização intramolecular, que juntos são responsáveis pela formação do anel biciclo[3.3.1]nonano (FIGURA 10) (MARTINS, 2008).

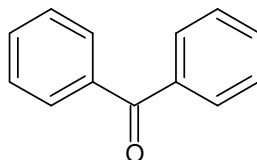


FIGURA 9 - Anel difenilmetanona

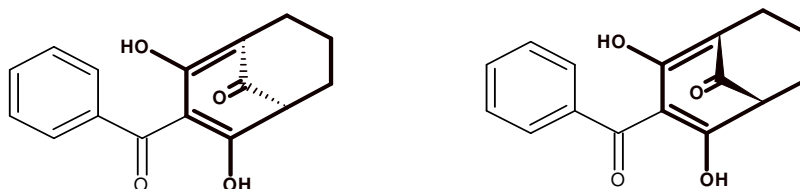


FIGURA 10 – Em negrito, o anel biciclo[3.3.1]nonano como resultado da oxigenação tripla e ciclização do anel difenilmetanona.

Pela presença desse anel biciclo[3.3.1]nonano, as benzofenonas poliisopreniladas são também classificadas como acilfloroglucinois poliprenilados policíclicos do tipo B. Como exemplos, podem-se citar o garcinol, as guttiferonas A, C, D, E, F, e I, a 7-*epi*-clusianona, e as hiperibonas H, I e L (CIOCHINA; GROSSMAN, 2006).

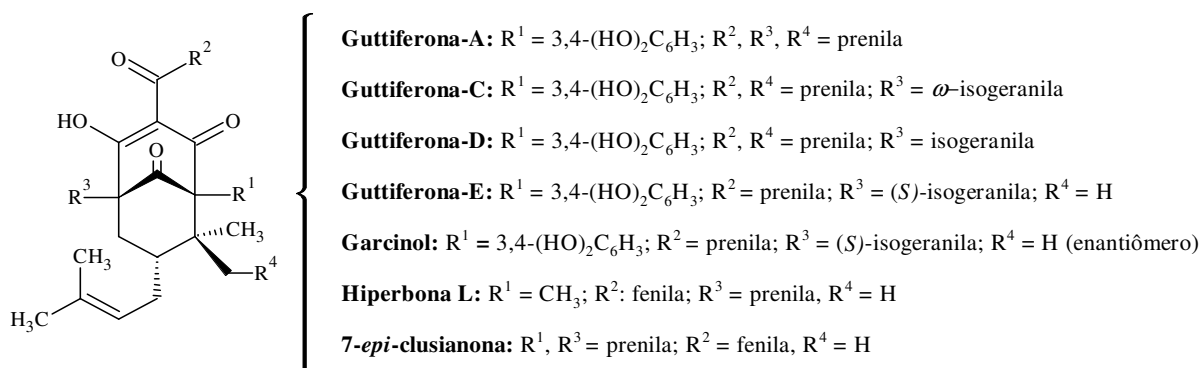


FIGURA 11 – Exemplos de acilfloroglucinois poliprenilados.

Fonte: CIOCHINA; GROSSMAN (2006, p. 3971)

No presente trabalho, foram estudadas três benzofenonas, a 7-*epi*-clusianona, a guttiferona-a e a garciniafenona, isoladas do extrato hexânico, e o biflavonóide fukugetina também chamado morelloflavona, isolado do extrato acetato etílico do pericarpo de *Garcinia brasiliensis*.

A garciniafenona (FIGURA 12), cujo isolamento e elucidação estrutural foram descritos por Derogis et al., 2008. É muito semelhante à 7-*epi*-clusianona, diferindo apenas na ausência de um grupamento prenila.

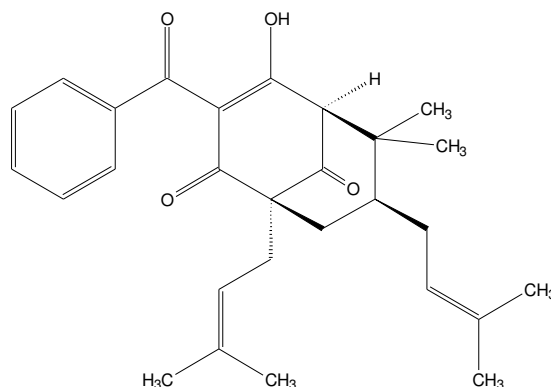


FIGURA 12: Estrutura da benzofenona poliprenilada garciniafenona

A guttiferona-a (FIGURA 11) foi primeiramente isolada de *Symphonia globulifera* e descrita com atividade anti-HIV (GUSTAFSON et al., 1992). Trabalhos posteriores demonstraram as atividades tripanocida (ABE, et al., 2004), sequestrante de radicais (NGOUELA et al., 2006), leishmanicida *in vitro* e anticolinesterásica (LENTA et al., 2007a); e antiproteolítica (MARTINS et al., 2008b). A estrutura de raios-X foi elucidada por Martins et al., 2007.

A 7-*epi*-clusianona (FIGURA 11) foi primeiramente isolada dos frutos de *Rheedia gardneriana* (SANTOS et al., 1999), apresenta atividade contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi in vitro* (ALVES et al., 1999); em baixas concentrações, é vasodilatadora e, em altas concentrações, vasocronstritora (CRUZ et al., 2006); e, no estudo de Neves et al. (2007) mostrou-se antianafilática.

A fukugetina (FIGURA 13), é um biflavonóide que foi obtido inicialmente de plantas da espécie *Garcinia* spp. Estruturalmente, biflavonóides são moléculas polifenólicas compostas por dois flavonóides idênticos ou não, unidos de forma simétrica ou assimétrica por um ligante alquil ou alcóxi. As possíveis variações dependem das permutações na posição e natureza dos ligantes inter-flavonóides, o que lhes confere uma significativa diversidade estrutural. A fukugetina apresenta atividade antiinflamatória, por inibir fosfolipase A2 e ciclooxygenase-2 (LIM et al., 2006; CHEN et al., 2006). Como descrito por Mbwambo (2006), não apresenta atividade contra *T. cruzi* ou *L. infantum*. Esta molécula apresentou também atividade inibitória sobre transcriptase reversa do vírus HIV-1 (LIN et al., 1997).

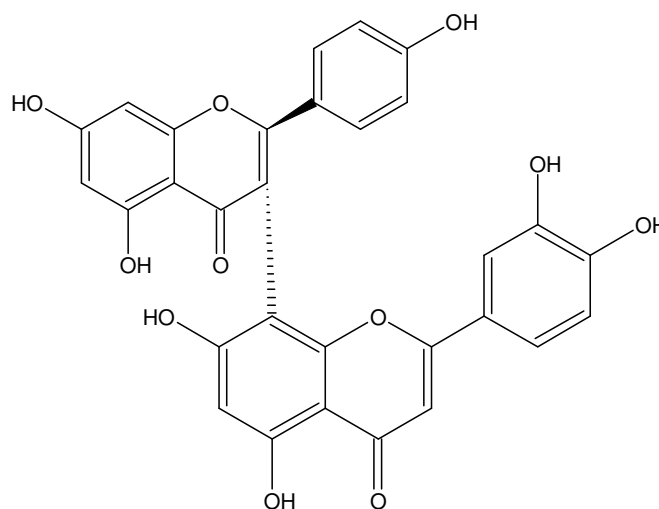


FIGURA 13: Estrutura do biflavonóide Fukugetina

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F. et al. Trypanocidal constituents in plants 3.1) leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 27, n. 1, p. 141-143, jan. 2004.

ABRAMSON, M. A. et al. Comparison of new and old-world leishmanins in an endemic region of Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 5, p. 1292-1297, 1995.

ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J. Immun.**, v. 161, p. 6794-6801, 1998.

ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, 15, p. 886-891, 2008.

ALVES, T. M. A. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal of natural products**, Washington, v.62, n.2, p.369-371, fev. 1999.

APODACA, G.; MCKERROW, J. H. Purification and characterization of a 27,000-Mr extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. **Infection and Immunity**, 57, p. 3072-3080, 1989.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Inter. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

BAILY, G. C.; NANDY, A. Visceral leishmaniasis: more prevalent and more problematic. **J. Infect.**, v. 29, n. 3, p. 241-247, 1994.

BALANA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 3, p. 241-247, 1998.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 583-600, maio 2001.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M. A.; ROBERT-GERO, M. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. **Acta Trop.**, v. 70, n. 1, p. 43-46, 1998.

BASSELIN, M. et al. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 12, p. 3731-3738, 2002.

BATTES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, v. 79, n. 2, p. 215-218, 1994.

BAZAN, J. F.; FLETTERICK, R. J. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 85, p. 7872-7876, 1988.

BEACH, D. H.; GOAD, L. J.; HOLZ, G. G. J. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 31, n. 2, p. 149-162, 1998.

BERMAN, J. D. et al. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 20, n. 1, p. 85-92, 1986.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, n. 2, p. 197-201, 1987.

BERMAN, J. D. et al. Biochemistry of pentostan resistant *Leishmania*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 2, n. 40, p. 159-164, 1989.

BERMAN, J. D. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (ambisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bull. World Health Organ.**, v. 76, n. 1, p. 25-32, 1998.

BHATTACHARYA, S. K. et al. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 4, p. 591-598, 2007.

BHATTACHARYA, S. K. et al. Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 2, p. 217-221, 2004.

BILLO, M. et al. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v. 96, n.3, p. 569-575, jan. 2005.

BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the proteinase-protein inhibitor interaction. In: Avilés, F. X. **Innovations in proteases and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p. 81-122, 1992.

BOONSRIA, S. et al. Antibacterial and cytotoxic xanthonones from the roots of *Cratoxylum formosum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 723-727, abr. 2006

BRANDÃO FILHO S.; SHAW J. Leishmaniasis in Brazil. **Parasitol Today**, 10, p. 329-330, 1994.

BRAZ-FILHO, R.; MAGALHÃES, G. C.; GOTTLIEB O. R. Xanthonones of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v.9, n.3, p. 673, 1970.

BRAY, P.G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

BRYCESON, A. Visceral leishmaniasis in India. **Lancet.**, v. 356, p. 1399, 2000.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, 4, p. 701–711, 2002.

BUXBAUM, L. U. et al. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. **The Journal of Immunology**, 171, p. 3711–3717, 2003.

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol.**, v. 159, n. 12, p. 6131-6139, 1997.

CHANG, K. P. et al. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, 85, p. 375–390, 2003.

CHEN, H. J. et al. Synthesis of phospholipase A2 inhibitory biflavonoids. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 16, p. 2373, 2006.

CHIANG, L. et al. *In vitro* evaluation of antileukemic activity of 17 commonly used fruits and vegetables in Taiwan. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, n. 5, p. 539-544, ago. 2004.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R. B. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, Washington, v. 106, n. 9, p. 3963-3986, set. 2006.

COOMBS, G. H.; BAXTER, J. Inhibition of *Leishmania* amastigote growth by antipain and leupeptin. **Ann. Trop. Méd. Parasitol.**, 78, p. 21-24, 1984.

COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J. C. Proteases in trypanosomatids. In: Hide, G. et al. **Trypanosomiasis and leishmaniasis**. London: CAB International, 1997. p 176–197.

COOPER, J. B. Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. **Current Drug Targets.**, v. 3, p. 155-173, 2002.

CONSEIL, V.; SOETE, M.; DUBREMETZ, J. F. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46, p. 1358–1361, 1999.

