



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AGERDÂNIO ANDRADE DE SOUZA

**BIOMONITORAMENTO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E
IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA
Trattinnickia rhoifolia (Willd) RELACIONADAS À
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DETERMINADA POR GC E LC-
MS/MS**

AGERDÂNIO ANDRADE DE SOUZA

**BIOMONITORAMENTO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E
IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA
Trattinnickia rhoifolia (Willd) RELACIONADAS À
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DETERMINADA POR GC E LC-
MS/MS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE em Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Suzana Lucy Nixdorf.
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Ivete Conchon Costa.

Londrina
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729b Souza, Agerdânio Andrade de.
Biomonitoramento da atividade leishmanicida e imunomoduladora de extratos das folhas da *Trattinnickia rhoifolia* (Willd) relacionadas à composição química determinada por GC e LC-MS/MS / Agerdânio Andrade de Souza. - Londrina, 2017.
118 f.: il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Coorientador: Ivete Conchon Costa.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Produtos naturais - Teses. 2. Burseracea - Teses. 3. Leishmaniose - Teses. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Costa, Ivete Conchon. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 636.082.45

AGERDÂNIO ANDRADE DE SOUZA

**BIOMONITORAMENTO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E
IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DA
Trattinnickia rhoifolia (Willd) RELACIONADAS À COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DETERMINADA POR GC E LC-MS/MS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Andrea Diniz
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho à minha família

AGRADECIMENTO (S)

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf, não só pela constante orientação neste trabalho, mas, sobretudo pela sua amizade. A orientação fez com que eu assumisse que nunca gostei de estudar, mais ela me ensinou que, quem estuda somente aprende, assim expressei a mais profunda gratidão. Agradeço os seus ensinamentos e conselhos, paciência, compreensão e incentivo que me fizeram crescer como discente e como pessoa.

Agradeço à minha coorientadora, Profa. Dra. Ivete Conchon Costa, pelo acompanhamento contínuo, pela experiência, amizade e sabedoria e, por ter me apresentado um mundo novo, o mundo biológico pelo qual eu me apaixonei.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa, que desde o início, esteve disponível para tirar minhas dúvidas e me auxiliar no processo de elaboração deste trabalho, com suas indicações.

Aos professores Dr. Wander Rogério Pavanelli e Dr. Eduardo César Meurer, pela oportunidade de realizar os experimentos em seus laboratórios.

Aos colegas que me auxiliaram nas análises: Mariana Bortholazzi Almeida, Letícia Aparecida Marques, Tiago Bervelieri Madeira, Suelen Santos da Silva, Milena Menegazzo Miranda, Allan Henrique Depieri Cataneo, Fernanda Tomiotto Pellissier, Idessania Nazareth Costa, Lupércio Ricci, sem os quais este trabalho, não teria sido realizado e concluído.

À minha família por todo o apoio durante minha vida acadêmica.

Aos meus amigos pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis, Cristiana Fátima Gonzaga Silva, Carla Estefani Batista, João Marcos Gomes de Oliveira Ferreira, Letícia Aparecida Marques, Mariana Bortholazzi Almeida, Lycio Shinji Watanabe, Yuri Renan Bovolenta e Vinicius Ricardo Acquaro Júnior e àqueles que posso ter me esquecido de citar, porém tenho carinho por todos.

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

“Eu como pessoa tenho que chamar sua atenção, (com os olhos marejados)... ao contrário, você hoje não vai dormir... estude tudo e chegue cedo e, mostre que aprendeu”

(Suelen Santos da Silva).

SOUZA, Agerdânio Andrade de. **Biomonitoramento da atividade leishmanicida e imunomoduladora de extratos das folhas da *Trattinnickia Rhoifolia* (Willd) relacionadas à composição química determinada por GC e LC-MS/MS.** 2017. 118 f. Dissertação de Mestrado em Química–Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Dentre a vasta biodiversidade da flora da Região Amazônica, a espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, pertencente à família Burseraceae, tem seu uso popular por comunidades indígenas isoladas no tratamento de ulcerações e inflamações causadas pela leishmaniose, feita sob a forma de infusões de suas folhas. Entretanto, não foram encontrados relatos científicos sobre a atividade leishmanicida e/ou imunomoduladora de seus extratos folhosos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade leishmanicida e imunomoduladora dos extratos etanólico (*EF*) e diclorometânico (*DF*) das folhas da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, procurando relacioná-las à sua composição química, determinada por cromatografia gasosa e líquida acopladas à espectrometria de massas (HRGC-MS/MS e UPLC-MS/MS). As partes aéreas da árvore foram coletadas no viveiro de sementes do Batalhão de Polícia Ambiental (BPA) no município de Candeias do Jamari/RO. A exsicata e a identificação da espécie foram realizadas no herbário da Universidade Federal de Rondônia. No extrato *DF* identificaram-se por GC-MS/MS os hidrocarbonetos: eicosano ($C_{20}H_{42}$), octadecano ($C_{18}H_{38}$), octacosano ($C_{28}H_{58}$), nonacosano ($C_{29}H_{60}$) e tetrapentacontano ($C_{54}H_{110}$); os ácidos pentadecanóico ($C_{15}H_{30}O_2$) e nonadecanóico ($C_{19}H_{38}O_2$); e o éster metil-11,14,17-eicosatrienoato ($C_{21}H_{36}O_2$). Fazendo o uso da técnica de LC-MS/MS no modo negativo, conjuntamente com os dados da literatura que reportam atividade biológica, verificou-se a presença do: ácido eicosanóico ou araquídico, ácido betulônico, crisina, daidzeína, genisteína, ácido feruloilquínico, e no positivo do flavonol, dodeicosanóico e epi-friedelanol. No biomonitoramento da atividade leishmanicida os extratos *EF* e *DF* apresentaram redução significativa das formas promastigotas em relação ao controle, atingindo 100% de letalidade na cinética de recuperação em 7 dias, com baixos níveis de citotoxicidade em macrófagos medulares de camundongos BALB/c. Com relação à capacidade imunomoduladora os extratos *EF* e *DF* modularam a produção das citocinas IL-1 β ; TNF- α ; IL-12, enquanto não alteram os níveis de NO. Como um estudo pioneiro com extratos de *Trattinnickia rhoifolia* Willd demonstrando atividade biológica leishmanicida experimental, espera-se que este estudo contribua como base para investigações futuras sobre o papel dos compostos identificados, auxiliando no combate a doenças negligenciadas, como a leishmaniose.

Palavra-chave: Leishmaniose *L. amazonenses*. Composição química. GC-MS. UHPLC-MS/MS. Atividade biológica. Extrato diclorometânico.

SOUZA, Agerdânio Andrade de. **Biomonitoring of leishmanicidal and immunomodulatory activity of extracts from *Trattinnickia rhoifolia* leaves (Willd) related to the chemical composition determined by GC and LC-MS / MS.** 2017. 118 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Among the vast biodiversity of the Amazon Region flora, the species *Trattinnickia rhoifolia* Willd, belonging to the Burseraceae family, has its popular use by indigenous communities isolated, which made leaves infusions to treat ulcerations and inflammation caused by leishmaniasis. However, no scientific reports were found of its leafy extracts on the leishmanicidal and/or immunomodulatory activity. Therefore, the objective of this study was to verify the leishmanicidal and immunomodulatory activity of the ethanolic (*EF*) and dichloromethane (*DF*) extracts of the leaves of the *Trattinnickia rhoifolia* Willd species, seeking to relate them to their chemical composition determined by gas and liquid chromatography coupled to spectrometry (HRGC-MS/MS and UPLC-MS/MS). Aerial parts of the tree were collected in the seedbed of the Environmental Police Battalion (BPA) in Candeias do Jamari/RO municipality. Exsicata and their species identification were carried out in Federal University of Rondônia herbarium. In *DF* extract the hydrocarbons: eicosane ($C_{20}H_{42}$), octadecane ($C_{18}H_{38}$), octacosane ($C_{28}H_{58}$), nonacosane ($C_{29}H_{60}$) and tetrapentacontane ($C_{54}H_{110}$) and pentadecanoic acids ($C_{15}H_{30}O_2$), nonadecanoic acids ($C_{19}H_{38}O_2$) and methyl-11,14,17-eicosatrienoate ($C_{21}H_{36}O_2$) were identified. Using LC-MS/MS technique in the negative mode, together with the literature data reporting biological activity, the presence of eicosanoic or arachidic acid, betulonic acid, chrysin, daidzein, genistein, feruloilquinic acid, and in positive mode - flavonol, dodecosanoic and epi-friedelanol were verified. Leishmanicidal activity of the *EF* and *DF* extracts biomonitoring showed a significant reduction of the promastigote forms compared to control, reaching 100% of lethality in the kinetics of recovery in 7 days, with low levels of cytotoxicity in macrophages of medular BALB/c mouse. Regarding the immunomodulatory capacity, extracts *EF* and *DF* modulated the IL-1 β , TNF- α , IL-12 cytokines production, while not altering the NO levels. As a pioneering study with *Trattinnickia rhoifolia* Willd extracts, demonstrating experimental leishmanicidal biological activity, we expect that this study will contribute as a basis for future research for compounds identified, helping to combat neglected diseases such as leishmaniasis.

Keywords: *Leishmaniasis L. amazonensis*. Chemical composition. GC-MS. UHPLCMS/MS. Biological activity. Dichloromethane extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie <i>Trattinnickia rhoifolia Willd</i> da família Burseraceae - árvore, tronco, folhas e sementes.	16
Figura 2. Estruturas químicas dos compostos isolados do gênero <i>Canarium</i>	20
Figura 3. Estrutura química do tetracíclico tirucallane	20
Figura 4. Compostos encontrados na <i>Trattinnickia rhoifolia Willd</i>	26
Figura 5. Esquema de um cromatógrafo a líquido (HPLC).....	28
Figura 6. Componentes básicos de um cromatógrafo a gás (GC).....	29
Figura 7. Fluxograma geral das etapas do <i>QbD</i> e do delineamento <i>Design Space</i>	32
Figura 8. Exemplo de <i>Design Space</i> na otimização de um método cromatográfico aplicando <i>QbD</i>	33
Figura 9. Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) da <i>Leishmania sp.</i>	35
Figura 10. Ciclo de transmissão da <i>Leishmania sp.</i>	37
Figura 11. Esquema simplificado da resposta imune na leishmaniose cutânea até a formação da ulcera cutânea	42
Figura 12. Cromatograma dos íons totais (TIC) para o extrato bruto <i>DF</i> da <i>Trattinnickia rhoifolia Willd</i> obtido por HRGC-MS/MS.....	60
Figura 13. Cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia Willd</i> empregando o UPLCMS/MS TQD no modo negativo	63
Figura 14. Estruturas para os compostos atribuídos para o extrato <i>DF</i> da espécie <i>T. rhoifolia Willd</i> presentes nos cromatogramas empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).....	67
Figura 15. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 311,43, atribuído ao ácido eicosanóico, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia Willd</i> empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).....	68
Figura 16. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 453,09, atribuído ao ácido betulônico, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia Willd</i> empregando o UPLCMS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).....	69

Figura 17. Espectro de massas do íon [M-H] ⁻ de <i>m/z</i> 253,14, atribuído a crisina, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLCMS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).....	70
Figura 18. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 253,14, atribuído a daidzeína, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).....	71
Figura 19. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 269,12, atribuído a genisteína, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).....	72
Figura 20. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 367,20, atribuído ao ácido feruloilquínico, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).....	73
Figura 21. Cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLCMS/MS TQD no modo positivo.....	74
Figura 22. Estruturas para os compostos atribuídos para o extrato <i>DF</i> da espécie <i>T. rhoifolia</i> Willd presentes nos cromatogramas empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo (Fig. 23).....	76
Figura 23. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 239,48, atribuído ao flavonol, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo (Fig. 21).....	77
Figura 24. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 341,66, atribuído ao dodeicosanóico, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLCMS/MS TQD no modo positivo (Fig. 21).....	78
Figura 25. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 429,850, atribuído ao epifriedelanol, obtido do cromatograma do extrato <i>DF</i> da <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLCMS/MS TQD no modo positivo (Fig. 21).....	79
Figura 26. Atividade leishmanicida dos extratos brutos de <i>EF</i> e <i>DF</i> na cinética de proliferação das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com 5,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 µg mL ⁻¹ de extrato de <i>EF</i> (A) e <i>DF</i> (B) por 24, 48 e 72 h. Como controle, foram utilizados promastigotas de <i>L. amazonensis</i> mantidas em cultura sem tratamento. Os resultados representam a média ±	

- SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0.05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)].....85
- Figura 27.**Ensaio de viabilidade por MTT em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c tratados com 25,0; 50,0 ou 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos *EF* (A) e *DF* (B) por 72 horas. Células que não receberam tratamento foram utilizadas como controle. Os dados representam a porcentagem de células viáveis. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]86
- Figura 28.**Atividade leishmanicida em macrófagos da medula óssea de camundongos BALB/c após infecção com promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratamento com 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato bruto *EF* (A) e *DF* (B) por 24, 48 e 72 horas. Células que não receberam tratamento foram usadas como controle. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]89
- Figura 29.**Recuperação de promastigotas a partir de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com extrato *EF* e *DF in vitro*. Após a infecção com promastigotas de *L. amazonenses*, macrófagos foram tratados com 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato bruto *EF* e *DF* onde permaneceram incubados por 48 horas. Após este período, foram quantificadas diariamente as formas promastigotas através de contagem por câmara de Neubauer. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)].....91
- Figura 30.**Perfil da produção de citocinas em macrófagos medulares tratados com os extratos *EF* e *DF in vitro* após a fagocitose de *L. amazonensis*. Quantificação de IL-1 β (A); TNF- α (B); IL-12 (C); IL-17 (D); TGF- β (E); IL-10 (F) realizada por meio do teste de ELISA dos sobrenadantes dos ensaios fagocíticos. Os dados

representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]93

Figura 31. Perfil da produção de óxido nítrico estimada pela determinação dos níveis de nitrito nos sobrenadantes coletados dos ensaios fagocíticos. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição dos gêneros de Burseraceae nas tribos <i>Beiselieae</i> , <i>Bursereae</i> , <i>Canarieae</i> e <i>Protieae</i>	17
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades farmacológicas de plantas do gênero <i>Protium</i>	23
Tabela 2. Estruturas e mecanismos de ação das principais drogas empregadas na terapia da leishmaniose	44
Tabela 3. Parâmetros cromatográficos empregados na etapa de <i>screening</i> do desenvolvimento do método de separação dos compostos do extrato <i>DF</i> por UPLCPDA	52
Tabela 4. Gradiente da fase móvel na análise de UHPLC-MS/MS TQD do extrato <i>DF</i> de <i>T. rhoifolia</i> Willd.....	54
Tabela 5. Identificação dos compostos encontrados no extrato bruto das folhas de <i>Trattinickia rhoifolia</i> Willd em diclorometano (<i>DF</i>) por HRGC-MS/MS (Fig. 14).....	61
Tabela 6. Indicações dos íons encontrados no extrato <i>DF</i> da espécie <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo, relacionados aos compostos que apresentam atividades biológicas descritas na literatura.....	65
Tabela 7. Indicações dos íons encontrados no extrato <i>DF</i> da espécie <i>T. rhoifolia</i> Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo, relacionados aos compostos que apresentam atividades biológicas descritas na literatura	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	Teste de Próton Ligado
BALB/C	Linhagem genética de camundongo
BPA	Batalhão de Polícia Ambiental
C ₃ H/HeN	Linhagem de camundongo
C57BL/6	Linhagem de camundongo
cAMP6	Monofosfato de adenosina cíclico
GC-MS/MS	<i>Gas Chromatography</i> do português cromatografia gasosa acoplada a Espectrometrias de Massas
CH ₂	Metileno
CH ₃	Metil
CR ₁	Receptores do complemento tipo 1
CR ₃	Receptores do complemento tipo 3
DBA/2	Camundongos inbred tradicionais
DF	Extrato diclorometânico das folhas da <i>Trattinnickia Rhoifolia</i> Willd
DIA	Laboratório de Desenvolvimento, Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica da Universidade Estadual de Londrina
DMF	Dimetil formamida
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EF	Extrato etanólico das folhas da <i>Trattinnickia Rhoifolia</i> Willd
GABA A/B	Ácido gama-aminobutírico
Gp	Glicoproteínas
gp63	Glicoproteína de 63 kilodaltons
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase
IV	Infravermelho
LCAD	Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCDB	Leishmaniose cutânea disseminada <i>borderline</i>
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography</i> do português cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LD	Limite de Detecção

LLa	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
MAO-A/B	Monoamina oxidase
MS	Espectrometria de Massas
MTT	3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
NAPRALERT	Natural Products Alert
NK	Célula Natural-killer
NO	Óxido Nítrico
NPNS	Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
OMS	Organização Mundial da Saúde
P388	Leucemia linfocítica experimental
PBS	Salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGF- β 1	Fator de transformação de crescimento β 1
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TIC	Cromatograma do Íon Total
TLRs	Receptores tipo Toll
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UNIR	Universidade Federal de Rondônia
UV	Ultravioleta

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	VISÃO GERAL DA FAMÍLIA BURSERACEAE	16
2.2	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS BURSERACEAE	18
2.3	CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE TRATTINNICKIA RHOIFOLIA WILLD.....	24
2.4	USO POTENCIAL DAS BURSERACEAES DA ESPÉCIE <i>TRATTINNICKIA</i>	24
2.5	TÉCNICAS EMPREGADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	27
2.6	DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	34
2.7	AGENTE ETIOLÓGICO.....	35
2.8	VETOR	36
2.9	CICLO BIOLÓGICO.....	37
2.10	AS LEISHMANIOSES.....	38
2.10.1	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	39
2.11	INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE NA LTA	40
2.12	TRATAMENTO	43
2.13	USO DE PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE	46
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVOS GERAIS	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	COLETA DA AMOSTRA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE	49
4.1.1	Secagem e Transporte	49
4.2	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS BRUTOS	50

4.2.1	Preparação dos extratos brutos folhosos etanólico e diclometânico	50
4.2.2	Desenvolvimento de método cromatográfico utilizando abordagem <i>Quality by Design</i>	50
4.2.3	Análise por HRGC-MS/MS realizadas no Laboratório Fenn de Espectrometria de massas na UFPR- Campus Jandaia do Sul	52
4.2.4	Análise por LC-MS/MS realizadas no Laboratório de produção de Imunorreagente e Técnicas moleculares (LIM/DCTA) na UEL – Londrina.....	53
4.3	PROTOCOLOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	54
4.3.1	Parasita	54
4.3.2	Animais.....	54
4.3.3	Obtenção de Macrófagos de Medula Óssea Murina.....	55
4.3.4	Atividade Antiproliferativa de Extratos Brutos <i>EF</i> e <i>DF</i>	55
4.3.5	Ensaio de Citotoxicidade Celular por MTT	55
4.3.6	Ensaio de Capacidade Leishmanicida.....	56
4.3.7	Cinética de Recuperação de Promastigotas de Macrófagos Infectados.....	57
4.3.8	Dosagem de Citocinas.....	57
4.3.9	Dosagem de Óxido Nítrico.....	57
4.3.10	Análise Estatística	58
4.3.11	Aspectos Éticos	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA.....	59
5.1.1	Perfil Químico de Extratos em Diclorometano (<i>DF</i>) de Folhas da Espécie <i>Trattinnickia Rhoifolia</i> Willd por HRGC-MS/MS	59
5.1.2	Perfil Químico de Extratos em Diclorometano (<i>DF</i>) de Folhas da Espécie <i>Trattinnickia Rhoifolia</i> Willd por UPLC-MS/MS	62
5.2	ENSAIO LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR.....	81
5.2.1	Atividade Antiparasitária	81
5.2.1.1	Atividade Leishmanicida dos Extratos <i>EF</i> e <i>DF</i> em Formas Promastigota de <i>L. amazonenses</i>	83
5.2.2	Ensaio de Viabilidade Celular por MTT com Extratos <i>EF</i> e <i>DF</i>	86

5.2.3	Ensaio Leishmanicida de BMDM de Camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> e Tratadas com Extratos <i>EF</i> e <i>DF</i>	87
5.2.4	Cinética de Recuperação de Promastigotas de Macrófagos Infectados.....	89
5.2.5	Dosagens de Citocinas.....	91
5.2.6	Dosagem de Óxido Nítrico.....	94
6	CONCLUSÃO	97
6.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	98
	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos os produtos naturais vêm sendo utilizados como matérias-primas em sínteses de compostos químicos ligados á atividades biológicas. Neste quesito, a biodiversidade brasileira é considerada a maior fonte de substâncias bioativas, por apresentar enorme potencialidade às novas descobertas de fármacos, o que tem favorecido o interesse das pesquisas na área farmacêutica (KORDALI, et al., 2008; ORLANDA, 2011).

Na geração de produtos medicamentosos visando à descoberta de novas drogas se torna incipiente o conhecimento empírico das aplicações, sendo fundamental o conhecimento químico de determinada espécie, considerando-se sua quimiodiversidade. Estudos estatísticos da NEPRALERT, de acordo com Verpoort (1998), em um levantamento das 250 mil espécies de plantas conhecidas mundialmente, apenas 14 mil (6%) foram estudadas quanto a atividade biológica e 38 mil (15%) apresentam estudos fitoquímicos (RÜDIGER, 2012). Logo, se torna imprescindível um trabalho completo que estimule o biomonitoramento e a caracterização de fitoquímicos.

O desenvolvimento de sínteses químicas em sua maioria foi planejado a partir de produtos naturais, e assim como os fármacos em uso clínico, são de origem natural (BOLZANI, et al., 2009).

As plantas apresentam em suas diversas partes, princípios ativos que tem como função específica a sinalização química relacionada: à comunicação entre espécies; à proteção contra microrganismos ou herbívoros; bem como à manutenção da sua espécie no meio. Entre os mecanismos que desempenham essas funções destacam-se os metabólicos secundários, que quando aplicados ao meio farmacológico são associados as atividade biológicas (NUNES, et al., 2006; ORLANDA, 2011).

Entre as plantas produtoras de princípios ativos, destaca-se a representatividade da Família Burseraceae, distribuída em 150 gêneros e conhecida por apresentar grande importância medicinal e econômica na região amazônica (CORRÊA, 1987). Dentre as representantes da família, pode se destacar a espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd conhecida entre as populações tradicionais como breu-branco. É uma planta utilizada no tratamento fitoterápico da Leishmaniose, processos inflamatórios, antimaláricos e repelentes. Sua utilização ocorre de forma

empírica e muitas vezes como único recurso terapêutico da região (GIRALDO, et al., 2000).

Neste contexto, a presente dissertação teve como objetivo avaliar a bioatividade dos extratos brutos etanólico (*EF*) e diclorometânico (*DF*), produzidos a partir das folhas da *Trattinnickia rhoifolia* Willd, visando verificar a sua atividade leishmanicida através de ensaios antiparasitários e imunomoduladores, relacionando aos principais constituintes químicos identificados por cromatografia gasosa e líquida acoplada a espectrometria de massas, objetivando auxiliar na descoberta de ativos para o tratamento da Leishmaniose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Essa introdução dará uma visão sobre os principais tópicos abordados nesta dissertação, desde a importância de estudos fitoquímicos no contexto químico - analítico, biológico, aplicabilidade empírica e científica da tribo em estudo *Canarieae* sp, passando pelas técnicas de extração, caracterização de extratos diclorometano (*DF*) e extrato etanólico (*EF*), bem como a finalização do trabalho de caracterização, e quantificação dos compostos majoritário da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, frente as atividade leishmanicida *in vitro* de *L.L.amazonensis*.

2.1 VISÃO GERAL DA FAMÍLIA BURSERACEAE

Burseraceae é uma família de árvores e arbustos que se destacam por exsudarem uma óleorresina muito aromática. Essa peculiaridade faz com que sejam conhecidas por diferentes nomes, como almescla, breu, breu-branco, breu-preto, breu-vermelho, breu-terra, breu-limão, breu-manga, caraña, copal, copal-ouro, copal-negro, elemi, manila-elemi, frankincenso, gugal, maaliol, mirra, okume, dentre outros nomes populares (MEDINA, 2002; GIRALDO, et al., 2000; RÜDIGER, 2012). A árvore, o tronco, as folhas e sementes da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd pertencente à família Burseraceae está ilustrada na Figura 1.

Figura 1 Espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd da família Burseraceae - árvore, tronco, folhas e sementes.



Fonte: do Autor.

A família Burseraceae compreende 18 gêneros, mais de 600 espécies, distribuídas por países da América Tropical, Malásia e noroeste da África. Porém, somente oito gêneros são presentes na América Tropical, no entanto, só seis são nativas (*Bursera*, *Crepidospermum*, *Hemicrepidospermum*, *Paraprotium*, *Tetragastris* e *Trattinickia*); as outras duas (*Dacryodes* e *Protium*) foram introduzidas e apresentam-se na região Amazônica (MEDINA, 2002).

Entre os gêneros mais prolíferos, dentro da espécie, destacam-se a *Commiphora* na região africana; *Canarium* na região asiática; e *Bursera* e *Protium* na região da América Tropical (GIRALDO et al., 2000). Engler (1931) e Giraldo et al. (2000) estabelecem 16 gêneros, classificados em quatro tribos distintas, pelas estruturas dos seus frutos que estão dispostos na Quadro 1.