CONTE, J. J. Pharmacokinetics of intravenous pentamidine in patients with normal renal function or receiving hemodialysis. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 1, p. 169-175, 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p. 232-234, 1926.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

CROFT, S.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol., Rev.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CRUZ, A. J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**, Inglaterra, v. 13, n. 6, p. 442–445, 2006.

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf>, Acesso em: 07 abr. 2008.

CUNNINGHAM, M. L.; ZVELEBIL, M. J.; FAIRLAMB, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. **Eur. J. Biochem.**, v. 221, n. 1, p. 285-295, 1994.

CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterization and inhibition by trivalent antimonials. **Eur. J. Biochem.**, v. 230, n. 2, p. 460-468, 1995.

CZEPULA, A. I. S. **Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola drilobata* (L.) Pruski (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia padulosa*) (ASTERACEAE) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica *in vivo***. 2006. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2006.

DAVIDSON, R. N. et al. Liposomal amphotericin B (ambisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. **Q. J. Med.**, v. 87, n. 2, p. 75-81, 1994.

DEACHATHAI, S. et al. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 464-469, mar. 2006.

DeCLERCK, Y. A. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **Eur. J. of Cancer.**, v. 36, p. 1258-1268, 2000.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; PINHEIRO, R.M.; Nemorosonol, a derivate of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 7, p. 2305-2308, 1988.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 655 – 659, set. 1983.

DELLE MONACHE, G. et al. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1757 – 1759, 1984.

DENISE, H. et al. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 60, p. 3190-3195, 2003.

DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 46, p. 278–282, jan. 2008

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 3-15, 2003.

DIAS, J. P. S. **A farmácia e a história:** uma introdução à história da farmácia, da farmacologia e da terapêutica. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2005

DIAS, A. T. C. et al. Aboveground biomass stock of native woodland on a Brazilian sandy coastal plain: estimates based on the dominant tree species. **Forest Ecology and Management**, v. 226, n. 1-3, p. 364-367, mai. 2006

EL-ON, J. et al. Topical treatment of old world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: A double-blind control study. **J. Am. Acad. Derma.**, v. 27, n. 2, p. 227-231, 1992.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** Academia Brasileira de Ciências. 1998.

FIOCRUZ, 2002. Leishmaniose. Online:
<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/images/ciclo>. Acessado em 20 de Janeiro, 2009.

FOTIE, J. et al. Trypanocidal and Antileishmanial Dihydrochelerythrine Derivatives from *Garcinia lucida*. **J. Nat. Prod.**, 70, p. 1650-1653, 2007.

FREZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.

FURTADO, T. A. **Doenças Infeciosas com Manifestações Dermatológicas**. In: Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1994. cap. Leishmaniose, p. 319-338.

GANTT, S. M. et al. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium spp.* **Antimicrob. Agents and Chemother.**, 42, p. 2731-2738, 1998.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, v. 167, n. 2, p. 893-901, 2001.

GONZALEZ, J. et al. Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. **Eur. J. of Biochem.**, 264, p. 897-904, 1999.

GONZALEZ, J. et al. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. **J. Exp. Med.**, 184, p. 1909-1918, 1996.

GRADONI, L.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, n. 1, p. 94-96, 1993.

GRIMALDI, G. J.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GRZONKA, Z. et al. structural studies on cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim. Pol.**, v. 49, n. 1, p. 1-20, 2001.

GUO, Q. et al. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. **Life Sciences**, v. 78, n. 11, p. 1238-1245, fev. 2006

GUSTAFSON, K. R. et al. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992

HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 7, p. 1689-1694, 1998.

HARKER, P. R. **Interação de promastigotas de Leishmania (Viannia) braziliensis com macrófagos da linhagem U-937**. f. 67, Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – faculdade de ciências da Saúde, universidade de Brasília, Brasília, 1992.

- HARTH G, et al. Peptide- fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intracellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, 58, p. 17-24, 1993
- HAY A. E. et al. Antileishmanial polyphenols from *Garcinia vieillardii*. **Fitoterapia**, 79, p. 42–46, 2008.
- HAY, R. J. Liposomal amphotericin B, ambisome. **J. Infect.** v. 28, n. 1, p. 35-43, 1994.
- HAYAMIZU, K. et al. Effects of *Garcinia cambogia* (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Current Therapeutic Research.** v. 64, n. 8, p. 551-567, set.-out. 2003.
- HENTZE, B.; KOBAYASHI, T. The structural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 7, n. 2, p. 157-166, 1977.
- HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet.**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- HUA, S. et al. Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. **Mol. and Biochem. Parasitol.**, 78, p. 33-46, 1996.
- IWU, M. M. et al. *Garcinia Kola*: a new look at an old adaptogenic agent. **Advances in Phytochemistry**, p.1 91-199, 2002.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; NEGI, P. S.; JENA, B. S. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.7, n.3, p.246-250, set. 2006.
- JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 6 ed. São Paulo: Editora Nacional. 1993, p. 332-334.
- JOSEPH, G. S. et al. Antiaflatoxic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v.101, n. 2, p. 153-160, 2005.

KANDPAL, M. et al. Kinetics and molecular characteristics of arginine transport by *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 71, n. 2, p. 193-201, 1995.

KHAW, M.; PANOSIAN, C. B. Human antiprotozoal therapy: past, present and future. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 427-439, 1995.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin. Dermatol.**, v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KLEMBBA, M., GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annual Review of Biochemistry**, 71, p. 275–305, 2002.

LAISON, R.; SHAW, J. J. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Evolution, classification and geographical distribution**, p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, 44, p. 94-105, 1992.

LEE, K. et al. Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 535-541, set. 2003.

LENTA, B. N. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007a.

LENTA, B. N. et al. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 8-12, 2007b.

LEWIS, D. J.; WARD, R. D. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Transmission and vectors**, p. 235-262.

LEWIS, D. H. Infection of tissue culture cells of low phagocytic by *Leishmania mexicana mexicana*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, p. 327-336, 1974.

LIM, K. H. et al. Effects of Anti-inflammatory Biflavonoid, Ginkgetin, on Chronic Skin Inflammation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 1046, 2006,

LIN, Y-M. et al. In Vitro Anti-HIV Activity of Biflavonoids Isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997.

- LUCUMI, A. et al. Sensitivity of *Leishmania Viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable dnaprotein complexes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 8, p. 1990-1995, 1998.
- LUZ, Z. M. P. et al. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região Metropolitana de Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 249-254, 2001.
- LYMAN, C.; WALSH, T.J. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. **Drug.**, v. 44, n. 1, p. 9-35, 1992.
- MAAROUF, M. et al. *In vivo* interference of paramomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. **Exp. Cell. Res.**, v. 232, n. 2, p. 339-348, 1997a.
- MAAROUF, M. et al. Biochemical alterations in paramomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitol. Res.**, v. 83, n. 2, p. 98-102, 1997b.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002
- MAEKAWA, Y. et al. Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with Cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 161, p. 2120-2127, 1998,
- MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTASKI, W. A. Parasitologia Médica. In: Rio de Jneira: Guanabara Koogan, 2003. cap. **Outros Protozoários que Habitam o Sangue e os Tecidos**, p. 115-176.
- MARR, J. J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, n. 2, p. 111-119, 1991.
- MARTIN, M. B. et al. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosome brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* ad *Plamodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. **J. Med. Chem.** v. 44, n. 6, p. 906-916, 2001.
- MARTINS, F. T. **Estudo cristalquímico de benzofenonas preniladas extraídas de sementes e frutos de *Rheedia brasiliensis*: estrutura cristalina e relação estrutura-atividade.** 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2008

MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2008b, em submissão.

MARTINS, F. T. et al. Natural Polyprenylated Benzophenones: Keto-Enol Tautomerism and Stereochemistry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1515-1523, 2007.

MÁRTONFI, P.; REPČÁK, M.; ZANVIT, P. Secondary metabolites variation in *Hypericum maculatum* and its relatives. **Biochemical systematics and ecology**, v. 34, n. 1, p. 56-59, 2006.

MAYER, R. et al. Peptide derivatives specific for a *Plasmodium falciparum* proteinase inhibit the erythrocyte invasion by merozoites. **J. Méd. Chem.**, v. 34, p. 3029-3035, 1991.

MBWAMBO, Z. H. et al. Antiparasitic Activity of Some Xanthenes and Biflavonoids from the Root Bark of *Garcinia livingstonei*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 369-372, 2006.

MCKERROW, J. H. Development of cysteine inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, n. 6, p. 833-837, 1990.

MCKERROW, J. H. et al. The proteases and the pathogenicity of parasitic protozoa. **Annual Review Microbiology**, v. 47, p. 821-853, 1993.

MCKERROW, J. H.; MCGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasitic drug design. **Parasitol Today**, v. 11, p. 279-282, 1995.

MEDINA, M. A. et al. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? **Life Science**, v. 79, n. 2, p.105-111, jun. 2006

MS/FUNASA. **Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral**. In: Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional da Saúde, Brasília. ed 2, p. 27, maio 2002.

MOLYNEUX, H. D.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in Biology and Medicine. In: London: Academic Press, 1987. cap. **Morphology, ultrastructure and life cycles**, p. 551-582.

MORIHARA, K. Comparative specificity of microbial proteinases. **Advances in Enzymology and Related areas of Molecular Biology**, v. 41, p. 179–243, 1974.

MORTON, J. **Fruits of warm climate**. Miami: Julia F. Morton, 1987, p. 309-310.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, p. 455–460, 1998.

MOTTRAM, J. C. et al. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 93, p. 6008–6013, 1996.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 375–381, 2004.

MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A. S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **BMC Molecular Biology**, v. 6, p. 3, 2005.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet.**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NARE, B. et al. New approaches to *Leishmania* chemotherapy: pteridine reductase 1 (ptr1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitology**, v. 114, p. 101-110, 1997

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. Caracterização morfológica da semente e da plântula de bacurizinho (*Rheedia acuminata* (Ruiz et Pav.) Plachon et Triana - CLUSIACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 555-558, ago. 2002

NAVIN, T. R. et al. Placebocontrolled clinical trial of sodium stibogluconate (pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 3, p. 528-534, 1992.

NELSON, D. J. et al. Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. Biological effects, metabolism, and enzymatic phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 254, n. 22, p. 11544-11549, 1979.

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic Properties of 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Medica**, Alemanha, v. 73, p. 644-649, jun. 2007.

NGOUELA, S. et al. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochemistry**, v. 67, n. 3, p. 302-306, 2006.

NGUEMEVINGA, J. R. et al. Laurentixanthonones A and B, antimicrobial xanthonones from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 13, p. 1341-1346, 2006

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Two polyisoprenylated benzophenones from floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073-1079, 1999.

OLLIARO, P.; BRYCESON, A. D. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 9, p. 323-328, 1993.

OMARA-OPYENE, A. L.; GEDAMU, L. Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 90, p. 247-267, 1997.

PANTHONG, K. et al. Tetraoxygenated xanthonones from the fruits of *Garcinia cowa*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 10, p. 999-1004, mai. 2006.

PEARSON, R. D. et al. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 131, p. 1994-1999, 1983.

PEREZ VICTORIA, F.J. et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist. Updat.**, v. 9, n. 1-2, p. 26-39, 2006.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, jan./fev. 2002.

POTT, A.; POTT, V. J.; SOBRINHO, A. A. B. Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal. **IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal**, Corumbá. 2004

POWERS, J. C. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4639-4750, 2002.

QUE, X.; REED, S. L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 13, p. 196-206, 2000.

RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. *Leishmania*/HIV co-infecção in Brazil: an appraisal. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 17-28, 2003.

RAHMAN, M.; RIAZ, M.; DESAI, U. R. Synthesis of Biologically Relevant Biflavanoids – A Review. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, 2007.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.

RAO, L. J. M. et al. Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* planch and triana syn). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 31-36, jan. 2004

RAVDIN, J. I. Principles and Practice of Infectious Diseases. In: New York: Churchill Livingstone, 1990. cap. **Protozoal Diseases**, p. 2035-2130.

ROBERTS, L. S.; JANOBY, J. J. Foundations of parasitology. In: . New York: McGraw-Hill, 2000. cap. **Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin**, p. 55-81.

ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. Multiple high activity cysteine proteases of *Leishmania mexicana* are encoded by the *Imcpb* gene array. **Microbiology**, v. 140 (Pt 2), p. 417–424, 1994.

ROBERTSON, C. D. The *Leishmania mexicana* proteasome. **Mol. and Biochem. Parasitol.**, v. 103, p. 49-60, 1999.

RODRIGUES, N. et al. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the biphosphonate pamidronate. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 138-140, 2002.

ROGGWILLE, E. et al. A role for erythrocyte band 3 degradation by the parasite gp 76 serine protease in the formation of the parasitophorous vacuole during invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 82, p. 13–24, 1996.

ROSENTHAL, P. J. Identification of three stage-specific proteinases from *Plasmodium falciparum*. **J. Exp. Med.**, v. 166. p. 816-821, 1987.

ROSENTHAL, P. J. Proteases of protozoan parasites. **Adv. Parasitol.**, v. 43, p. 105–159, 1999.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SADIJ, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, p.1–21, 2002.

SAMUELSON, J. Patologia Estrutural e Funcional. In: . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. **Doenças Infecciosas**, p. 350-351.

SANDS, M.; KRON, M. A. Pentamidine: a review. **Rev. Infect. Dis.**, v. 7, n. 5, p. 625-634, 1985.

SANTANA, J. M. et al. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa protease with specificity for human collagen types I and IV. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 129–137, 1997.

SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.5, p.654-660, set./out. 1999

SANTOS, M. H. **Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* Pl. e Tr. e aplicações biológicas dos seus constituintes**. 1996. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996

SCHWARTZ, E.; HATZ, C. ; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 6, n. 6, p. 342-349, 2006.

SEAMAN, J. et al. Liposomal amphotericin B (ambisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. **Clin. Infect.**, v. 21, n. 1, p. 188-193, 1995.

SEGUNDO, B. S. Role of proteolytic enzymes in specific developmental processes in plants. Avilés F. X. **Innovations in protease and their inhibitors**. New York, Walter De Gruyter, p. 349-367,1993.

SERENO, D. et al. Antimonial mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SHAW, M. K. et al. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 121, p. 35-47, 2000.

- SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-291, 2001.
- SIMÕES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **Eur. J. Biochem.**, v. 271, p. 2067-2075, 2004.
- SINGH, N.; SINGH, R.; SUNDAR, S. Novel mechanism of drug resistance in kala-azar field isolates. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 4, p. 600-607, 2003.
- SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. **Indian. J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 331-344, 2006.
- SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of new world cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 10, n. 1, p. 34-40, 2006.
- SOUZA, G. F. et al. Leishmanicidal activity of primary s-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxid**, v. 15, n. 3, p. 209-216. 2006.
- SUNDAR, D. et al. Resistance to treatment in kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 3, p. 193-196, 2001.
- THAKUR, C. P. et al. *Leishmania* species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 2, p. 187-189, 2001.
- TIH, A. E. et al. Minor constituents of *Harungana madagascariensis* stem bark. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 3, p. 267-269, mar. 2006
- TO, W-Y.; WANG, C. C. Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosoma brucei*. **FEBS Letters**. V. 404, p. 253-262, 1997.
- UAWONGGUL, N. et al. Screening of plants acting against *Heterometrus laoticus* scorpion venom activity on fibroblast cell lysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p.201-207, jan. 2006.
- URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. S91-S99, 1997.
- VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Ca^{2+} transport by digitonin- permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and wr-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. **Biochem. J.**, v. 284, n. 2, p. 463-467, 1992.

VIDAL-PUIG, A. J. et al. Ketoconazole therapy: hormonal and clinical effects in non-tumoral hyperandrogenism. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 130, n. 4, p. 333-338, 1994.

VIEGAS, J. R.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./abr. 2006.

VILLAGÓMEZ ROJAS, A. **Estudio preliminar de la densidad morfológica distribución, producción y comercialización del achachairu (*Rheedia spp.*) en Santa Cruz de la Sierra**. Santa Cruz de la Sierra: Universidad Autónoma "Gabriel Rene Moreno", Facultad de Ciencias Agrícolas, 1990. p.32-37.

VOHRINGER, H. F.; ARASTH, K. Pharmacokinetic optimization in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 24, n. 5, p. 388-412, 1993.

ZAGOTOA, J. N. et al. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy - metabolism in the rat liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n.1-2, p. 47-54, abr. 2006

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 449-470, 1994.

WALTON, B.C. The Leishmaniasis in Biology and Medicine. In: . London: Academic Press, 1987. cap. **American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis**, p. 637-664.

WHO. *In: Tropical Diseases. Progress in research, 1989-1990. Tenth Program report of the UNDP/World bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).* 79-87. WHO, Geneva, 1991.

World Health Organization, 2003. Leishmaniasis: geographical distribution. In: WHO communicable diseases surveillance and response. WHO, Geneva. Online: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>. Accessed 14 April.

WILLIAMS, E.J. Medical parasitology a practical approach. In: . New York: Oxford University Press, 1995. cap. **Leishmania and Trypanosoma**, p. 151-176.

WOLDAY, D. et al. Leishmania – HIV Interaction: Immunopathogenic Mechanisms. **Parasitology Today**, v. 15, p. 182-186, 1999.

3 ARTIGO I

O artigo I mostra os resultados da atividade leishmanicida dos extratos hexânico, acetato etílico e etanólico, e das benzofenonas preniladas isoladas a partir do extrato hexânico do pericarpo de *Garcinia brasiliensis*, juntamente com sua caracterização e toxicidade.

O artigo foi submetido à Phytomedicine, Qualis A internacional e fator de impacto 1,817.

Ms. Ref. No.: PHYMED-D-08-00741

Title: Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis*

Mart. Fruits

Phytomedicine

Dear Dr Ivan Oliveira Pereira,

Your submission "Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits" has been assigned manuscript number PHYMED-D-08-00741.

Thank you for submitting your work to Phytomedicine.

Kind regards,

Silvia Bächer

Editorial Office

Phytomedicine

Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits

I.O. Pereira^{a,*}, M.J. Marques^b, A.L.R. Pavan^b, B.S. Codonho^b, C.L. Barbiéri^c, L.A. Beijo^d, A.C. Doriguetto^d, M.H. dos Santos^a.

^aDepartment of Pharmacy, Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Chemistry, Federal University of Alfenas, MG, Brazil;

^bDepartment of Biological Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Alfenas, MG, Brazil;

^cDepartment of Immunology, Microbiology and Parasitology, Federal University of São Paulo, SP, Brazil;

^dDepartment of Exact Sciences, Federal University of Alfenas, MG, Brazil.

*Corresponding author:

Tel.: +553532991109 / Fax: +553532991067

E-mail address: ivan.farma@bol.com.br

Abstract

Infections by protozoans of the genus *Leishmania* are the major worldwide health problem, with high endemicity in developing countries. The drugs of choice for the treatment of leishmaniasis are the pentavalent antimonials, which exert renal and cardiac toxicity, thus, there is a strong need for safer and more effective treatments against leishmaniasis. The present study was designated to evaluate, by a bioguided assay, the leishmanicidal activity of extracts (hexane, ethyl-acetate and ethanolic) and molecules both obtained by means of extraction from pericarps of *Garcinia brasiliensis* fruits. The hexane extract presented the best activity on the extracellular (promastigotes) and intracellular (amastigotes) forms of *Leishmania (L.) amazonensis*, when compared to the other extracts. Based on these findings, this extract was fractionated by silica gel column chromatography, affording nine fractions then resulting in three purified prenylated benzophenones – 7-epi-clusianone (**1**), garciniaphenone (**2**) and guttiferone-a (**3**). They showed significant activity on *Leishmania (L.) amazonensis*, and little toxicity for mammalian cells. Structure-activity relationships were evaluated showing that the IC₅₀ value displayed is dependent of prenyl groups and phenolic hydroxyls number, and inversely proportional to the hydrophobicity. Our results are promising, showing that these compounds are biologically active on *Leishmania (L.) amazonensis*.

Keywords: *Garcinia brasiliensis*; Leishmanicidal; Benzophenones; *Leishmania*.

Introduction

Leishmaniasis is a group of tropical diseases caused by a number of species of protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. This ailment affects around 12 million people in 80 countries and it is estimated that there are about two to three million new cases each year. It is also considered that presently there is a population of 350 million people under risk of infection (WHO, 1997).

Despite a many research achievements, first-line chemotherapy is still based on pentavalent antimonials developed more than 70 years ago, which are toxic and prone to drug resistance. In some trials, alternative pharmaceutical formulations have been used to reduce the toxicity of these drugs (Frezard et al., 2000). Second-line drugs, such as Amphotericin B, are more toxic and Amphotericin B's lipid formulation is too expensive for routine use in underdeveloped countries (Murray, 2001). Thus, there is a strong need for safer, cheaper and more effective treatments against leishmaniasis.

Research on antiprotozoal drugs of medicinal plant origin is a multidisciplinary task which involves researchers and students in the fields of botanics, phytochemistry, parasitology, pharmacology and medicine (Billo et al., 2005). From the mid-eighties, date when more formal and constant research on natural metabolites with leishmanicidal and antiprotozoal activity was initiated (Chan-Bacab and Pena-Rodríguez, 2001), at nowadays, many natural products have been reported to show antiprotozoal activity, including naphthoquinones (Kayser et al., 2000), lignans (Sauvain et al., 1996), triterpenoids (Sauvain et al., 1996), neolignans (Barata et al., 2000), alkaloids (Delorenzi et al., 2001), chalcones (Torres-Santos et al., 1999) and benzophenones (Fumiko et al., 2004).

Members of genus *Garcinia* are rich and valuable source of bioactive compounds (Monache et al., 1984). Recently, *Garcinia* species have received considerable attention from a pharmacological point of view because some them produce potent inhibitors of reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 (Gustafson et al., 1992). In addition, extracts and isolated molecules from stem bark of *G. lucida* shows potent tripanocidal activity (Fotie et al., 2007). In order to find new drugs against leishmaniasis, we have studied extracts and natural molecules from Brazilian plants such as *Garcinia brasiliensis* (syn. *Rheedia brasiliensis*), commonly known as 'bacupari', is used in folk medicine as a wound healing agent and for peptic ulcer, urinary, and tumor diseases treatments (Corrêa M.P., 1978) Previous works have reported the presence of the biflavonoids, volkensiflavone, fukugetin (Botta et al, 1984) and prenylated xanthenes (Monache et al, 2004) in methanolic extracts of *G. brasiliensis* roots (Morton, 1987).

How part of our continuous study of *Garcinia* species, we offer to do the bioguided-assay fractionation, and to perform the leishmanicidal activity against both promastigote and amastigote leishmania forms.