Quadro 1. Distribuição dos gêneros de Burseraceae nas tribos *Beiselieae*, *Bursereae*, *Canarieae* e *Protieae*

Tribo¹	Gêneros¹	No. Espécies²
<i>Beiselieae</i>	<i>Beiselia</i> Forman	1
	<i>Aucoumea</i> Pierre	1
<i>Bursereae</i>	<i>Bursera</i> Lacq.	≈100
	<i>Commiphora</i> Jacq.	≈190
<i>Canarieae</i>	<i>Ambilobea</i> T.B.&R.	1
	<i>Boswellia</i> Roxb.	≈ 30
	<i>Canarium</i> L.	≈105
	<i>Dacryodes</i> Vahl	66
	<i>Garuga</i> Roxb.	4
	<i>Haplolobus</i> H.J. Lam	22
	<i>Pseudodacryodes</i> R. Pierlot	1
	<i>Rosselia</i> Forman	1
	<i>Santiria</i> Blume	24
	<i>Scutinanthe</i> Thwaites	2
<i>Protieae</i>	<i>Trattinnickia</i> Willd	13
	<i>Triomma</i> Hook. f.	1
	<i>Crepidospermum</i> Hook. f.	6
	<i>Protium</i> Brumf.	≈150
	<i>Tetragastris</i> Gaertn.	9

Fonte: Adaptado de Rüdiger (2012)¹ e Giraldo et al., (2000)².

2.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DAS BURSERACEAE

A família Burseraceae apresenta uma biodiversidade de compostos, a maioria das espécies tem como características a produção de óleo-goma-resina quando ocasionada a ruptura de partes do vegetal (GIRALDO et al., 2000).

Na medicina popular, tem seu uso considerado em tônicos e estimulantes, hemostáticos, antiblenorrágicos, antirreumáticos, no tratamento de doenças pulmonares, do estômago, em odontologia, como laxante, cicatrizante, analgésico e contraceptivo, entre outras aplicações, já que não é atribuído á uma doença em especial, visto que o mesmo sintoma pode ser decorrente de várias doenças (RÜDIGER, 2012; COSTA, 2010). Todavia, para o estabelecimento de novos fármacos de origens naturais não apenas a descrição da utilização popular tem que ser levada em consideração, mas também as substâncias presentes nas espécies a serem estudadas, correlacionando-as com atividades biológicas já relatadas.

As espécies pertencentes à família Burseraceae apresentam diferentes classes de substâncias, podendo citar os terpenóides: monoterpenos e sesquiterpenos, geralmente obtidas das frações consideradas voláteis; e diterpenos, triterpenos e esteroides das frações consideradas não voláteis. A presença de compostos aromáticos como cumarinas, fenilpropanoides, flavonoides e, em maior quantidade as lignanas, também já foi descrita, demonstrando seu potencial biológico (KHALID, 1983; GIRALDO et al., 2000; RÜDIGER, 2012).

Segundo Khalid (1983) e Assis (2013) entre os óleos essenciais já identificados encontram-se os monoterpenos e sesquiterpenóides, os mais comumente citados em trabalhos biológicos. Os monoterpenos monocíclicos são a classe dominante dentro das Burseraceae, distribuídos entre limoneno, α -felandreno e p-cimeno, bem como seus derivados de monocíclicos que também estão presentes os aldeídos, cetonas e ácidos, em menor frequência (KHALID, 1983; ASSIS, 2013). Segundo relatos de Villela (2014), esse grupo de compostos apresentam indicativos de atividade acaricida, anti-inflamatória, antileishmaniose e antiviral. Na literatura encontram-se trabalhos com monoterpenos bicíclicos do tipo tujano, pinano e canfano, que são associados à atividade antifúngica frente ao *Cryptococcus neoformans var. neoformans*, um fungo sistêmico humano, com alta prevalência em pacientes imunodeprimidos (ASSIS, 2013; GIRALDO et al., 2000).

Estudos publicados por Mesa et al. (2003) identificaram a presença

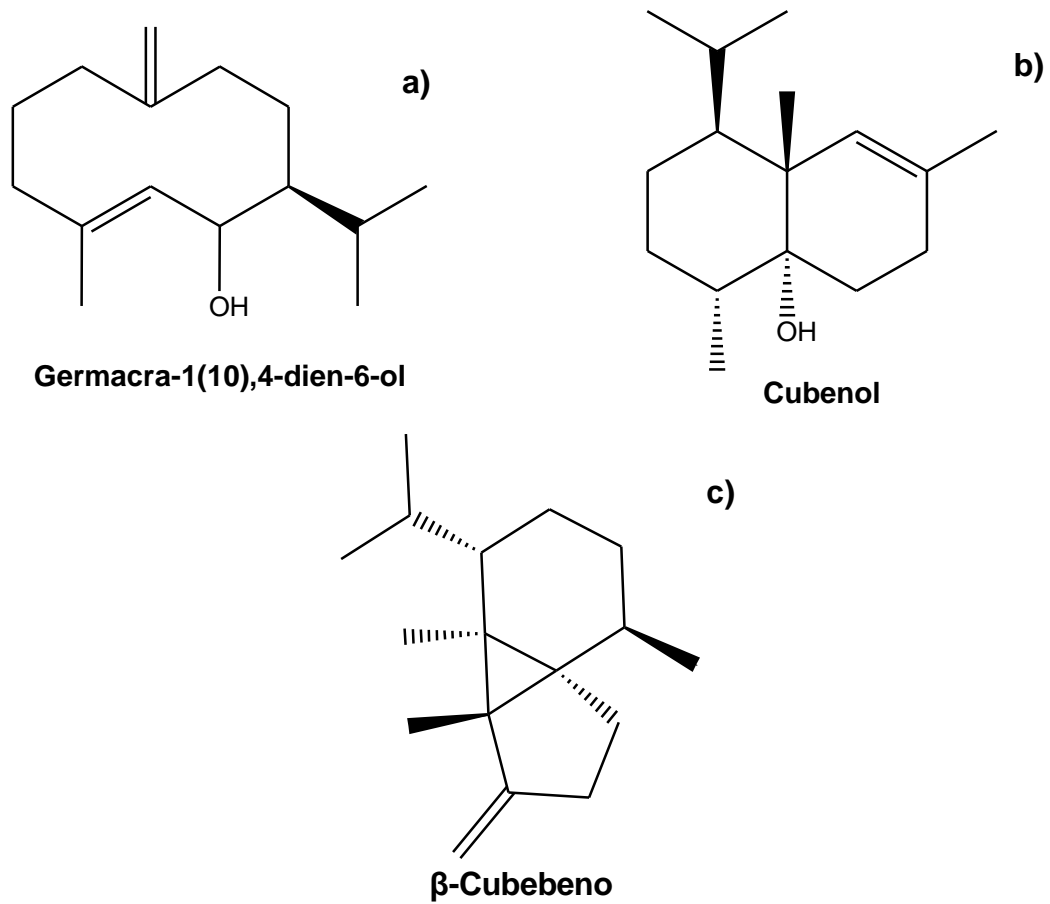
de sesquiterpenos dentro da família Burseraceae, sendo identificada uma ampla variação estrutural, com registro de mais de 30 sesquiterpenos. Os relatos mais comuns de sesquiterpenos estão nos gêneros *Canarium* e *Commiphora*, entre as exceções no gênero *Boswellia Carterii*, em que foi isolado o Cadinene em óleos essenciais obtidos das folhas, sendo detectados em menores concentrações em outras partes de algumas espécies (DUWIEJUA, 1993; MESA, et al., 2003).

A partir do gênero *Canarium* já foram isolados o grupo elemol, conforme representante da tribo ilustrada no Quando 1, que são constituintes da síntese do germacra-(10), 4 dieno (MM 222,40) (Figura 2a), amplamente utilizados no combate a *Phlebotomus*, agentes transmissores da malária e leishmaniose. Também foram isolados previamente das Burceraceas sesquiterpenos, como cubebenol (MM 222,37) (Figura 2b), e β -Cubebeno (MM 222,372) (Figura 2c), envolvidos com os mecanismos das respostas inflamatórias e imunológica (MESA et al., 2003).

Giraldo et al. (2000) relataram de algumas espécies da tribo *Canarieae*, o isolamento do furanosesquiterpenos, que também é derivado do esqueleto furanogermacrano, formado 2-acetil-8-12-epoxigermacra-1,(10), 4,7,11-tetraeno e 2-metil-8-12-epoxigermacra-1,(10) 4,7,11-tetraeno, que são fontes de droga antimalarial, sendo considerado a classe de compostos mais promissores para atividades imunomoduladoras, com pesquisas em busca de agentes antitumorais, como diterpenóide taxol, já utilizado no tratamento de câncer mamário e de útero, com resultados menos invasivos em pacientes imunodeprimidos.

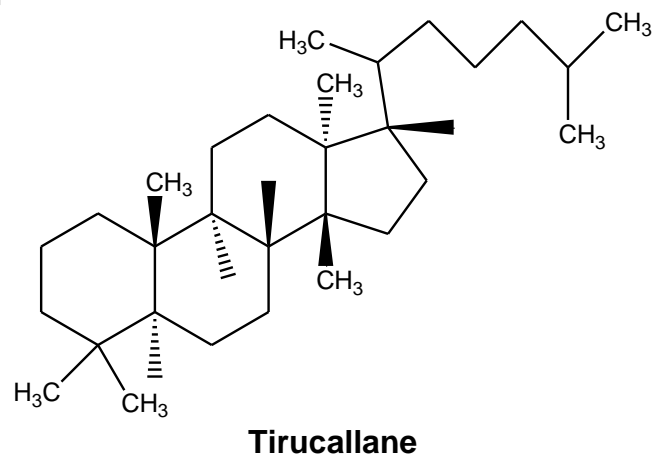
Em contrapartida, nas resinas das Burseraceae são encontrados triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos, responsáveis por características importantes como a oxidação devido à presença do tetracíclico tirucallane (Figura 3) que ocorre na cadeia lateral no C-17, comumente encontrado como ácido elemólico. Essa classe foi isolada nas espécies *Canarium schweinfurthii* e *Dacryodes eludis* da tribo *Canarieae*, em que o estudo relacionado aos compostos demonstrou atividade: anti-inflamatória, antimicrobiana, antiplasmódica, antiulcerogênica, anticariogênica, antiviral, anti-HIV, hepatoprotetora, cardioprotetora e analgésica (KHALID, 1983; ORTEGA 2002, FILHO, 2010).

Figura 2. Estruturas químicas dos compostos isolados do gênero *Canarium*



Fonte: Mesa et al. (2003).

Figura 3. Estrutura química do tetracíclico tirucallane



Fonte: Khalid (1983).

Os flavonoides, por sua vez são essenciais na sistemática das plantas, porém poucos relatos técnicos científicos foram encontrados sobre a

Burseraceae. O kaempferol, quercetina e seus respectivos derivados foram identificados na *Protium* e *Commiphora* (KHALID, 1983). Na literatura existem poucos relatos ligados à identificação de cumarinas em Burseraceae, porém na família já foram identificados os compostos cumarinolignoide e propacina isolada da *Protium opacum*, essas substâncias possuem atividade hepatoprotetora, imunomoduladora e anticancerígena (KHALID, 1983; CAMARGO, 2000; ALVARENGA, et al., 2016).

Assim a família Burseraceae destaca-se por apresentar amplo biomonitoramento. Na Tabela 1 está apresentado o potencial de atividade farmacológica encontrados em publicações das espécies.

Tabela 1. Atividades farmacológicas de plantas do gênero *Protium*

Espécie	Parte utilizada	Atividade biológica	Referência
<i>Protium paniculatum</i>	Partes aéreas	Anti-inflamatória, anti-leucêmico e antitumoral	ALMEIDA, 2013; OLIVEIRA et al., 2005
<i>Protium giganteum</i> Eng.	Óleorresina, entrecasca e folhas	Anti-inflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante	CORRÊA, 1987; MORAES et al., 2009
<i>Protium</i>	Folhas	Antiparasitária em formas epimastigotas <i>T. Cruzi</i> , promastigota e amastigota <i>L.(L.) hagasii</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , antifúngico do <i>Cryptococcus</i> ssp	RANGEL, 2010
<i>Protium heptaphyllum</i>	Partes aéreas	Antimicrobianas, anti-inflamatórias, antinociceptivas, ansiolítica, antidepressiva e gastroprotetor.	OLIVEIRA, 2009; ARAGAO et al., 2006; LIMA-JUNIOR et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014
<i>Protieae Canarieae</i>	Partes aéreas e sementes	Anti-inflamatória, cercaricida, antibiótica, antineoplásico, antioxidante, antitumoral, fungicida e ação analgésica	MENDES et al., 2010; OLIVEIRA, 2007
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	Óleorresina extraído do tronco e entrecasca	Tratamento de úlceras, anti-inflamatória, analgésica, antimalárica, doenças respiratória, atividade antimicrobiana, usado para desinfetar feridas e tratamento de reumatismo	RODRIGUES, 2010; MESA et al., 2003, DUWIEJUA, 1993; SILVA, 2010

2.3 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE *TRATTINNICKIA RHOIFOLIA* WILLD

O almecega ou breu-branco (*Trattinnickia rhoifolia* Willd) é uma árvore de pequeno porte (de 3 a 5 metros de altura), pertence à família Burseraceae e possui grande utilização pelos povos nativos das regiões onde o vegetal ocorre (DI STASI et al., 2002) (Fig. 1).