Materials and methods

Plant material

Garcinia brasiliensis fruits were collected from trees grown under controlled conditions at the herbarium of the University of Viçosa (latitude 20° 45' 14" south and longitude 42° 52' 55" west), Minas Gerais, Brazil, where its voucher specimen is deposited (number VIC2604). To obtain the extracts, the pericarp fruits dried and powdered were treated with solvents in growing polarity gradient since hexane until ethyl-acetate and ethanol, at room temperature, using the soxhlet equipment for 24 h

in each extraction. Each extract concentration was obtained under reduced pressures, which were finally chromatographed as described by Derogis et al. (2008).

General experiments procedures

The UV/VS spectrum was obtained on a spectrophotometer (Shimadzu-model 2550) double beam, have been all nine fractions from hexane extract solubilized in ethanol at concentration of 0,1mg/mL, and analyzed by screening in the range of 700 to 200nm. GC-MS analysis were obtained utilizing a Shimadzu GCMS-QP5050A equipment connected to an ion trap detector operating in Electron Impact mode at 70 eV with scan range of 29-400 Daltons, as described by Martins et al. (2008).

Extraction and isolation procedures

Dried and ground pericarps from fruits (1 kg) were extracted with solvents in crescent polarity, *n*-hexane, ethyl-acetate and ethanol, in this sequence, in soxhlet equipment, for 24hs with each solvent. The extracts were concentrated under reduced pressures using rotary evaporator, and then dried under vacuum, yielding 57.14g, 105.44g and 253.06g, of hexanic, ethyl-acetate and ethanolic extracts, respectively. These were used for the assays. After the evaluation of activity, the hexanic extract displayed the better leishmanicidal activity. After the analyze using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), this extract showed the presence of three more constituents (retention times 17.961, 16.065 and 16.972 min, respectively for (1), (2) and (3) in according to Almeida et al., (2008). Thus, this was chromatographed on silica gel (230–400 mesh) column (8 × 100 cm) eluted with crescent polarity mixtures of *n*-hexane/ethyl-acetate

and ethyl-acetate/ethanol to give 32 fractions. These fractions were then pooled in nine groups according to their similarities in TLC. Each group was analyzed by spectrophotometer and characterized in relation their leishmanicidal activity in established concentrations against promastigote forms for to obtain a spectroscopic relationship among the fractions. The fractions were, so, rechromatografed on silica gel (230–400 mesh) column (8 × 100 cm) eluted with crescent polarity mixtures of *n*-hexane/ethyl-acetate and ethyl-acetate/ethanol to obtain the three major constituents isolates (Fig. 1) – 7-epiclusianone (**1**), garciniaphenone (**2**) and guttiferone-a (**3**) that were established by uni- and bidimensional nuclear magnetic resonance (NMR) and comparison with literature values (Gustafson et al., 1992; Derogis et al., 2008). Theirs Log P values were determined using the program QikProp, version 3.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2008.

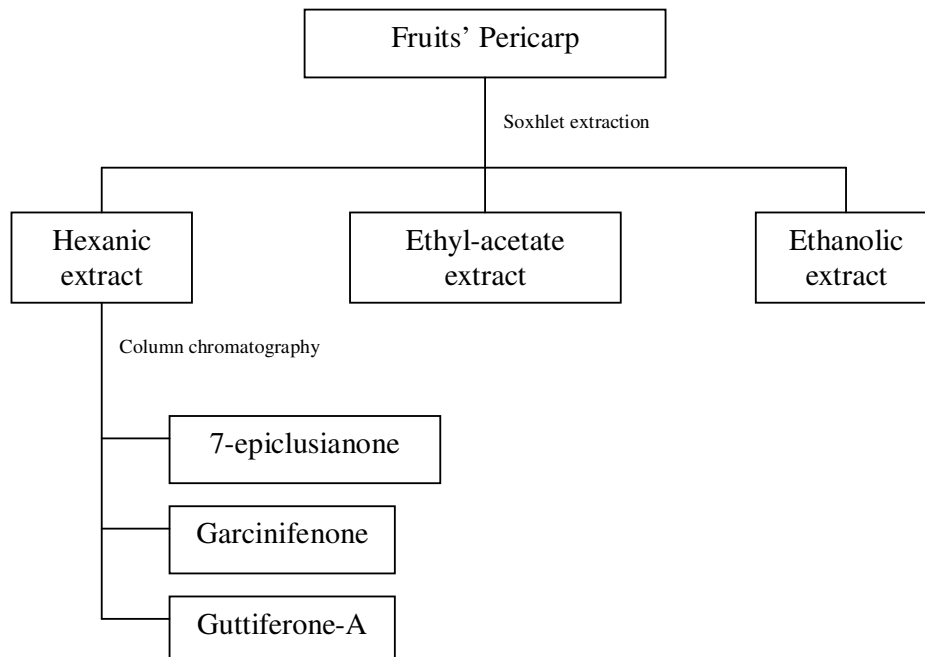


Figure 1: Extraction of *Garcinia brasiliensis* benzophenones

Leishmanicidal activity against promastigotes

Promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269), were grown on a 24-wells plate in Schneider's Drosophila medium (Sigma, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin (10000UI/mL)/streptomycin (10mg/mL) (Sigma, USA). Cells were harvested in the log phase, resuspended in fresh medium, counted in Neubauer's chamber and adjusted to a concentration of 1×10^6 cells/mL. The fractions of hexane extract at 5 μ g/mL and the crude extracts and isolated compounds in the range of 0.05 to 100 μ g/mL were added to promastigote cultures, at 1×10^6 cells/mL, solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) (the concentration used was 0.6%, v/v in all wells) and incubated at 25 °C. After 72h of incubation, the surviving parasites were counted in a Neubauer's chamber and compared with controls, with just DMSO in concentration of 0.6% v/v, for the determination of 50% inhibitory growth concentration (IC₅₀). All tests were performed in triplicate on three different occasions and Amphotericin B (Eurofarma) was used as the reference drug.

Leishmanicidal activity against amastigotes

Murine peritoneal macrophages were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 37 °C in 5% CO₂. Cells were cultured in 24-well plates chamber on the glass slides of 13mm (Nunc, USA) to a cell density of 8×10^5 cells per well and infected with late log-phase promastigotes at a multiplicity of infection of 10:1 (parasite/macrophage) incubated at 37 °C in 5% CO₂ during 24 h. Nonphagocytosed promastigotes were removed by washing, and the drug dilutions (in the range of 0.05 to 100 μ g/mL) were administered solubilized in DMSO at the concentration of 0.6% v/v. After 72 h, chamber slides

were fixed in absolute methanol, stained with 10% Giemsa and examined under an oil immersion objective of the light microscope. At least 200 macrophages were counted per well for calculating the percentage of infected cells. The percent inhibition was calculated in relation to the control only with DMSO, for the determination of IC₅₀ value (Tripathi et al., 2006). All tests were performed in triplicate on three different occasions and Amphotericin B (Eurofarma) was used as the reference drug.

Cytotoxicity evaluation

For the cytotoxicity assay a suspension of 8×10^5 murine peritoneal macrophages, in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin (10000UI/mL)/streptomycin (10mg/mL) were added to each well in 24-well plates, on the glass slides of 13mm. The plates were incubated in a 5% CO₂ air mixture at 37°C to adhesion of the cells. After 24 h, the nonadherent cells were removed by washing with the RPMI 1640 medium. Thus, several concentrations of extracts and purified compound (in the range of 0.05 to 100µg/mL) were added to the wells containing the cells. These substances were solubilized in DMSO at the final concentration of 0.6% v/v and the plates were incubated for more 72 h. Then, the nonadherent cells were removed by washing with the RPMI 1640 medium and 50 µL of the 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was added to each well at concentration of 5 mg/mL, followed incubation for more four hours, as described by Mossman (1983).

After this, the medium was retired and 600 µL of DMSO was added to each well and it was homogenized for 15 min. Next, the absorbance of each individual well, minus the control value, was calculated in according to the next formula at 570nm.

$$\% inhibition = \left(\frac{OD_{control} - OD_{drugs}}{OD_{control} \times 100} \right)$$

Each experiment was performed in triplicate on three different occasions, and the percentage of viable cells was calculated in relation to controls cultured in the medium with just DMSO at the concentration of 0.6% v/v. The 50% cytotoxicity concentrations (CC₅₀) were determined and the security factors (SF) established by the ratio between the values of CC₅₀ and IC₅₀ for amastigote forms.

Statistical analysis

The leishmanicidal activity was expressed as growth inhibition. Statistical analysis was performed using nonlinear regression to obtain the values of IC₅₀ (concentration that inhibits growth by 50% of promastigotes) and CC₅₀ (cytotoxic concentration for 50% of macrophages) these values followed by variance analyses and Tukey's test. Differences were significant when the *p* value was lower than 0.05.

Results and Discussion

There is no vaccine available against leishmaniasis. Drug resistance, variable efficacy, toxicity, parenteral administration, and requirement for long courses of administration are the main drawbacks of current leishmanicidal drugs (Croft et al., 2006). There is an urgent need for new drugs for the treatment of these diseases, which mainly affect people in developing countries.

Plants are an important source of therapeutic agents in the search for new and selective agents for the treatment of tropical diseases caused by protozoan. Several studies have shown that natural products represent a diverse source of compounds in drug discovery and in the development of novel antiprotozoal agents (Chan-Bacab and Pena-Rodríguez, 2001).

In recent years, natural products of different biosynthetic origins and several groups of compounds have been isolated and have shown activity on different species of *Leishmania* (Torres-Santos et al., 1999; Ferreira et al., 2004; Fotie et al., 2007; Singh et al., 2008). The leishmanicidal activity of plant extracts have been attributed to compounds belonging to diverse chemical groups, such as isoquinoline alkaloids, indole alkaloids, quinones and terpenes (Araújo et al., 1998). In special, benzophenones isolated from Guttiferae family plants have exhibited a prominent tripanocidal (Abe et al., 2004) and leishmanicidal activity (Lenta et al., 2007).

As a part of our screening program in search for bioactive molecules from Brazilian plants, we have investigated the *G. brasiliensis* for leishmanicidal activity. The hexane extract exhibited IC_{50} values of 1.43 $\mu\text{g/mL}$ and 10.66 $\mu\text{g/mL}$ on promastigotes and intracellular amastigotes, respectively. Ethyl-acetate and ethanol extracts were unsatisfactory on both stages of the parasite (Table 2). Thus, the bioactive hexane extract was chromatographed on a silica gel column and pooled in nine fractions according to their similarities in TLC. These fractions, after evaluated on promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* (Fig. 2) showed an important activity and a correlation with the presence of majors constituents of hexane extract.

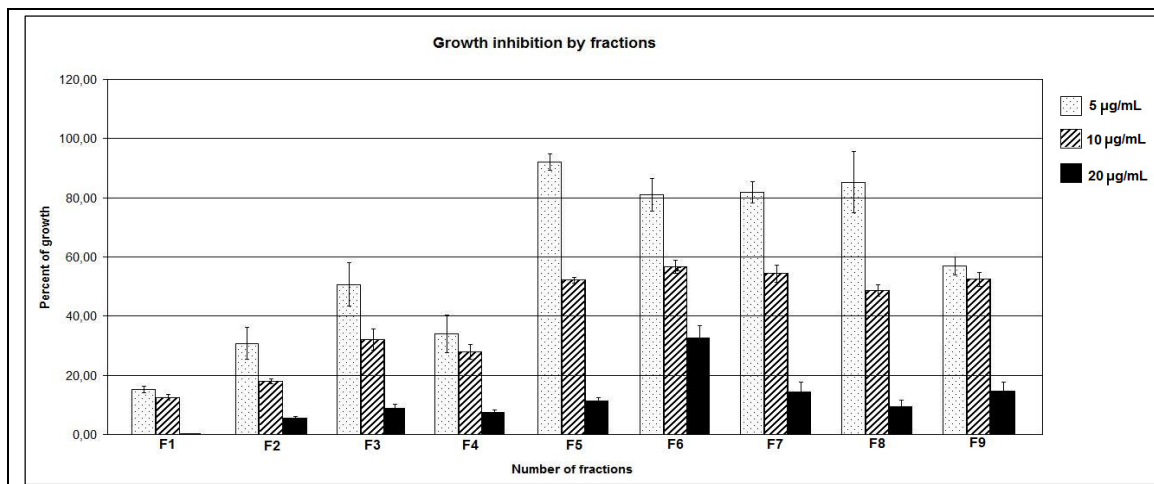


Figure 2: Promastigote percent of growth inhibition by fractions from hexane extract

These nine fractions from hexane extract were evaluated in relation to their individual contributions for the leishmanicidal activity, have been considered your relative mass and percent of inhibition at 5µg/mL. These data were compared with the hexane extract crude and compound **(1)**, the main constituent of this. The value of fractions individual contributions somatori on the growth inhibition is less than the value of crude extract, suggesting a synergic effect.

The fraction two represent almost 50% of crude extract, and have as the main constituent the molecule **(1)**. This fraction shown, at 5µg/mL, an inhibition of 69.23% on promastigote forms and this purified compound shown, at the same concentration, an growth inhibition of 70.10%, confirming that the compound **(1)** is the majoritary constituent of fraction II. In relation to the crude hexanic extract, the growth inhibition at 5µg/mL was 77.38%. If the compound **(1)**, the main constituent of the hexanic extract on overall, was responsible for the growth inhibition action of hexanic extract, the activity of extract was be about two time smaller than the growth inhibition of compound **(1)**. Thus, this result indicate the existence of a synergism among the constituents of extract. The crude extract have more activity than isolates one-to-one

or even indicated the presence of a minority constituent, that not was identified but have a large activity (Table 1).

Table 1: Individual contributions for leishmanicidal activity of hexane extract fractions

FR	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	ΣI_5	$I_{(1)-5}$	I_{Hx-5}
RM	3.308	47.895	13.145	5.022	4.884	1.684	19.049	1.951	3.061			
I_5	84.44	69.23	49.30	67.00	7.87	18.98	18.18	16.73	46.35			
$RM \times I_5$	2.793	33.158	6.480	3.365	0.384	0.320	3.463	0.326	1.419	51.708	70.100	77.380

FR: number of the fraction; RM: relative mass in relation to all hexane extract; I_5 : percent of growth inhibition to $5\mu\text{g/mL}$; $\square I_5$: somatori of percent fractions growth inhibition to $5\mu\text{g/mL}$; $I_{(1)-5}$: percent of growth inhibition for (1) to $5\mu\text{g/mL}$; I_{Hx-5} : percent of growth inhibition for hexane extract to $5\mu\text{g/mL}$.

Chemical analysis of hexane extract identified 7-epiclusianone as its major constituent (20.2%), followed by garciniaphenone (6.3%) and guttiferone-a (2.1%). After analysis by spectrophotometer, was possible to set up an espectroscopic profile among the fractions (Fig. 4).

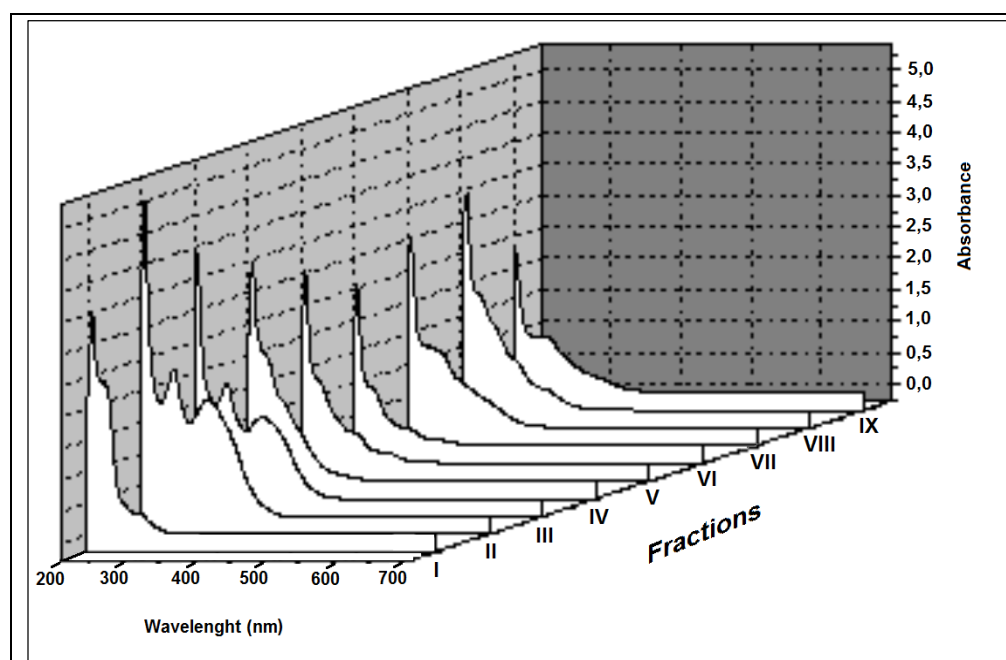


Figure 4: Characterization of fractions from hexane extract by spectrophotometer

The fraction one (an oil fraction) obtained from hexane extract fractionally showed the best activity on promastigote forms of *Leishmania* (Fig. 2). After analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Fig. 5) was possible identify a complex mixture of sesquiterpenes compounds, similar to described by Martins et al. (2008).

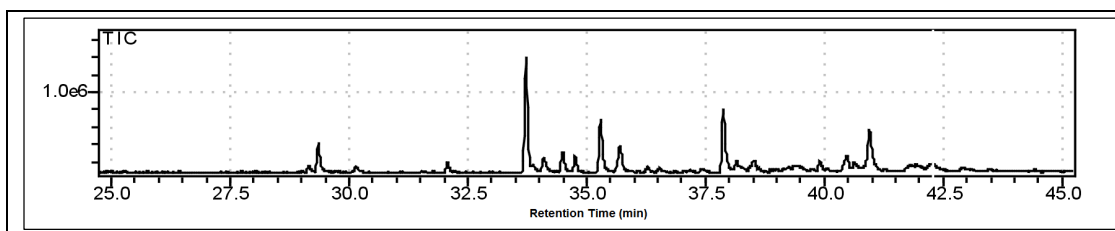


Figure 5: Total ions chromatogram of fraction one from hexane extract obtained by GC-MS.

Due to the great variability of compounds identify, and difficult for isolate pure compounds from this fraction, at the moment, the fraction one do not gone evaluated in relation the activity on amastigote forms or toxicity.

The leishmanicidal activity of the isolated compounds from the bio-guided assay was compared with the extracts and pharmaceutical formulation amphotericin B, as shown in Table 2. The isolated polyprenylateds benzophenones – **(1)**, **(2)** and **(3)**- showed significant activity on promastigote and the compounds **(1)** and **(3)** on amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* when compared with IC_{50} values of 2.81 $\mu\text{g/mL}$ and 5.68 $\mu\text{g/mL}$ of amphotericin B, a positive control, in relation to promastigotes and amastigotes, respectively. Thus, have been more potent than the reference compound, and showing a satisfactory security factor, which turn them into potential drugs for the treatment of leishmaniasis, while the compound **(2)** showed good activity on promastigotes, but did not do on amastigotes (Table 2).

Furthermore, the toxicity of extracts and isolated compounds on murine peritoneal macrophages were evaluated, obtaining the security factor (SF) from the relation between the toxicity on macrophages and leishmanicidal activity on amastigote forms. These SF were satisfactory, showing that the hexanic extract and its isolated compounds display selectivity to amastigotes in relation to mammalian cells (Table 2).

Table 2: Leishmanicidal activity of the extracts and isolated compounds, their effects on peritoneal macrophages murine and security factor in relation to amastigote

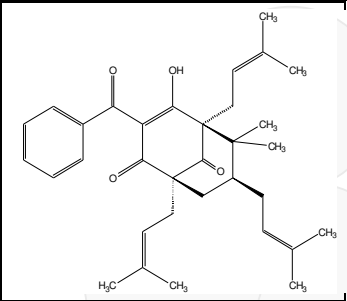
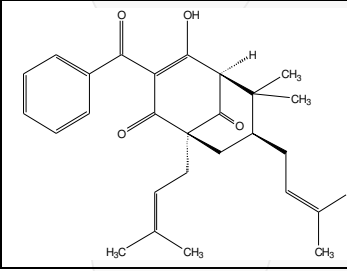
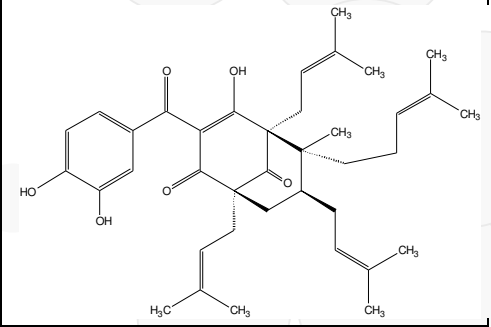
Plant material	Promastigotes IC ₅₀ (µg/mL)	Amastigotes ^a IC ₅₀ (µg/mL)	Macrophages ^b CC ₅₀ (µg/mL)	Security factor (SF)
Hexane extract	1.43*	10.66*	35.91*	3.37
Acetate-ethyl extract	32.50*	>70.00	>100.00	nd
Ethanol extract	22.93*	>100.00	>70.00	nd
7-epiclusianone	3.33*	1.63*	19.13*	11.74
Garciniaphenone	5.04*	>70.00	>80.00	nd
Guttiferone-a	18.12*	2.93*	10.71*	3.66
Amphotricin B	2.81*	5.68*	nd	nd

nd = not determined. ^a Concentration for decrease of 50% infected macrophages in treated vs nontreated wells. ^b Citotoxicity concentration for 50% macrophages. SF= ratio between CC₅₀ and C₅₀.
**p*<0.05

In the absence of any suitable lead or drug candidates for an effective leishmanicidal drug from natural resources, the results of the present study indicate the possible development of a leishmanicidal drug from a natural source.

According to literature data (Marcucci et al., 2001), most of the biological activities of natural products in propolis extracts, such as antimicrobial, trypanocidal and antitumoral are associated mainly to its prenylated compounds, being this true maybe for benzophenones. It was reported that the biological activity of a compounds might be increased by the increasing number of prenyl residues attached (Aga et al., 1994). In our elucidation of structure activity relationship, we determined that the activity increase proportionally the number of prenyl groups, in other letters, proportionally to lipophylicity. How described by Urzúa et al., (2008), the lipophilicity was shown to be an important variable that might be an important factor in the biological activity. Thus, the compound **(1)**, the more lipophylic compound was the more active on both forms of protozoan *Leishmania*, due to the presence of four prenyl groups. The compound **(3)** was the second best, because same having five prenyl groups, it have three phenol hydroxyls, have being it the second more hydrophobic molecule. The compound **(2)**, show just three prenyl groups, thus, is the less lipophilic compound (Table 3), which justify your weak biological activity on amastigote forms of leishmania, maybe, due to your difficult in across the barrier represented by the macrophage and to reach the amastigote form.