A resina aromática é encontrada em quase todas as partes da planta, com odores característicos atribuídos à presença de terpenos e usados no combate a mosquitos, bem como, na redução na prevalência de malária e leishmaniose nas aldeias indígenas (DI STASI et al., 2002). Desta forma, espécies do gênero *Trattinnickia* são amplamente conhecidas na região amazônica, devido à sua utilização na medicina popular como analgésico, anti-inflamatório, expectorante e cicatrizante, entre outras (JÚNIOR, 2005). No entanto, não existem até o momento pesquisas científicas que demonstre sua ação, ou mecanismo de ação nas doenças parasitárias como a leishmaniose.

2.4 USO POTENCIAL DAS BURSERACEAES DA ESPÉCIE *TRATTINNICKIA*

A identificação dos compostos químicos da família *Burseraceae* passou por extensivo mapeamento, sendo evidenciadas as propriedades farmacológicas, tais como atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária e antifúngica (DUWIEJUA, 1993; DESTA, 1993; LIMA, 1992; RAHALISON, 1993; CLAESON, 1992).

A espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd apesar de ser amplamente utilizada pela medicina popular na região amazônica para o tratamento de diversas enfermidades, entre elas a leishmaniose, devido as suas propriedades analgésica, anti-inflamatória, expectorante e cicatrizante, apresenta poucos estudos quanto ao seu mapeamento químico (JÚNIOR et al., 2005).

Na literatura existem relatos quanto o uso da resina obtida da planta no tratamento contra nematoides (SHARMA, 1991); no tratamento de leucemia e carcinomas (JING et al., 1995; SALAZAR et al., 2010); além de apresentar atividade hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2005). Salazar et al. (2010) identificou o composto β -bisaboleno (Fig. 4a) com forte poder fungicida (LORENZI et al., 2002), além da

amentoflavona (Fig. 4b) que está relacionada com retardo na degradação e envelhecimento celular, atividade anticancerígena e outras biofunções.

Em outro estudo a *T. rhoifolia* apresentou o composto caracterizado como o β -sitosterol (Fig. 4c) em estudos *in vitro*, no qual se observou que o pré-tratamento utilizando-se células humanas de câncer de mama foi capaz de inibir a invasão celular. Em teste *in vivo* evidenciou-se a redução no número e nas dimensões de tumores nas metástases nos nódulos linfáticos e nos pulmões (BREDA, 2010).

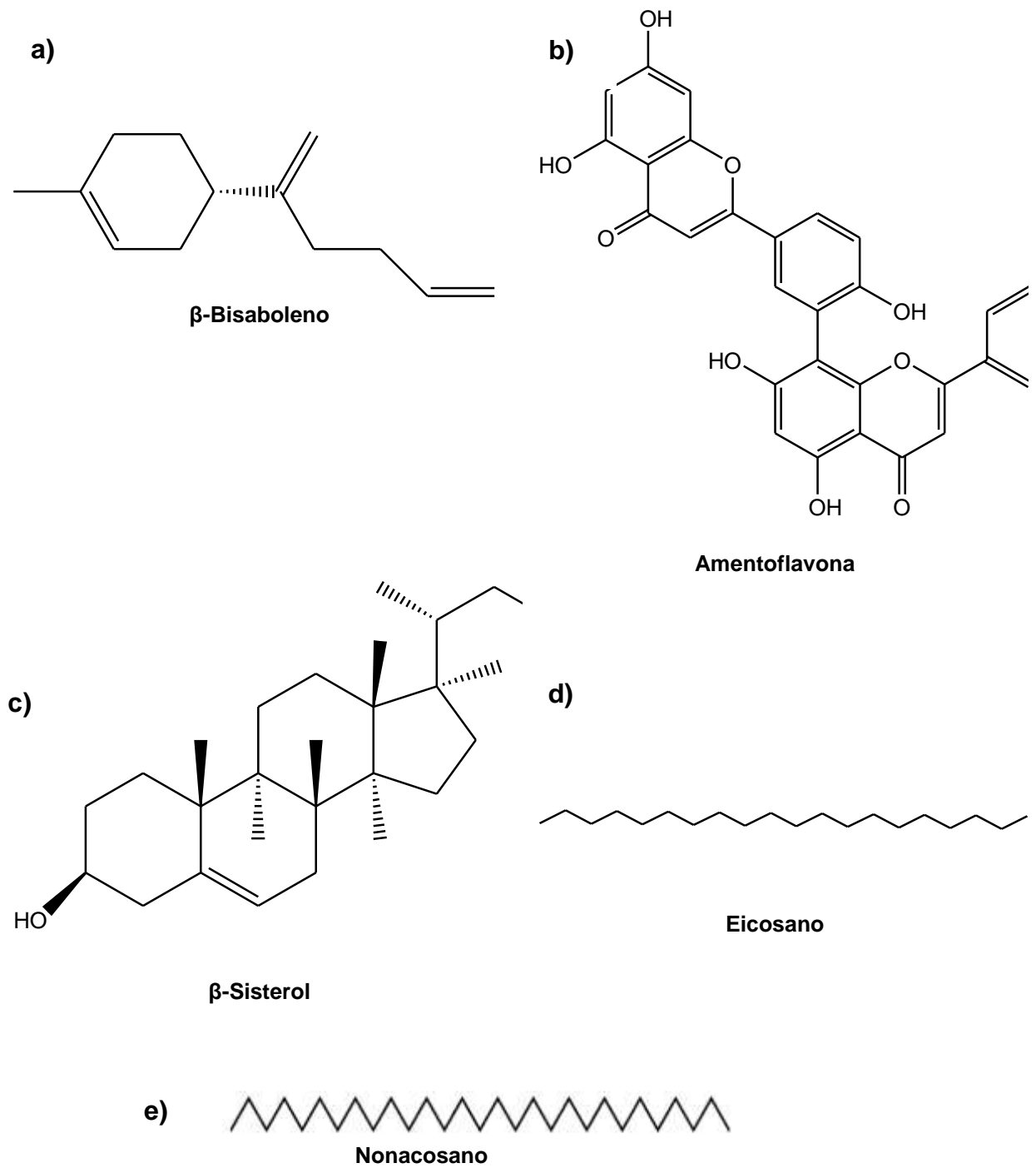
Estudos envolvendo o eicosano (Fig. 4d) e nonacosano (Fig. 4e) produziram importantes efeitos antiparasitários contra cepas de *Leishmania major*, *L. donovani*, *Trypanosoma brucei*, além de atividade citotóxica contra vários tipos de células tumorais (DI STASI, 2002).

Neste contexto, é importante relatar que pesquisas com extratos hidroalcoólicos das folhas da *Trattinnickia rhoifolia* Willd apresentaram atividade estimulante no tratamento e prevenção de tumores e leucemia. Testes com extratos das folhas produzidas com diclorometano e acetona mostraram efeito moderado na célula de leucemia P388 de murganhos (Leucemia linfocítica experimental originalmente induzida em camundongos DBA/2 com metilcolantreno) (SALAZAR, 2010).

Salazar et al. (2010) e Gutmann (2002) ao realizarem estudos com extratos folhosos da *Trattinnickia rhoifolia* que continham amentoflavona (Fig. 4b), os autores observaram indicativo de inibição de receptores de adenosina GABA-A e B, 5-hidroxitriptamida, benzodiazepínico central, forscolínico e inositol trifosfato e enzimas MAO A e B; cuja inibição dessas enzimas resultam em uma resposta antidepressiva.

Nesta perspectiva, autores têm relatado que a amentoflavona apresenta atividade inibitória da cAMP fosfodiesterase entre outras enzimas; o processo de iniciação destas enzimas e, resultados na regeneração de tecidos (SAPONARA et al., 1998; SALAZAR, 2010). Banerjee et al. (2002) e Salazar et al. (2010) realizaram experimentos com mesmo bioativo, resultando em atividades antioxidantes e antifúngicas, anti-inflamatórias. Outros estudos promissores com uso do composto foram ligados á atividades anti-HIV, estabelecendo a espécie com uma das mais promissoras no perfil fitoquímico para novos fármacos.

Figura 4. Compostos encontrados na *Trattinnickia rhoifolia* Willd



Fonte: Salazar et al. (2010), Breda (2010) e Di Stasi (2002).

2.5 TÉCNICAS EMPREGADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS

As técnicas analíticas na identificação de compostos orgânicos são instrumentos indispensáveis, podendo ser compreendida como um conjunto de métodos empregados com o intuito de separar, quantificar e elucidar compostos, tal como as técnicas cromatográficas.

A cromatografia é uma técnica utilizada na separação dos componentes de uma amostra, os quais se distribuem em duas fases, uma estacionária e a outra móvel (LANÇAS, 2009). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, que passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura. Esta separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel (PERES, 2002).

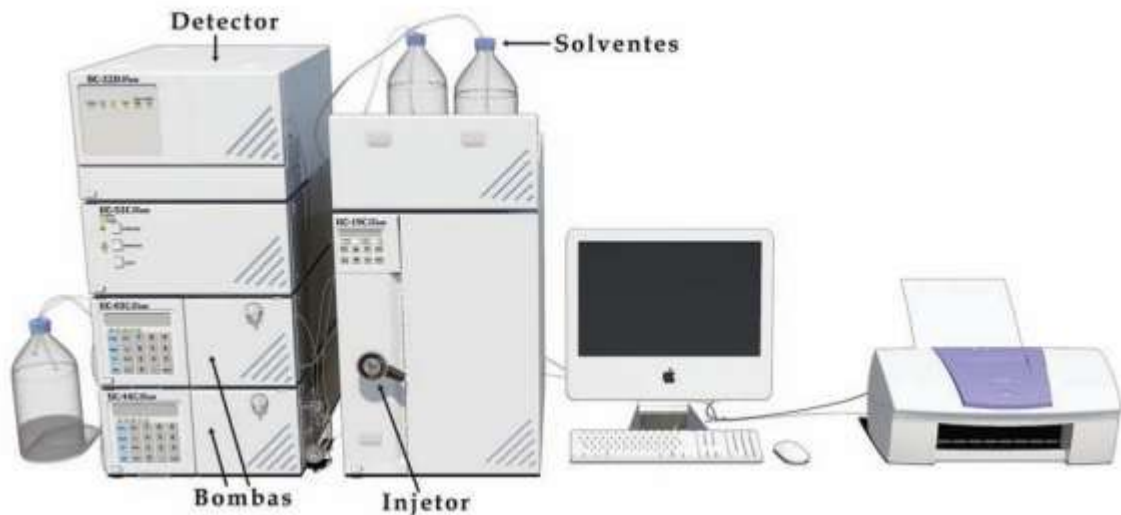
Os principais métodos cromatográficos são: cromatografia em papel (CP), cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG do inglês GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE do inglês HPLC).

A escolha do método a ser empregado depende da amostra utilizada, mas em laboratórios de pesquisa o HPLC e o GC, assim como equipamentos analíticos superiores (UPLC, UHPLC e HRGC) são comumente encontrados (DEGANI et al., 1998; PERES, 2002).

A cromatografia líquida se tornou uma das técnicas de separação mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos, pelo fato da sua alta sensibilidade e seletividade. Os componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de dados, empregado para separação de espécies iônica ou macromoléculas e compostos termolábeis (PERES, 2002). A Figura 5 ilustra o diagrama de um sistema de cromatografia a líquido. O eluente ou fase móvel, acondicionado em um frasco apropriado, é aspirado por uma bomba de alta pressão em direção à coluna. No percurso, a amostra é introduzida na fase móvel, por uma válvula de injeção e arrastada para a coluna, no qual ocorre a separação. Posteriormente, o eluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da mesma. O sinal gerado pelo detector é captado por um *software* apropriado e um cromatograma é gerado, mostrando a

variação do sinal do detector em função do tempo de análise (DONG, 2006; SNYDER et al., 2009).