Table 3: Structure, nomenclature and QLog P octanol/water values of isolated compounds

Chemical name	Structure	QLog P octanol/water values
7 – epiclusianone		7.147
Garciniaphenone		5.212
Guttiferone-a		6.449

In conclusion, the results obtained from the present study suggest that hexane extract and the polyprenylated benzophenones isolated from *G. brasiliensis* possess interesting leishmanicidal activity and could provide lead molecules for development of potent drugs for the leishmaniasis treatment, showing strong activity on promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) and little cytotoxicity on mammal cells, with great SF. These important results make them, important and potential new compounds for development of new drugs against leishmaniasis, but a further detailed evaluation about their mechanism of action is still needed.

References

- Abe, F., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahene, H., Estrada-Muniz, E., Huerta-reyes, M., Reyes-Chilpa, R., 2004. Trypanocidal Constituents in Plants 3. Leaves of *Garcinea intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 141-143.
- Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., Nakajima, S.H., 1994. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 945–946.
- Almeida, L.S.B., Murata, R.M., Yatsuda, R., Dos Santos, M.H., Nagem, T.J., Alencar, S.M., Koo, H., Rosalen, P.L., 2008. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. *Phytochemistry* 15, 886–891.
- Araújo, C.A.C., Alegrio, L.V., Leon, L.L., 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* 49, 751–754.
- Barata, L.E.S., Santos, L.S., Ferri, P.H., Phillipson, J.D., Paine, A., Croft, S.L., 2000. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 55, 589–595.
- Billo, M., Fournet, A., Cabalion, P., Waikedre, J., Bories, C., Loiseau, P., Prina, E., Rojas, A.A., Yaluff, G., Fourneau, C., Hocquemiller, R., 2005. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. *J. Ethnopharmacol.* 96, 569–575.
- Botta B, McQuhae MM, Monache GD, Monache FD, Mello JF. *J. Nat. Prod.* 1984; **47**: 1053.
- Chan-Bacab, M.J., Peña-Rodríguez, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* 18, 674–688.
- Corrêa MP. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1926–1978.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 111–126.
- Delorenzi, J.C., Attias, M., Gattass, C.R., Andrade, M., Rezende, C., Pinto, A.D., Henriques, A.T., Bou-Habib, D.C., Saraiva, E.M.B., 2001. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1349–1354.
- Derogis, P.B.M.C., Martins, F.T., DE Souza, T.C., Moreira, M.E., Souza Filho, J.D., Doriguetto, A.C., De Souza, K.R.D., Veloso, M.P., Dos Santos, M.H., 2008. Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol

equilibrium statements for prenylated benzophenones. *Magn. Reson. Chem.* 46, 278–282.

Ferreira, I.C.P., Leon, L.L., Gobbi Filho, L., Lonardoni, M.V.C., Silveira, T.G.V., Machado, G.M.C., Oliveira, A.J.B., 2004. Antileishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 325–327.

Fotie, J., Bohle, D.S., Olivier, M., Gomez, M.A., Nzimiro, S., 2007. Trypanocidal and Antileishmanial Dihydrochelerythrine Derivatives from *Garcinia lucida*. *J. Nat. Prod.* 70, 1650-1653.

Frezard, F., Michalick, M.S.M., Soares, C.F., Demicheli, C., 2000. Novel methods for encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 841–846.

Fumiko, A.B.E., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Estrada-Muñiz, E., Huerta-Reyes, M., Reyes-Chilpa, R., 2004. Trypanocidal Constituents in Plants 3.1) Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 141-143.

Gustafson, K.R., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Fuller, R.W., McKee, T.C., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Cragg, G.M., Boyd, M.R., 1992. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* 48, 10093-10102.

Kayser, O., Kiderlen, A.F., Laatsch, H., Croft, S.L., 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 76, 131–138.

Lenta, B.N., Vonthron-Sénécheau, C., Weniger, B., Devkota, K.P., Ngoupayo, J., Kaiser, M., Naz, Q., Choudhary, M.I., Tsamo, E., Sewald, N., 2007. Leishmanicidal and Cholinesterase Inhibiting Activities of Phenolic Compounds from *Allanblachia monticola* and *Symphonia globulifera*. *Molecules* 12, 1548-1557.

Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74, 105–112.

Martins, F.T., Doriguetto, A.C., Souza, T.C., Souza, K.R., Santos, M.H., MOREIRA, M.E.C., Barbosa, L.C.A., 2008. Composition, anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruit peel. *Chem. Biodiver.* 5, 251-258.

Monache, G.D, Monache, F.D, Waterman, P.G., Crichton, E.G., De Lima, R.A., 1984. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. *Phytochemistry* 23, 1757 – 1759

Morton, J., 1987. Fruits of warm climate. Julia F. Morton, Miami, pp. 309-310.

Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

Murray, H.W., 2001. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2185–2197.

Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J.C., Gayral, P., Dedet, J.P., 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscorpis dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother. Res.* 10, 1–4.

Singh, N., Kumar, R., Gupta, S., Dube, A., Lakshmi, V., 2008. Antileishmanial activity in vitro and in vivo of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*. *Parasitol. Res.* 103, 351–354.

Torres-Santos, E.C., Moreira, D.L., Kaplan, M.A.C., Meirelles, M.N., Rossi-Bergmann, B., 1999. Selective effect of 2',6'-di-hydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1234–1241.

Tripathi, S., Singh, N., Shakya, S., Dangi, A., Misra-Bhattacharya, S., Dube, A., Kumar, N., 2006. Landrace/gender based differences in phenol and thiocyanate contents and biological activity in *Piper betle* L. *Curr. Sci.* 91, 746–749.

Urzúa, A., Echeverría, J., Rezende, M.C., Wilkens, M., 2008. Antibacterial Properties of 3 *H*-Spiro[1-benzofuran-2,1'-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. *Molecules* 13, 2385-2393.

WHO/TDR, 1997. Tropical Diseases Research – Leishmaniasis Fourteen Programme Report, pp. 101–111.

3.1 ARTIGO II

O artigo II mostra os resultados da atividade inibitória de proteases dos extratos hexânico, acetato-etílico e etanólico, e do biflavonóide fukugetina, isolado a partir do extrato acetato-etílico do pericarpo de *Garcinia brasiliensis*, juntamente com sua caracterização e toxicidade.

Artigo a ser submetido à revista Phytomedicine, Qualis A internacional e fator de impacto 1,817.

Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania's*
proteases inhibitors

Ivan O. Pereira^{a*}, Diego M. Assis^c, Maria A. Juliano^c, Rodrigo L.O.R. Cunha^c, Marcos
J. Marques^b, Marcelo H. dos Santos^a

^aDepartment of Pharmacy, Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Chemistry,
Federal University of Alfenas, MG, Brazil;

^bDepartment of Biological Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Federal
University of Alfenas, MG, Brazil;

^cDepartment of Biophysics, Federal University of São Paulo, SP, Brazil;

*Corresponding author:

Tel.: +553532991109 / Fax: +553532991067

E-mail address: ivan.farma@bol.com.br

Abstract

The infections by protozoans of the genus *Leishmania* are a major worldwide health problem, with high endemicity in developing countries. The drugs of choice for the treatment of leishmaniasis are the pentavalent antimonials, which show renal and cardiac toxicity. As part of a search for new drugs against leishmaniasis, we evaluated the *in vitro* *Leishmania* proteases inhibition activity of the fukugetin, a biflavonoid purified from ethyl-acetate extract from fruits' pericarp of *Garcinia brasiliensis*, a tree native to the Brazilian forests. The isolated compound was characterized using spectral analyses by NMR, MS, UV, and IR techniques. The compound fukugetin showed significant activity as inhibitor of *Leishmania's* proteases with IC₅₀ (50% inhibition concentration of proteases activity) at a concentration of 3.2±0.5 µM/mL. In the other hand, against promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and against mammalian cells, this isolated compound not showed toxicity. These results showed that the fukugetin is a potent proteases inhibitor of *L. (L.) amazonensis* and not caused toxicity on mammalian or *Leishmania* cells *in vitro*. This study provided new perspectives on the development of novel drugs with leishmanicidal activity obtained from natural products having as the target parasite's proteases.

Keywords: *Garcinia brasiliensis*; Proteases; *Leishmania*.

Introduction

Leishmania spp are a group of protozoan pathogens responsible for a spectrum of chronic diseases, ranging from self-healing cutaneous lesions to lethal visceral disorders (Herwaldt, 1999). During the heteroxenic life cycles of *Leishmania*, it alternates between gut of sand fly vector as an extra cellular promastigote and in the acidic phagolysosome of macrophage as an intracellular amastigote.

These parasites guarantee perpetuation within their hosts by triggering the expression of many molecules, which activate survival mechanisms. Among these molecules, the proteases are crucial in the parasite life cycle and leishmaniasis pathogenesis (Rosenthal, 1999; Sadij and McKerrow, 2002). These enzymes have been implicated in a great variety of adaptation mechanisms for in-host parasite survival, which include modulation of host immune system, invasion and destruction of host tissues, parasite dissemination, and acquisition of essential nutrients that assure survival and proliferation to sustain the infection (Coombs and Mottram, 1997a; Rosenthal, 1999; Sadij and McKerrow, 2002).

The existing chemotherapy of leishmaniasis, the pentavalent antimonials, were first introduced about 70 years ago and suffers from lack of safe and effective drugs which in many cases have now brought about widespread parasite drug resistance (Desai et al., 2004). However, new therapies for leishmaniasis are currently being investigated (Croft and Coombs, 2003), especially with molecules from plants, and proteases inhibitor have been considered as potential drugs for new therapies (Rosenthal, 1999), due to its enormous importance for the parasitic survival.

The cysteine proteases play an important role in the infection, replication, development and metabolism of protozoan parasites (Mottram et al., 1998; Mottram et al., 2004). Trypanosomes and *Leishmania* contain an abundance of cysteine proteases (CPs) (Coombs and Mottram, 1997b and c) that are members of the papain superfamily. The possibility that inhibitors of CP could be effective antiparasite agents has been recognised for some time (McKerrow et al., 1995; Robertson et al., 1996; Selzer et al., 1997).

From the mid-eighties, date when more formal and constant research on natural metabolites with leishmanicidal and antiprotozoal activity was initiated (Chan-Bacab and Pena-Rodríguez, 2001), at nowadays, many natural products have been reported to show antiprotozoal activity, including naphthoquinones (Kayser et al., 2000), triterpenoids (Sauvain et al., 1996), alkaloids (Delorenzi et al., 2001), chalcones (Torres-Santos et al., 1999) and benzophenones (Fumiko et al., 2004), and also activity as proteases inhibitors (Martins et al., 2008). Members of genus *Garcinia* is rich and valuable source of bioactive compounds (Monache et al., 1984). Recently, *Garcinia* species have received considerable attention from a pharmacological point of view because some them produce potent inhibitors of reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 (Gustafson et al., 1992).

How part of our continuous study of *Garcinia* species, we described the bioguided-assay fractionation, purification procedures and activity of hexanic, ethyl-acetate and ethanolic extracts, and of the isolated compound fukugetin. The extracts and fukugetin were evaluated in relation their capacity of inhibition in relation to proteases from amastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269). Additionally, was evaluated the toxicity of this compound

on both forms promastigote and amastigote of *L. (L.) amazonensis* and on mammalian cells (murine peritoneal macrofages).

Material and methods

Plant material

Garcinia brasiliensis fruits were collected from trees grown under controlled conditions at the herbarium of the University of Viçosa (latitude 20° 45' 14" south and longitude 42° 52' 55" west), Minas Gerais, Brazil, where its voucher specimen is deposited (number VIC2604). To obtain the extracts, the fruits were dried and powdered, and then treated with solvents in growing polarity gradient since hexane until ethyl-acetate and ethanol, at room temperature, using the soxhlet equipment for 24 h in each extraction. Each extract concentration was obtained under reduced pressures, which were finally chromatographed as described by Derogis et al. (2008).

Chemicals

Papain (EC 3.4.22.2 from *Carica papaya* latex), trypsin (E.C. 3.4.21.4) and the substrate carbobenzoxy-phenylalanil-arginyl-7-amido-4-methylcoumarin (Z-F-R-MCA) were commercially obtained from Sigma (St. Louis, USA). The molar concentration of the enzyme solution was determined by active site titulation with E-64 according to Barrett and Kirshke (1991) and the hydrolysis of fluorogenic substrate was followed at λ_{em} 460 nm and λ_{ex} 380 nm (emission and excitation wavelengths for AMC). The spectrofluorometer was calibrated with standard solutions of AMC hydrolyze in a spectrofluorometer Shimadzu RF-1501 (Shimadzu

Corporation, Kyoto, Japan). All other chemicals, solvents and reagents were obtained from commercial sources (Sigma and Merck). Papain, trypsin and *Leishmania* proteases assays (previously treated with 5mM dithiotreitol – DTT - by fifteen minutes) were performed as previously described (Melo et al. 2001), using the substrate Z-F-R-MCA prepared diluting several times a stock solution at 1mM in water:dimethylformamide (50:50 v/v). All extracts and fukugetin were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and diluted in the enzymatic buffer with 0.05% of Triton X-100. Enzymatic buffer: 0.1M sodium phosphate; pH 6.8 containing 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

Extraction and fukugetin isolation

Dried and ground pericarps from fruits (1 kg) were extracted with solvents in crescent polarity, hexane, ethyl-acetate and ethanol, in this sequence, in soxhlet equipment, for 24hs with each solvent. The extracts were concentrated under reduced pressures using rotary evaporator, and then dried under vacuum, yielding 57.14g, 105.44g and 253.06g, of hexanic, ethyl-acetate and ethanolic extracts, respectively. These dried extracts were used for the assays. After the evaluation of inhibitory capacity, the ethyl-acetate extract displayed the better activity.

Thus, this extract was chromatographed on silica gel (230–400 mesh) column (8 × 100 cm) eluted with crescent polarity mixtures of *n*-hexane/ethyl-acetate and ethyl-acetate/ethanol to give 30 fractions. These fractions were then pooled in ten groups according to their similarities in thin layer chromatography (TLC). The five group was rechromatographed with crescent polarity mixtures of *n*-hexane/ethyl-acetate and ethyl-acetate/ethanol, and the main fraction was recrystallized several times using methanol solutions yielding 1.05 g of fukugetin (Figure 1).

The structure elucidation was obtained by NMR, MS, UV, and IR techniques of this isolated compound which were appraised by comparison with literature values (Botta et al., 1984; Martinez et al., 1996; Konoshima et al., 1969).

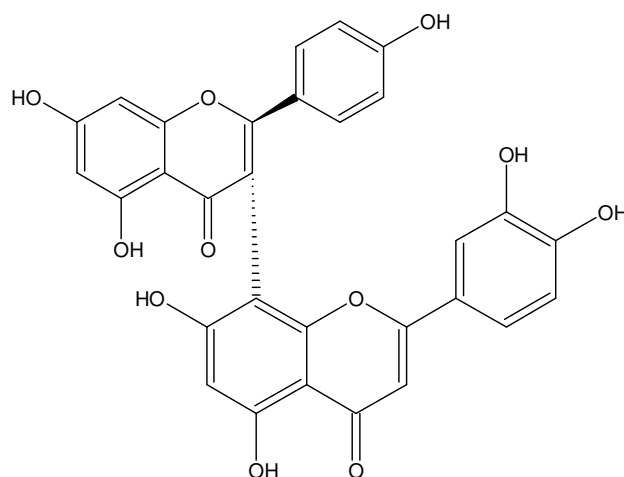


Figure 1 : structure of biflavonoid fukugetin

Obtention of proteases from *Leishmania*

L. (L.) amazonensis amastigotes were isolated from infected rats. After harvesting, the cells (1.8×10^6 cells/mL) were washed three times with PBS 0.15 M buffer (pH 7.2) by centrifugation (1500 g, 10 min). The cell pellets were stored at -70°C until required. The parasite lysates were prepared in PBS 0.15 M buffer by five ultrasonication cycles of 45 seconds (30 Hz) at 0°C , with 2 minutes of interval between the cycles. Finally, the cell lysate was centrifuged at 5090 g for 5 min at 4°C and the supernatants containing the proteases used in the tests.

Evaluation of proteases inhibition activity

For the evaluation of proteases inhibition activity was used the fluorogenic substrate Z-FR-MCA, that show selectivity for cysteine and serine proteases. Each protease was added to 1mL of enzymatic buffer with 0.05% of Triton X-100, followed by addition of DTT as described by Melo et al. (2001) and the substances for evaluation, diluted in DMSO. This solvent was used in same final concentration of 0.6% v/v in all assays and in the control. Incubation for 30 minutes was making after addition of the substances for evaluation. Then, the substrate Z-FR-MCA was added, followed of the analysis on spectrofluorometer at each 0.5 seconds, in exciting wavelength of 380 nm and emission wavelength of 460 nm. Each experiment was performed in triplicate on three different occasions and the percentage of activity was calculated in relation to the control just with DMSO. The same procedure was used for evaluation the inhibitory capacity of comercial proteases (papain and trypsin) and of the group of enzyme from *Leishmania*.

Leishmanicidal activity against promastigotes

Promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269), were grown on a 24-wells plate in Schneider's Drosophila medium (Sigma, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin (10000UI/mL)/streptomycin (10mg/mL) (Sigma, USA). Cells were harvested in the log phase, resuspended in fresh medium, counted in Neubauer's chamber and adjusted to a concentration of 1×10^6 cells/mL. The samples were added to the promastigote cultures, at 1×10^6 cells/mL, solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) (the concentration used was 0,6%, v/v in all wells) and incubated at 25°C. After 72h of incubation, the surviving parasites were counted in a Neubauer's chamber and compared with controls, with just DMSO in concentration of 0,6% v/v, for the

determination of 50% inhibitory growth concentration (IC₅₀). All tests were performed in triplicate on three different occasions.

Leishmanicidal activity against amastigotes

Murine peritoneal macrophages were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin (10000UI/mL)/streptomycin (10mg/mL) at 37°C in 5% CO₂. Cells were cultured in 24-well chamber slides (Nunc, USA) to a cell density of 8×10^5 cells per well and infected with late log-phase promastigotes at a multiplicity of infection of 10:1 (parasite/macrophage) and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 16–18 h. Nonphagocytosed promastigotes were removed by washing, and the drug dilutions were administered solubilized in DMSO at the concentration of 0,6% v/v. After 72 h, chamber slides were fixed in absolute methanol, stained with 10% Giemsa, and examined under an oil immersion objective of the light microscope. At least 200 macrophages were counted per well for calculating the percentage of infected macrophages, and the percent inhibition was calculated in relation to the control only with DMSO, for the determination of IC₅₀ value (Tripathi et al., 2006). All tests were performed in triplicate on three different occasions.

Toxicity evaluation

For the cytotoxicity assay a suspension of 5×10^8 murine peritoneal macrophage cells in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin (10000UI/mL)/streptomycin (10mg/mL), were added to each well in 24-well plates, on the glass slides of 13mm. The plates were incubated in a 5% CO₂ air mixture at 37°C to adhesion of the cells. After 24 h, the

nonadherent cells were removed by washing with the RPMI 1640 medium, and several concentrations of extract and purified compound were added to the wells containing the cells, solubilized in DMSO at the final concentration of 0.6% v/v, and the plates were incubated for 72 h. Then, the nonadherent cells were removed by washing with the RPMI 1640 medium, and 50 μ L of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was added to each well at concentration of 5 mg/mL and incubated for more four hours, as described by Mossman (1983).

After this, the medium was retired and 600 μ L of DMSO was added to each well, and it was homogenized for 15 min. Next, the absorbance of each individual well, minus the control value, was calculated at 570nm, in according to the formula.

$$\%inhibition = \left(\frac{OD_{control} - OD_{drugs}}{OD_{control}} \times 100 \right)$$

Each experiment was performed in triplicate on three different occasions, and the percentage of viable cells was calculated in relation to controls cultured in the medium with just DMSO at the concentration of 0.6% v/v.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using nonlinear regression to obtain the values of IC₅₀ (concentration that inhibits 50% of activity) followed by variance analysis and Tukey's test. The inhibition activity was expressed as residual activity. Differences were significant when the *p* value was lower than 0.05.

Results and discussion

The parasites of Genus *Leishmania* are responsible for considerable morbidity and mortality in many countries, principally in the tropics and subtropics. Furthermore, the drugs currently available for treatment of leishmaniasis are unsatisfactory because of their limited efficacy, frequent side effects, and increasing drug resistance. Thus, new, safer and more efficacious drugs are urgently required (World Health Organization 2003a, b; Croft et al. 2005). In this regard, medicinal plants offer enormous prospects for discovering new compounds with therapeutic properties.

In the present study, we report for the first time a novel pharmacological activity of extracts from fruits of *Garcinia brasiliensis* which showed important activity on proteases papain (cysteine protease) and trypsin (serine protease) as inhibitor *in vitro*. These proteases were inhibited by ethyl-acetate extract from this plant. When assessed at the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$, this extract allowed a residual activity of 35.25% for papain and 46.97% for trypsin (Figures 2 and 3). The other extracts (hexanic and ethanolic) were fewer active at the same concentration (Figures 2 and 3). The residual activities of the hexanic and ethanolic extracts were 62.82 and 62.19% for the papain, respectively; 66.5 and 77.65 for the trypsin, respectively.

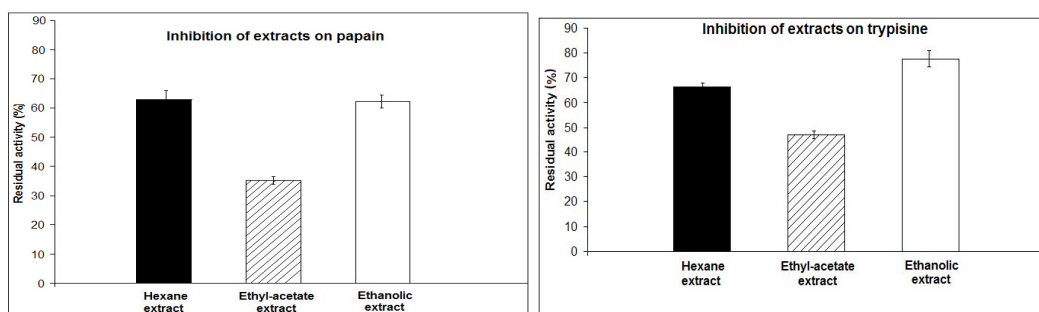


Figure 2: residual activity of papain and trypsin in presence of extracts at 10 $\mu\text{g/mL}$

These results led us to assess the activity of the extracts on proteases from *Leishmania*, in order to find a novel natural product with activity against leishmaniasis. After evaluation of these extracts on proteases from *L. (L.) amazonensis* amastigotes, the ethyl-acetate extract showed, again, a best inhibitory activity, with IC_{50} value of $15 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ for inhibition. The other extracts, hexanic and ethanolic, showed IC_{50} values of 98 ± 5 and $>120 \mu\text{g/mL}$, respectively (Table 1).