Figura 5. Esquema de um cromatógrafo a líquido (HPLC)



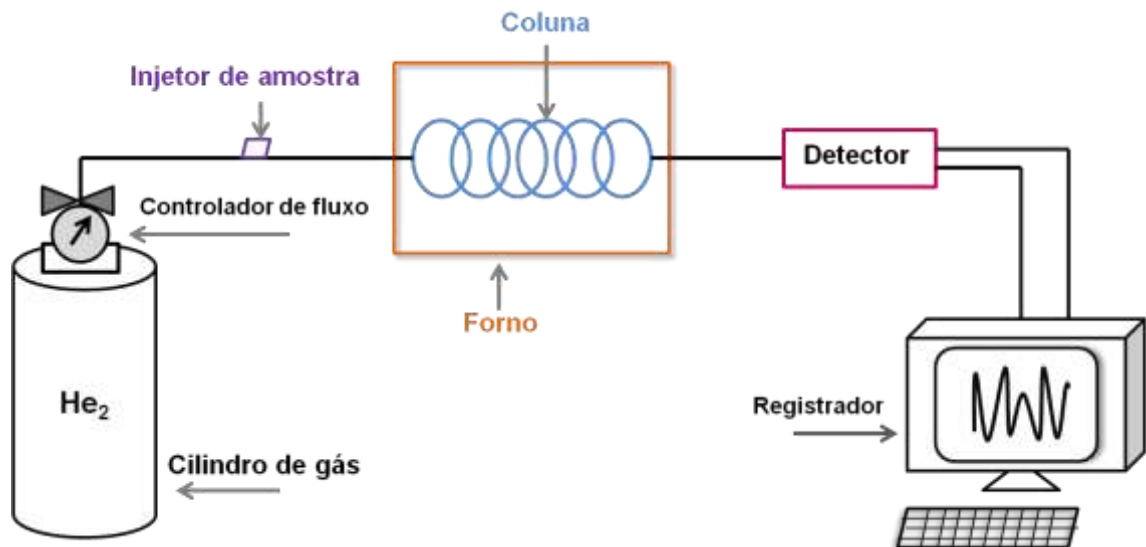
Fonte: Lanças (2009).

Os detectores são os mais variados e a escolha do sistema de detecção depende da finalidade do estudo. A escolha do detector caracteriza parâmetros de alta sensibilidade, seletividade, rapidez de resposta, linearidade e estabilidade frente a mudanças de temperatura e composição da fase móvel ao cromatógrafo líquido. Os sistemas de detecção mais utilizados são os detectores de ultravioleta-visível (UV-Vis), arranjo de fotodiodos (PDA), fluorescência (FLD), índice de refração (IR) e o analisador de massas (EM do inglês MS) (CASS, DEGANI et al., 1998).

Na cromatografia gasosa o método está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida. Como característica tem-se a rapidez, que ocorre na ordem de minutos em relação as análises por amostra, sendo altamente sensível na detecção, possibilitando a identificação de compostos de nanogramas (10^{-9}) até picogramas (10^{-12}). A limitação da técnica é a necessidade de que a amostra seja volátil, estável termicamente e apresente baixa massa molecular, a fim de que possa passar através da coluna na forma de vapor e evitar decomposição nas condições de separação (DEGANI et al., 1998; LANÇAS, 2009).

Os componentes básicos de um cromatógrafo gasoso são: cilindro do gás de arraste mantido sob alta pressão, injetor, coluna, forno, detector e registrador, conforme ilustra a Figura 6.

Figura 6. Componentes básicos de um cromatógrafo a gás (GC)



Fonte: do Autor adaptado de Lanças (2009).

A fase estacionária da cromatografia gasosa é um material, líquido ou sólido, o que proporciona a separação da mistura através de processos físicos e químicos. A fase estacionária líquida é um líquido pouco volátil que recobre um suporte sólido, separando as substâncias presentes na amostra através das diferenças de solubilidade e volatilidade. Como fase móvel é utilizado um gás (hidrogênio, nitrogênio ou hélio), denominado gás de arraste, que transporta a amostra através da coluna de separação, disposta dentro de um forno, até o detector onde os compostos separados são detectados (COLLINS et al., 2011; PERES, 2002). Durante a análise, a temperatura da coluna da separação pode permanecer constante ou sofrer variações com alcance de até 300°C, para que solutos de baixo ponto de ebulição possam ser eluídos (COLLINS et al., 2011).

Os detectores do GC transformam as variações na composição do gás de arraste em sinais elétricos (COLLINS et al., 2011) sendo os mais utilizados os detectores de condutividade térmica (DCT), detector de ionização de chama (DIC do inglês FID), detector de captura de elétrons (DCE do inglês ECD), detector de

fotométrico de chama (DFC) e detector de espectrometria de massas (EM do inglês MS) (LANÇAS, 2009).

Tanto na cromatografia líquida quanto na gasosa o detector de espectrometria de massas se tornou uma das ferramentas analíticas mais utilizadas, pois o acoplamento com EM ou MS pode fornecer a massa molecular dos solutos e contribuir com a elucidação estrutural de moléculas (CASS et al., 2001). Na prática, o acoplamento de técnicas de separação à espectrometria de massas alcança um nível de precisão e confiabilidade da informação analítica (GROSS, 2004).

A cromatografia gasosa foi a primeira técnica a ser acoplada com o detector de massas, devido a facilidade de manuseio do efluente gasoso do cromatógrafo (RODRIGUES et al., 2006). O método de ionização empregado no CG ou GC é o de impacto de elétrons, sendo os espectros bem documentados em bibliotecas (LANÇAS, 2009). Na ionização por impactos de elétrons, as moléculas das amostras, vindas do sistema cromatográfico, entram na fonte de íons e são ionizados pelas colisões com os elétrons gerados num filamento de tungstênio ou rênio, com energia envolvida de 70 eV, utilizado para identificar a massa molecular e os fragmentos ionizados (HOFFMANN et al., 2007).

A LC-MS combina o poder de separação da cromatografia líquida de materiais de grande massa molecular, baixa volatilidade e polares, com a capacidade da espectrometria de massas em detectar seletivamente e confirmar a identidade molecular (LANÇAS, 2009). O acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas levou a uma grande variedade de interfaces e ao desenvolvimento de novos métodos de ionização para a espectrometria de massas (GROSS, 2004). As técnicas de ionização à pressão ambiente, tais como a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por eletronebulização ou eletrospray (ESI) tornaram a técnica de LC-MS aplicável para uma grande variedade de matrizes (HOFFMANN et al., 2007). Durante a análise, a amostra líquida que sai da coluna do LC é pulverizada para produzir microgotas, que evaporam rapidamente liberando as moléculas de analitos ionizadas que podem, então, ser identificadas via MS. Essa ionização é branda, em relação ao CG-MS, pois utiliza baixa energia, há a possibilidade de existir coeluição e, os espectros obtidos apresentam poucos íons para determinação estrutural dos analitos (RODRIGUES et al., 2006).

A química é a área na qual as técnicas cromatográficas são mais

utilizadas, sendo muitos os trabalhos publicados que utilizam às técnicas, conjuntamente com a farmacêutica, que também tem amplo campo de utilização. É extremamente eficiente em dosar princípios ativos de drogas em medicamentos (ANVISA, 2012), isolar bioativos presentes em plantas (LÜ et al., 2012), na estruturação e elucidação de farmacocinética (AMORIM, et al., 2008) entre inúmeros outros usos.

Diante de muitos estudos validados cientificamente, várias espécies vegetais apresentaram expressivas atividades farmacológicas. No entanto, as técnicas divergem quanto aos métodos de identificação, entre esse está a cromatografia. A caracterização pode ser feita pelo fracionamento dos extratos e isolamento do composto alvo, por meio de injeção direta. Porém, durante esses procedimentos podem ocorrer perdas de propriedades farmacológicas, ou em caso de injeção direta dos extratos, a eluição de inúmeros compostos dificultam sua elucidação. Visando minimizar essas perdas e melhorar o uso dos recursos analíticos, tem-se realizado os experimentos com base na técnica desenvolvida de *Quality by Design* (JACKSON et al., 2015; JOSEPH, 1994; YU et al., 2014).

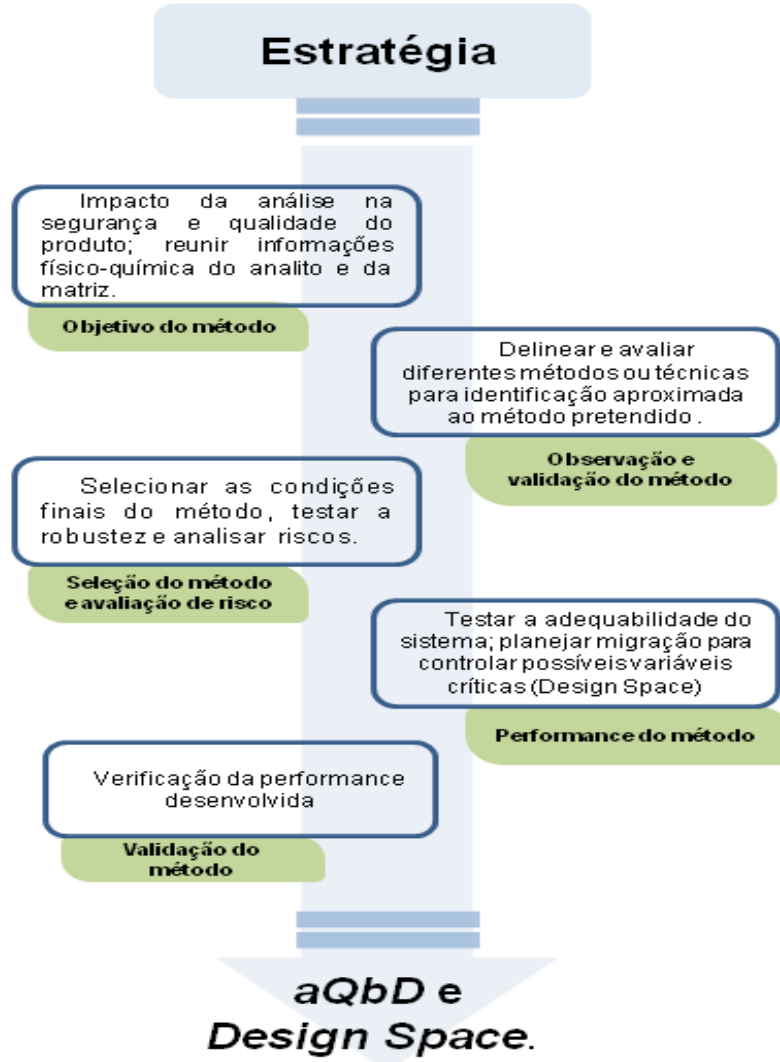
O termo *Quality by Design* (QbD) em português “qualidade desde o projeto” ou “qualidade baseada no projeto”, foi desenvolvido na década de 60 por J. Moses Juran. A técnica empregada em projetos de qualidade e resolução de problemas de desenvolvimento de produtos, em maneira prática, envolve o controle de cada etapa para maximizar a probabilidade de que o produto final alcance seus atributos de qualidade e as suas especificações (JACKSON et al., 2015; JOSEPH, 1994; YU et al., 2014). Sua utilização tem em meta a qualidade em produtos farmacêuticos empregando planejamentos experimentais bem definidos, através da flexibilização nos processos de fabricação, visando pro-atividade, sistemática e cientificidade, correlacionando-as com as análises (ROZET et al., 2011; SOLON, 2016).

No contexto químico-analítico, os conceitos têm sido estendidos e enfatizados pelos órgãos reguladores. Estes argumentam que os procedimentos analíticos, também são processos de produtos, bem como o *QbD* pode e deve, ser implementado no desenvolvimento de metodologias, já que representam componentes imprescindíveis no processo farmacológico (ROZET et al., 2011; SOLON, 2016, JACKSON et al., 2015; JOSEPH, 1994; YU et al., 2014).

Em abordagens recentes o *QbD* tem se destacado nas análises

cromatográficas (ROZET et al., 2011; SOLON, 2016, RABITO et al., 2014). A Figura 7 mostra os passos de desenvolvimento analítico através da estratégia a *QbD*.

Figura 7. Fluxograma geral das etapas do *QbD* e do delineamento *Design Space*



Fonte: Adaptado de Vogt et al.(2011).

Os componentes no desenvolvimento de métodos cromatográficos utilizando *QbD* são conhecidos como *Design Space (DS)* (SOLON, 2016). Logo, o *DS* compreende uma combinação de atributos e parâmetros que ocorrem de maneira multidimensional, visando à garantia da qualidade do processo, considerando que ocorrem interações de várias formas. O método é delineado para estar dentro de uma área *DS*, em que pequenas variações não provocam alterações significativas nos parâmetros analíticos pré-estabelecidos, gerando um método robusto.

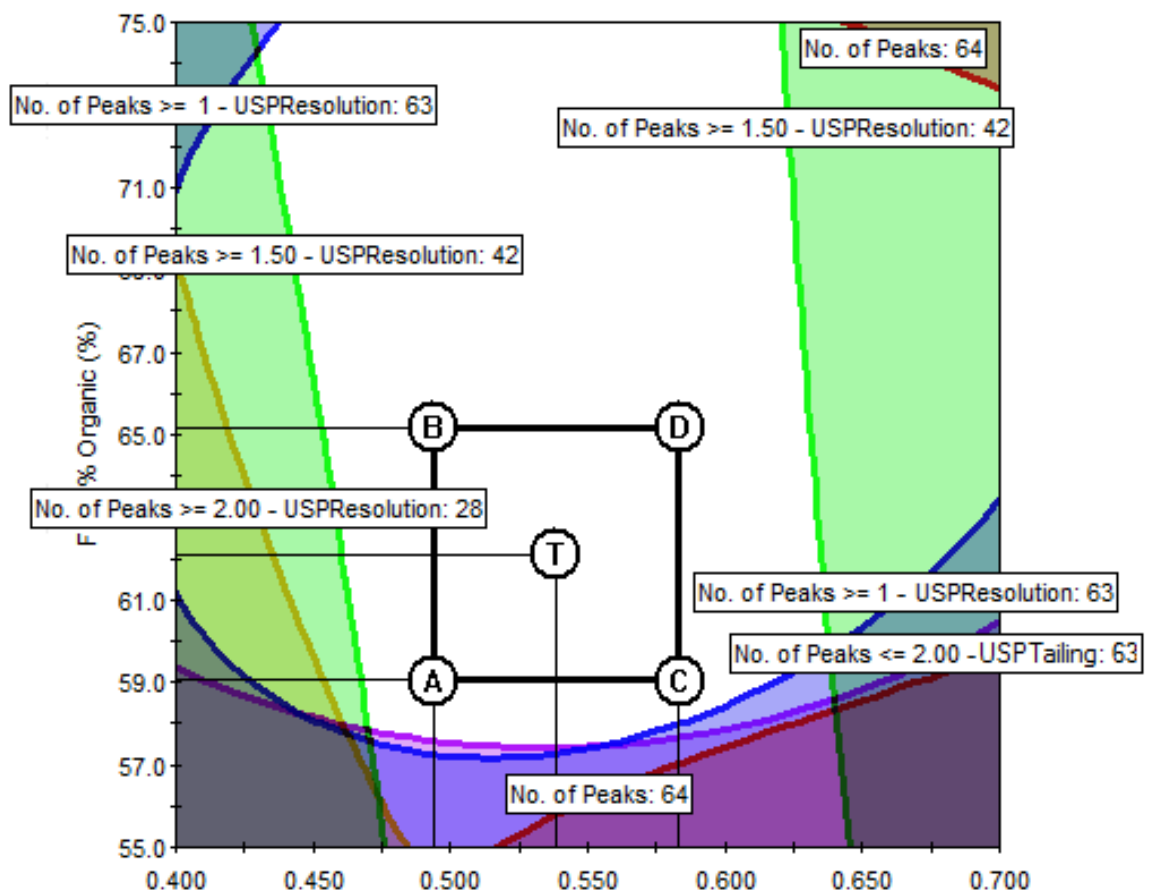
Assim, a região *DS* é considerada um domínio de fatores de entrada, que garante que as respostas criteriosamente escolhidas estejam dentro dos limites,

tornando o método desenvolvido mais abrangente e com nível de probabilidade aceitável.

A Figura 8 ilustra a otimização no desenvolvimento de método empregando o *QbD*. As condições de contorno levam em conta os fatores pré-setados de: resolução maior ou igual a 1 e assimetria de pico menor do que 2, para o maior número de picos cromatográficos, na proporção de fase orgânica variando de 55 a 75%. A área em branco mostra o *DS* onde as condições de contorno são satisfeitas. O quadrado A-B-C-D mostram as pequenas variações feitas pelo teste de robustez.

Geralmente são utilizados *softwares* específicos para desenvolvimento de métodos cromatográficos ou ferramentas cromatográficas, capazes de fazer o tratamento dos dados de forma multivariada (SOLON, 2016, SHMIDT et al., 2013).

Figura 8. Exemplo de *Design Space* na otimização de um método cromatográfico aplicando *QbD*



Fonte: Fusion®, 2015.

2.6 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

As doenças negligenciadas são enfermidades infecciosas que apresentam alto nível de morbidade, entretanto baixo nível de mortalidade, mas não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados, além de serem considerados endêmicos em populações de baixa renda (NWAKA et al., 2003 *apud* LIMA, 2014).

A lista de doenças consideradas negligenciadas possui variação entre os países. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) concentra seus esforços em dois grandes grupos: doenças tratáveis e contra as quais existem meios de combate (como filariose linfática, oncocercose, esquistossomose e dengue), e doenças ainda sem tratamento e que exigem cuidados específicos (como leishmaniose e doença de Chagas) (ASSAD, 2010; LYRA et al., 2012). Dentre as doenças negligenciadas estão a tuberculose, hanseníase, dengue e malária, enquanto que a doença do sono, doença de Chagas, esquistossomose e leishmaniose são intituladas como mais negligenciadas (ROCHA 2012; OMS, 2012). Esses grupos de doenças afetam diretamente a qualidade de vida e geram impactos socioeconômicos negativos para a população dos países afetados, em geral os mais pobres (OMS, 2007; ROCHA, 2012).

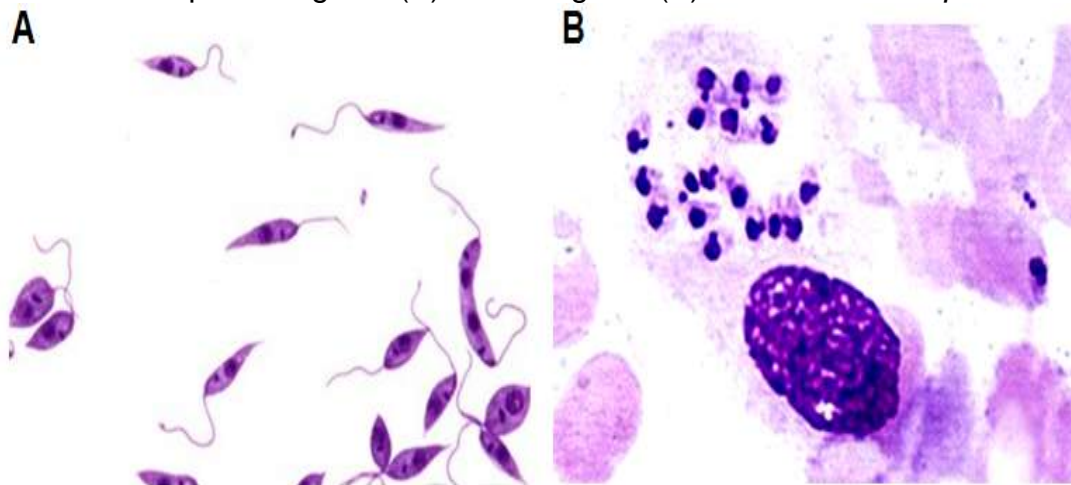
O grupo de doenças mais negligenciadas é agravado pela falta de investimentos na saúde, com poucos atrativos financeiros por parte da grande indústria farmacêutica. Logo, a falta de investimento reflete nos números referentes ao desenvolvimento e pesquisa de novos compostos para essas doenças, visto que entre 1975 e 2000, excetuando-se a malária, somente 13 novas drogas foram aprovadas para uso no combate a essas doenças. Dentro de um contexto mundial isso representa 0,9% de todos os medicamentos aprovados no mesmo período, evidenciando assim o descaso com essas doenças (ROCHA, 2012; OMS, 2007). Assim, existe uma necessidade de novas alternativas terapêuticas, mas os investimentos globais em pesquisa e desenvolvimento de fármacos e vacinas são extremamente insuficientes em relação às doenças negligenciadas (DESSOY et al., 2009).

2.7 AGENTE ETIOLÓGICO

As leishmanioses correspondem a um grupo de doenças causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Os parasitas são incluídos no Sub-Reino *Protozoa*, Filo *Sarcomastigophara*, ordem Kinetoplastida e família *Trypanosomatidae*, e são responsáveis por morbidade e mortalidade em vários países de zonas tropicais. É um parasita intracelular específico de células do sistema fagocítico mononuclear, caracterizado pela presença de uma organela rica em DNA, o cinetoplasto (FUMAGALLI, 2008; MIRANDA, 2011).

Estes protozoários se alternam em diferentes morfologias, onde no hospedeiro mamífero encontra-se na forma amastigota, que possui formato arredondado ou ovalado, com flagelo inaparente, e se prolifera no interior do vacúolo parasitóforo de fagócitos. No tubo digestivo do inseto vetor, encontra-se a forma promastigota, no qual o parasito é alongado e com flagelo livre (Fig. 9) (CUNNINGHAM, 2002; DESJEUX, 2004; FUMAGALLI, 2008; MIRANDA, 2011).

Figura 9. Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) da *Leishmania sp.*



Fonte: <<http://www.apelocanino.org/>>. Acesso: 9 jan. 2017.

A leishmaniose constitui um problema de saúde pública em 88 países, ocorrendo em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia). A taxonomia dos parasitas do gênero *Leishmania* no Novo Mundo é uma tarefa difícil, principalmente porque estão distribuídos em grandes áreas geográficas, logo existe grande diversidade de espécies e há dificuldades para compreender os diversos ciclos de transmissão, sendo indistinguíveis morfologicamente (CUPOLLILLO et al., 1998; BAÑUS et al., 1999; DINIZ, 2004; OMS, 2007).

A interação parasita-hospedeiro é complexa, a pluralidade no número de vetores/ou animais reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão do parasita, refletem na diversidade molecular em determinadas espécies de *Leishmania*, sendo necessário, portanto, aplicar diferentes métodos para a classificação taxonômica dos parasitas do gênero *Leishmania* (CUPOLLILLO et al., 1998; ISHIKAWA et.al, 2002; DINIZ, 2004).

Desde as primeiras observações por Cunningham (2002) em 1885 e posterior criação do gênero em 1903, por Ross, os números de espécies de *Leishmanias* descritas tem aumentado constantemente. Atualmente nas Américas, são reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies causadoras de leishmanioses tegumentares, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007; DEMARCHI, 2009; MIRANDA, 2011).

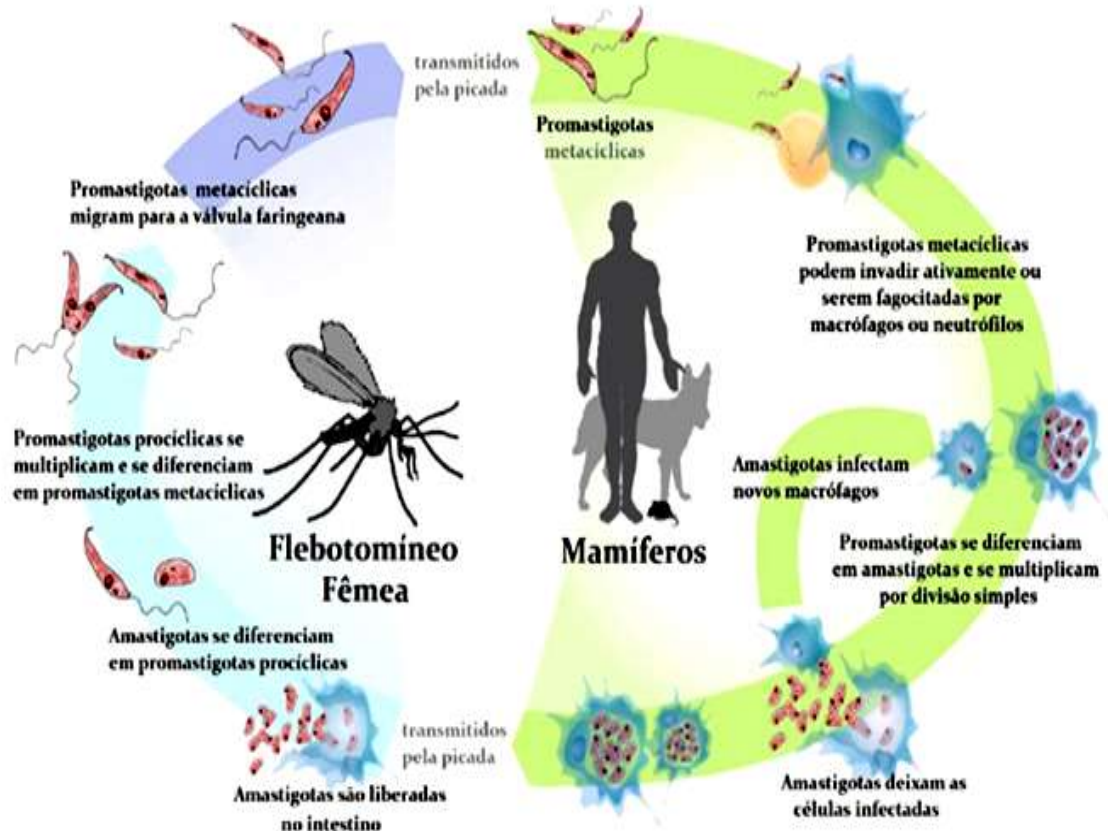
2.8 VETOR

Em relação ao vetor, são denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae* hematófagos classificados nos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (AZEVEDO et al., 1990; BRASIL, 2007; SILVA, 2012). Dependendo da região, os vetores são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Vale salientar que apenas as fêmeas têm hábitos hematófagos e são capazes de transmitir o parasita ao hospedeiro mamífero (GRIMALDI et al., 1993; FUMAGALLI, 2008).