In addition, was make fractionament of this extract on chromatographic column, until the purification of the biflavonoid fukugetin (Figure 1), which was identified by chemical analysis (NMR, MS, UV, and IR techniques) and appraised by comparison with literature values (Botta et al., 1984; Martinez et al., 1996; Konoshima et al., 1969). This biflavonoid, after evaluation on *Leishmania's* proteases, showed a greater inhibitory effect than the ethyl-acetate extract, with an IC_{50} value of $5.2 \pm 0.5 \mu\text{M/mL}$ (Figures 4 and 5).

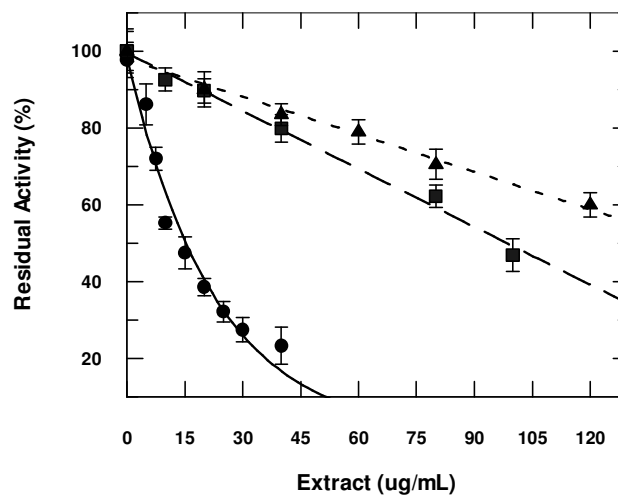


Figure 4: residual activity of proteases in presence of several concentrations of extracts. (●) Ethyl Acetate, (■) Hexanic and (▲) Ethanolic.

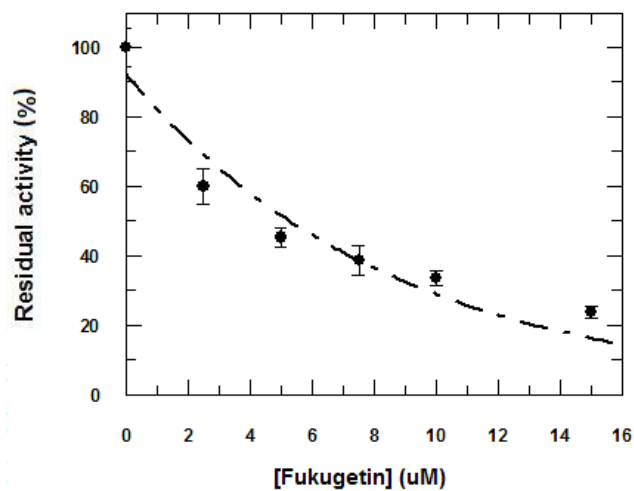


Figure 5: residual activity of proteases in presence of several concentrations of fukugetin.

Table 1: IC₅₀ values of extracts and isolated compound as proteases inhibitor

IC₅₀	
<u>Isolated Compound</u>	<i>uM</i>
Fukugetin	5.2 ± 0.5*
<u>Extracts</u>	<i>ug/mL</i>
Ethyl Acetate	15.0 ± 1.3*
Hexanic	98 .0± 5.0*
Ethanolic	> 120.0 ± 10.0

**p*<0.05

The cytotoxicity tests with natural products are important because of the interest in alternative treatment and the therapeutic use of medicinal plants. Development of drugs of plant origin is of interest because the conventional

treatments for many diseases can be inefficient or ineffective or can result in side effects, as occurred in leishmaniasis (Khaw; Panosian, 1995).

Many people worldwide have no access to conventional pharmacological treatments but depend on folk remedies. The widespread use of folk medicines suggests that natural products are harmless, but traditional use is no proof of their safety (Edzard 1998). In this context, both the efficacy and safety of natural products require investigation.

Thus, the isolated compound fukugetin were evaluated in relation their capacities how growth inhibitors on promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and also on murine peritoneal macrophages, for determination of their toxicity against mammalian cells. In addition, for the best of our knowledge there is no report on the literature regarding the biological activity of fukugetin on *Leishmania* spp.

The ethyl-acetate extract showed IC_{50} of 32,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and $>70 \mu\text{g}/\text{mL}$ for promastigotes and amastigotes, respectively. For the isolated compound fukugetin was not possible determine the IC_{50} values, because their were $>100 \mu\text{M}/\text{mL}$ and $>150 \mu\text{M}/\text{mL}$ for promastigotes and amastigotes, respectively. In relation to toxicity against mammalian cells, was not possible to determine the concentration toxic for 50% of cells, because these were $>70 \mu\text{g}/\text{mL}$ for ethyl-acetate extract and $>150 \mu\text{M}/\text{mL}$ for the isolated compound.

Therefore, the ethyl-acetate extract and the isolated compound fukugetin are very actives as inhibitors of proteases, especially on proteases from leishmanias, shown a good and promissory activity. But, *in vitro* these compounds not showed activity against both promastigote and amastigote forms, neither significant toxicity for mammalian cells.

The results showed that these substances (extract and the isolated compound) are very active on proteases, but not have activity against cells. Consider the log P of isolated compound as 6.03, this compound is a hydrophilic molecule, and the extract also is significantly hydrophilic. Thus, the compounds do not get to cross the membrane cellular barrier, and not reach their target for to develop their effects as proteases inhibitor. According Marcucci et al. (2001) the antibacterial activity of compounds might be increased by the increasing number of prenyl residues attached, and was also showed with the lipophilicity is an important variable in the biological activity (Urzúa et al., 2008).

More studies are need for determination if these substances are selective or not for *Leishmania's* proteases. And this isolated compound can be an important prototype for the development of new selective and potent substances for the treatment of leishmaniasis.

References

- Barrett, A.J., Kirshke H., 1991. *Methods Enzymol.* 80, 535–561.
- Botta, B., Mac-Quhae, M.M., Monache, G.M., Monache, F.M., De Mello, J.F., 1984. *J. Nat. Prod.* 47, 1053.
- Chan-Bacab, M.J., Peña-Rodríguez, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* 18, 674–688.
- Coombs, G.H., Mottram, J.C., 1997a. Proteases in trypanosomatids. In: Hide, G., Mottram, J.C., Coombs, G.H., Holmes, P.H. *Trypanosomiasis and leishmaniasis.* CAB International, London, pp 176–197
- Coombs, G.H., Mottram, J.C., 1997b. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology.* 114, 561 - 569.
- Coombs, G.H., Mottram, J.C., 1997c. Proteinases of trypanosomes and *Leishmania*. In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control.* Edited by Hide, G., Mottram, J.C., Coombs, G.H., Holmes, P.H. Oxford: CAB International, 177-197.
- Croft, S.L., Coombs, G.H., 2003. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends. Parasitol.* 19, 502–508.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., Urbina, J.A., 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends. Parasitol.* 21, 508–512.
- Delorenzi, J.C., Attias, M., Gattass, C.R., Andrade, M., Rezende, C., Pinto, A.D., Henriques, A.T., Bou-Habib, D.C., Saraiva, E.M.B., 2001. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1349–1354.
- Derogis, P.B.M.C., Martins, F.T., DE Souza, T.C., Moreira, M.E., Souza Filho, J.D., Doriguetto, A.C., De Souza, K.R.D., Veloso, M.P., Dos Santos, M.H., 2008. Complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. *Magn. Reson. Chem.* 46, 278–282.
- Desai, P.V., Patny, A., Sabnis, Y., Tekwani, B., Gut, J., Rosenthal, P., Srivastava, A., Avery, M., 2004. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge database. *J. Med. Chem.* 16, 6609–6615.
- Edzard, E., 1998. Harmless herbs? A review of the recent literature. *Am. J. Med.* 104, 170–178.
- Fumiko, A.B.E., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Estrada-Muñiz, E., Huerta-Reyes, M., Reyes-Chilpa, R., 2004. Trypanocidal Constituents in Plants 3.1) Leaves of *Garcinia intermedia* and Heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 141-143.

Gustafson, K.R., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Fuller, R.W., McKee, T.C., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Cragg, G.M., Boyd, M.R., 1992. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* 48, 10093-10102.

Herwaldt, B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet*. 354, 1191–1199.

Kayser, O., Kiderlen, A.F., Laatsch, H., Croft, S.L., 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 76, 131–138.

Konoshima, M., Ikeshiro, Y., Nishinaga, A., Matsuura, T., Kubota, T., Sakamoto, H., 1969. *Tetr. Lett.*, 10, 121.

Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74, 105–112.

Martinez, E., Moreno-Murillo, B., Delle Monache, F., 1996. *Revista Colombiana de Química*. 25, 15.

McKerrow, J.H., McGrath, M.E., Engel, J.C., 1995. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasitic drug design. *Parasitol. Today*. 11, 279-282.

Melo, R.L., Alves, L.C., Del Nery, E., Juliano, L., Juliano, M.A., 2001. *Anal. Biochem.* 293, 71-77.

Monache, G.D, Monache, F.D, Waterman, P.G., Crichton, E.G., De Lima, R.A., 1984. Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. *Phytochemistry* 23, 1757 – 1759

Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

Mottram, J.C., Brooks, D.R., Coombs, G.H., 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1, 445-460.

Mottram, J.C., Coombs, G.H., Alexander, J., 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol*, 7, 375-381.

Robertson, C.D., Coombs, G.H., North, M.J., Mottram, J.C., 1996. Parasite cysteine proteinases. *Drug Disc Design*. 6, 99- 118.

Rosenthal, P.J., Kim, K., McKerrow, J.H., Leech, J.H., 1987. Identification of three stage-specific proteinases from *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med*. 166, 816-821.

Sadij, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.* 120, 1–21.

Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J.C., Gayral, P., Dedet, J.P., 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscorpis dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother. Res.* 10, 1–4.

Selzer, P.M., Chen, X.W., Chan, V.J., Cheng, M.S., Kenyon, G.L., Kuntz, I.D., Sakanari, J.A., Cohen, F.E., McKerrow, J.H., 1997. *Leishmania major* Molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. *Exp Parasitol.* 87, 212-221.

Torres-Santos, E.C., Moreira, D.L., Kaplan, M.A.C., Meirelles, M.N., Rossi-Bergmann, B., 1999. Selective effect of 2',6'-di-hydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1234–1241.

Tripathi, S., Singh, N., Shakya, S., Dangi, A., Misra-Bhattacharya, S., Dube, A., Kumar, N., 2006. Landrace/gender based differences in phenol and thiocyanate contents and biological activity in *Piper betle* L. *Curr. Sci.* 91, 746–749.

Urzúa, A., Echeverría, J., Rezende, M.C., Wilkens, M., 2008. Antibacterial Properties of 3 *H*-Spiro[1-benzofuran-2,1'-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. *Molecules* 13, 2385-2393.

World Health Organization, 2003a. Leishmaniasis: geographical distribution. In: WHO communicable diseases surveillance and response. WHO, Geneva. Online: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>. Accessed 14 April.

World Health Organization, 2003b. Leishmaniasis: the disease and its impact. In: WHO communicable diseases surveillance and response. WHO, Geneva. Online: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html>. Accessed 14 April.