2.9 CICLO BIOLÓGICO

Em linhas gerais, o ciclo biológico da doença é marcado por várias etapas que passam desde o momento da infecção, até a manifestação clínica das lesões. Ao realizar o repasto sanguíneo no indivíduo ou animal infectado, o inseto ingere juntamente com sangue as formas amastigotas do protozoário, existentes dentro de células fagocíticas, tais como os macrófagos (células do sistema fagocitário). Já no trato digestório do vetor, as formas amastigotas se transformam em promastigota procíclica, formas flageladas e móveis, alongadas, que apresentam núcleo central e cinetoplasma terminal. Essas formas são capazes de fazer divisão binária simples, porém não infectantes. Nessa ótica, estes protozoários prendem-se ao epitélio intestinal e, e as formas promastigotas passam por um processo chamado de metaciclogênese, tornam-se promastigota metacíclica, sem capacidade replicativa, porém infectantes (Fig. 10) (GRIMALDI et al., 1993; SACKS et al., 2001; DINIZ, 2004; FUMAGALLI, 2008; COSTA, 2010; SILVA, 2012).

Figura 10. Ciclo de transmissão da *Leishmania sp.*



Fonte: <<http://www.apelocanino.org/>>. Acesso: 9 jan. 2017.

No momento do repasto sanguíneo as promastigotas metacíclicas, juntamente com a sua saliva são inoculadas no hospedeiro vertebrado. Subsequentemente a inoculação, as formas promastigotas infectantes, são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans. As promastigotas interagem através de receptores das células hospedeiras com finalidade de favorecer a fagocitose, de maneira que os mecanismos microbicidas não sejam ativados com sua presença (DINIZ, 2004; GENARO, 2005). Nesta perspectiva autores têm relatado que as promastigotas deixam-se captar pelas células com capacidade fagocitária ligando-se principalmente a receptores do complemento (CR1 e CR3) e a receptores tipo Toll (TLRs) 2 e 4, assim como receptores de manose-fucose (AWASTHI et al., 2004; DINIZ, 2004; FUMAGALLI, 2008; COSTA 2010).

Após a internalização, ocorre a diferenciação das promastigotas em amastigotas. No entanto, as leishmanias quando internalizadas, residem no interior de fagossomos, onde ocorre maturação e fusão com organelas endocíticas formando vacúolos parasitóforos que morfologicamente são diferentes dependendo da espécie da *Leishmania* envolvida na infecção. Por exemplo, nas espécies *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) mexicana* as formas amastigotas residem em um único vacúolo grande, enquanto que nas espécies *L. (L.) major* ou *L. (L.) donovani* observam-se vários vacúolos pequenos por célula, cada um contendo um parasita ou eventualmente alguns poucos parasitas (SOLBACH et al., 2000; COSTA, 2010).

Independentemente da diferenciação os processos de multiplicação das amastigotas é por meio de divisão binária simples longitudinal. Deste modo, o número de parasitas aumenta no interior do macrófago até que ocorra o esgotamento do citoplasma e ruptura da membrana vacuolar e plasmática, liberando as amastigotas para o meio extracelular, possibilitando a sua captura por outras células fagocitárias próximas, reiniciando o ciclo (DINIZ, 2004; FUMAGALLI, 2008; COSTA, 2010).

2.10 AS LEISHMANIOSES

A leishmaniose apresenta um amplo espectro epidemiológico no mundo, causadora de morbidade e mortalidade. A forma e a severidade da doença dependem em grande parte da espécie de *Leishmania* infectante, assim como do

estado do sistema imunológico, bem como da resposta imunológica do indivíduo infectado (CARVALHO et al., 2003; DESJEUX et al., 2004; SOARES, 2006; WHO, 2011; SILVA, 2012).

Considerada um importante problema de saúde pública no mundo, entre as doenças negligenciadas e, sendo inclusa na relação de enfermidades prioritária pela OMS, a Leishmaniose está entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância, com incidência anual de dois milhões de casos das diferentes formas clínicas, oferecendo risco a 350 milhões de pessoas, as quais se encontram em países em desenvolvimento (SACKS et al., 2001; BRASIL, 2007; WHO 2011; SILVA, 2012). O Brasil apresenta 90% dos casos de *LT* que ocorrem no continente Americano, chamada Leishmaniose Tegumentar Americana (*LTA*). O Ministério da Saúde declara através de dados estatísticos que a região Norte apresenta aproximadamente 45% do total de casos no Brasil, a Região Nordeste 26% e, a Região Centro-Oeste 15% (CARVALHO, et al., 2003; DINIZ, 2004; MARZOCHI, et al., 1994; BRASIL, 2007).

Neste contexto, é importante relatar que a situação no Brasil é preocupante, pois embora as estatísticas não sejam precisas estima-se que o número de casos de *LTA* tenha aumentado e até dobrado (CAMARGO et al., 2003). No entanto, esse aumento pode ser devido à melhoria dos métodos de diagnósticos e da capacidade dos serviços de saúde de detecção de casos da doença, porém, na contra mão dos avanços dos diagnósticos nos grandes centros, a região amazônica, caracterizada pelo isolamento de comunidades tradicionais, possivelmente conta com muitos registros e tratamentos que deixam de serem realizados (CAMARGO et al., 2003; COSTA 2010).

2.10.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (*LTA*)

Na Leishmaniose Tegumentar Americana (*LTA*) o parasita ao invadir a pele entra em contato com macrófagos (células de Langerhans), localizadas no epitélio mucoso e camada epitelial, onde se iniciam as lesões. A maioria das manifestações se dá por uma lesão limitada e única, caracterizada pelo desenvolvimento de nódulos, que evoluem para lesões ulcerativas sem dor, recobertas por uma crosta aderente e exsudato seco, porém, esta enfermidade pode apresentar um amplo espectro de severidade e uma série de outras formas clínicas

(COSTA, 2007; GONZÁLEZ et al., 2008; KANGUSSU, 2010; SILVA, 2012). A forma clínica e a severidade da doença dependem em grande parte da espécie de *Leishmania* infectante, assim como do estado do sistema imunológico e constituição genética do indivíduo infectado (CUNNINGHAM, 2002; SOARES, 2006).

As manifestações clínicas da LTA compreendem três tipificações: a forma cutânea, com maior ocorrência entre as demais formas e caracteriza-se pela presença de uma única lesão, causada por espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. lainsoni* e *L. guyanensis*; a mucocutânea, uma forma debilitante da doença, porém, as lesões podem evoluir tornando-se desfigurantes; causada por espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana*; e por último a cutânea difusa, uma forma chamada de anérgica, porque se caracteriza pela presença de lesões difusas não ulceradas, associadas a uma fraca resposta celular e é causada por espécies *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e *L. amazonensis* (GRIMALDI et al., 1993; RASO et al., 1994; WEIGLE et al., 1996; KANE et al., 2000; ASHFORD, 2000; FUMAGALLI, 2008).

2.11 INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE NA LTA

Imediatamente após a picada do inseto flebótomo, e conseqüentemente com a entrada da forma promastigotas na pele, inicia-se uma resposta inflamatória (AHMED et al., 2001; TUON, 2011). As formas promastigotas podem sofrer ação lítica pelo sistema complemento e defesas imunológicas inatas antes mesmo do contato direto com macrófagos, tais: anticorpos inespecíficos, participação de células *natural killer* (NK), polimorfonucleares, e também por produtos oxidativos dos neutrófilos (DOMINGUEZ et al., 2002; HAWLISCH et al., 2005; JACOBS et al., 2005; TUON, 2011).

O desencadeamento da ação lítica é proveniente dos estímulos nervosos realizados pelo aparelho bucal do flebótomo, que também libera neuropeptídios, que atraem células inflamatórias para o local da picada, principalmente os macrófagos e neutrófilos (AHMED et al., 2001; TUON, 2011).

No entanto, os protozoários do gênero *Leishmania* possuem mecanismos que lhes permitem escapar do sistema imune, facilitando o agravamento dos processos infecciosos (MACHADO et al., 2004; SILVA, 2012). O processo de adesão do parasita à membrana celular envolve a participação de

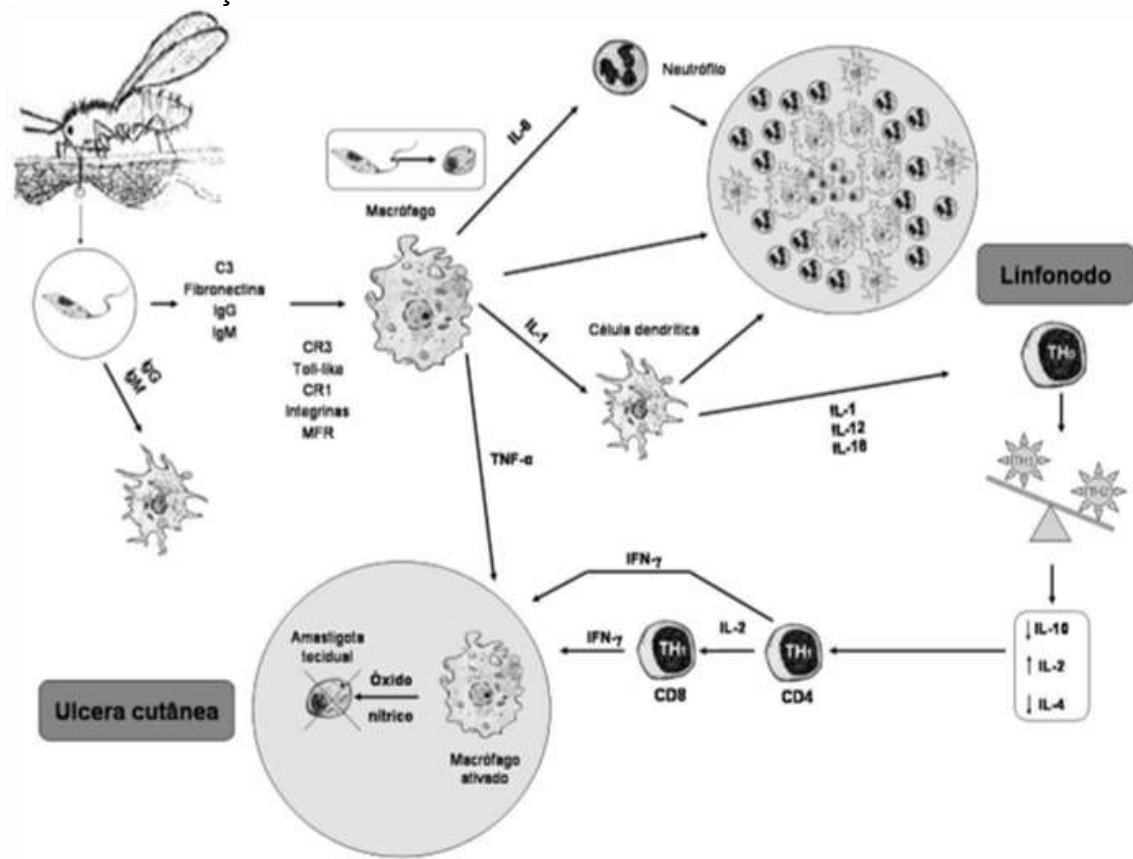
moléculas na superfície da *Leishmania* como a glicoproteína 63 (gp63) e a lipofosfoglicana (LPG), que interagem com receptores presentes nos macrófagos. Portanto, esta interação ocasiona uma série de reações bioquímicas que podem levar a ativação ou inibição das funções da célula hospedeira, caracterizada pela deflagração de processos oxidativos e produção de óxido nítrico (BRASIL, 2006; DEMARCHI, 2009).

Segundo Tuon et al. (2007), parasitas do genero *Leishmania* possuem alta atividade enzimática, capazes de degradar metabólitos oxidativos tóxicos desencadeados pelo macrófago, além de serem adaptáveis ao pH ácido do fagolisossomo. Isso tem como consequência o estabelecimento do parasita no organismo do hospedeiro, desencadeando a resposta imune e, favorecendo a infecção.

Além do reconhecimento e fagocitose do parasito, os macrófagos também atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs) aos linfócitos T CD4⁺ (GOMES-SILVA, 2011). A expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ efetores, que se diferenciam em células Th1, podem produzir citocinas inflamatórias como interferon-gama (IFN- γ), interleucina-12 (IL-12), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são responsáveis por recrutar e ativar células para combater a infecção. Por outro lado, se a resposta for preferencialmente do tipo Th2, citocinas como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), leva ao processo anti-inflamatório e progressão da lesão (LAUNOIS et al., 2002; PERTERS et al., 2006; TUON, 2011).

Assim dependente da espécie de *Leishmania* envolvida, e da resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro, o parasita pode escapar do local de inoculação e disseminar pela corrente sanguínea, levando a pequenas lesões na pele (CARVALHO et al., 1994). A Figura 11 mostra o esquema da resposta imune na leishmaniose cutânea.

Figura 11. Esquema simplificado da resposta imune na leishmaniose cutânea até a formação da ulcera cutânea



Fonte: Adaptado de Murray et al. (2006) e Tuon (2011).

As variações e interações do parasita pertencentes ao gênero *Leishmania*, foram em parte explicadas por estudos que identificam os fatores responsáveis pelos fenótipos de resistências e susceptibilidade. O modelo experimental utilizado foi de infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por *L. major* (HEINZEL et al., 1989). Enquanto, os camundongos B57BL/6 são resistentes, para os quais ocorre a liberação de citocinas como IFN- γ e IL-12 com indução a síntese de óxido nítrico (NO) e consequente morte do parasita, animais BALB/c apresentam em resposta à infecção de perfil de resposta do tipo Th2, (anti-inflamatório) liberando citocinas como IL-4 e IL-10, levando a evolução da lesão (HEINZEL et al., 1989).

Em animais infectados por *L. amazonensis* o perfil imune não é tão bem caracterizado quanto à bilinearidade do tipo Th1 ou Th2, observada nas infecções por *L. major* (TRIPATHI et al., 2007). Experimentalmente, tanto os camundongos BALB/c como os camundongos C57BL/6 infectados por *L.*

amazonensis são susceptíveis e incapazes de destruir o parasita de forma eficiente (FELIZARDO et al., 2007; VELASQUEZ, 2014).

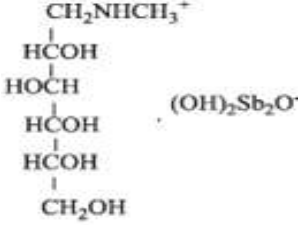
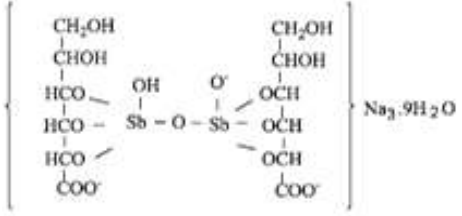
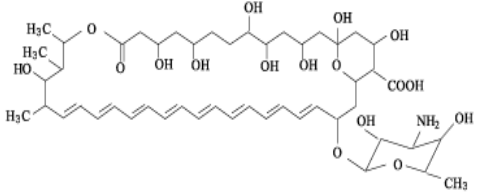
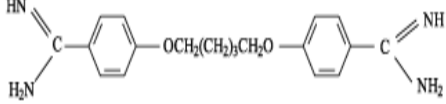
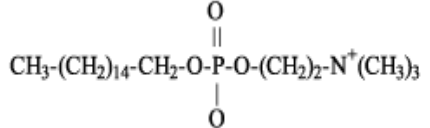
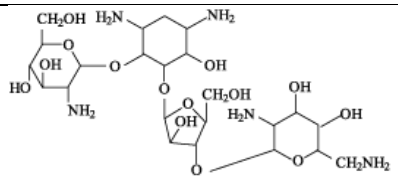
Enquanto a infecção causada por *L. major* requer somente a presença de IFN- γ , na infecção por *L. amazonensis*, a presença de TNF- α e IFN- γ são igualmente necessárias no sítio inflamatório (GOMES et al., 2003; VELASQUEZ, 2014). A produção de NO pelas células, está diretamente relacionada com atividade leishmanicida de macrófagos (GAUR et al., 2007; SILVA, 2008; VELASQUEZ, 2014). Contudo, a espécie *L. amazonensis* é capaz de inibir a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), tanto em níveis de sua atividade, como em nível de transcrição de seu gene (BALESTIERI et al., 2002). Assim, as variáveis no perfil de resposta imune desenvolvida nas diferentes linhagens de camundongos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* é que irá definir a resistência ou susceptibilidade do animal parasitado.

2.12 TRATAMENTO

O tratamento clínico das leishmanioses baseia-se na aplicação de compostos antimoniais pentavalentes, considerados fármacos de primeira escolha, desde 1912. Apesar de serem utilizados até os dias atuais, alguns detalhes de seus mecanismos de ação ainda permanecem obscuros para a ciência (MCMURRAY et al., 1998; FUNASA, 2000; KANGUSSU, 2010).

O estibogluconato de sódio, comercializado como Pentatostan[®] e o antimoniato de N-Metil glucamina, o Glucantime[®], são os fármacos utilizados atualmente no Brasil. O mecanismo de ação dos fármacos mostra que a inibição nas amastigotas, é realizada por meio de enzimas da via glicolítica e da β -oxidação, porém, por se tratar de um metal pesado, acredita-se que interfira em outros mecanismos da *Leishmania* hospedeiro (COSTA, 2007; SILVA, 2012). A Tabela 3 apresenta uma relação dos fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose e seus mecanismos de ação.

Tabela 2. Estruturas e mecanismos de ação das principais drogas empregadas na terapia da leishmaniose

Fórmula Estrutural	Nome do Fármaco	Ação
	Antimoniato de Meglumina (Glucantime)	Inibição da atividade glicolítica e via oxidativa dos ácidos graxos do parasita
	Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de Sódio (Pentostam)	Inibição da atividade glicolítica e via oxidativa dos ácidos graxos do parasita
	Anfotericina B	Inibição da via de síntese de ésteres de membrana
	Pentamidina	Interação com o cinetoplasto
	Miltefosina	Indução de apoptose, interferindo na transdução de sinal e homeostase do íon Ca ²⁺
	Paromicina	Inibição da síntese protéica nas mitocôndrias

Fonte: Adaptado de Croft et al.(2003).

A diversidade de espécies de *Leishmania* no Brasil configura quadros clínicos variados, com respostas terapêuticas diferentes. Além da diversidade das espécies, o tratamento é difícil devido à instalação intramacrofágica das formas que causam a infecção. Os antimoniais pentavalentes tem sua susceptibilidade quimioterápica, dependente da localização do parasita, que é

também influenciada pela presença de transportadores mediadores do influxo e do fluxo de drogas para as células (FUNASA, 2000; KANGUSSU, 2010).

Tais fármacos, devido às interações droga-célula, resultam em toxicidade, relacionadas a uma série de efeitos colaterais severos, incluindo náusea, vômito, diarreia, erupções na pele, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, artralgia, mialgia, desconforto abdominal, dor de cabeça, elevação reversível das enzimas hepáticas e ocasionalmente anemia (GONZÁLEZ et al., 2008; KANGUSSU, 2010). A toxicidade, o custo elevado e dificuldades de logística de administração, pois são administrados por vários dias ininterruptamente, fazem com que o paciente inicie o tratamento e, na maioria das vezes, não o complete (FUMAGALLI, 2008).

Conjuntamente a insurgência dos infectados, o insucesso terapêutico dos antimoniais são frequentemente registrados (FERREIRA, 2005). Em casos de resistência ao tratamento, podem ser utilizados outros fármacos considerados de segunda escolha (BRASIL, 2006; BRUNTON et al., 2006). Ainda, tem estudos que demonstram que a cura clínica, nem sempre é acompanhada de cura parasitológica, pois tem sido observado parasita em cicatrizes de indivíduos após tratamento (LUCUMI et al., 1998; SILVA, 2012).

Em casos de resistência ao tratamento, podem ser utilizados como fármacos alternativos a anfotericina B, pentamidina, miltefosine e a paramomicina, porém não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas (BERMAN, 2006; BRASIL, 2006).

Pelas dificuldades inerentes ao tratamento da doença, insurgências nos números de casos de resistência do parasita e de recidivas, representam grandes desafios e motivam à busca por um fármaco alternativo (FUMAGALLI, 2008). Assim, há o intuito de desenvolver uma vacina efetiva para a doença, onde diversos compostos químicos têm sido identificados e caracterizados como potencialmente eficazes, porém, até o momento nenhuma vacina totalmente efetiva foi produzida (FUMAGALLI, 2008; MIRANDA, 2011).

2.13 USO DE PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

O estabelecimento de novas drogas possui três vias: a primeira é o desenvolvimento de compostos sintéticos, baseado nos caminhos metabólicos dos parasitas; a segunda é o estudo de outros medicamentos que já se encontram no mercado, até então com atividade leishmanicida desconhecida (ex. medicamentos contra câncer) e, por último a utilização de plantas medicinais como fonte de moléculas antiprotozoário (LINDOSO et al., 2012; NOVA, 2012).

As plantas medicinais são conhecidas por suas propriedades terapêuticas, como método natural de tratamento e cura de doenças. A sua utilização foi disseminada por diversos grupos étnicos culturais e antecede a história escrita humana (BOLZANII et al., 2006; LIMA, 2014). A variedade química e as diferentes bioatividades das plantas vêm impulsionando o desenvolvimento de centenas de novos fármacos (LUIZE et al., 2005; LIMA, 2014), principalmente no que diz respeito a drogas antiparasitárias, devido à interligação íntima dos parasitas, seres vivos e plantas medicinais (ANTHONY et al., 2005; NOVA, 2012). Assim, os produtos naturais, através dos metabólitos secundários, que são fontes distintas de bioativos, já validados por estudos, com agentes seletivos constituem em novas fontes para o tratamento de doenças tropicais, causadas por protozoários e outros parasitas (MISHRA et al., 2009).

Logo, o conhecimento do metabolismo das plantas, é entendido como um conjunto de reações químicas, sínteses de compostos como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e nucleotídeos, essenciais para a sobrevivência dos vegetais (MORAIS, 2007). Sabe-se, que muitas das substâncias produzidas pelos metabolismos secundários, apresentam atividades biológicas importantes na adequação das plantas ao nicho ecológico. Estas adequações essenciais asseguram diversas funções, tais como: defesa contra herbívoros e microrganismos; proteção contra raios UV, entre outras atividades (FUMAGALLI, 2008).

Em contrapartida, a alta toxicidade dos fármacos utilizados atualmente e as formas resistentes de *Leishmania* têm impulsionado as pesquisas de síntese de novos compostos sintéticos e semi-sintéticos e, o uso dos produtos naturais, principalmente os fitoterápicos tradicionais, usados para tratamento de doenças parasitárias (TEMPONE et al., 1993; LIMA, 2014). Estudos de classes de

metabólitos especiais têm sido reportados na literatura, como eficientes agentes leishmanicidas (CARVALHO et al., 2001; LIMA 2014). Alguns alcaloides da classe dos quinolínicos (FOURNET et al., 1996), isoquinolínicos (AKENDENGUE et al., 1999); e indólicos (MUNOZ et al., 1994) tem sido utilizados como promissores frente a distintas espécies de *Leishmania* (LIMA, 2014). Estudos já conduzidos identificaram 49 plantas, sendo usadas no tratamento de lesões cutâneas causadas por *leishmania* (SOARES et al., 2004).

A espécie *Cocos nucifera*, apresentou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, e nos ensaios com macrófagos infectados foi observado diminuição de 44% na carga parasitária e, aumento considerável na produção de óxido nítrico, agente responsável pela morte das formas amastigota intracelular. Outros estudos demonstraram progressivo efeito leishmanicida para as formas promastigotas e amastigota de *L. amazonensis* quando tratadas com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (SOARES et al., 2004; LIMA, 2014).

Assim, as pesquisas por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade, são estimulados. Visando o desenvolvimento foi criado o Programa de Doenças Tropicais da OMS, que vem considerando a investigação sobre o uso de plantas no tratamento de leishmaniose, como essencial e de alta prioridade (OMS, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a atividade leishmanicida e imunomoduladora dos extratos etanólico (*EF*) e diclorometânico (*DF*) das folhas da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, procurando relacionar com os compostos descritos na literatura como tendo atividade biológica, identificados por cromatografia acoplada à espectrometria de massas - gasosa (GC-MS/MS) e líquida (LC-MS/MS).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato bruto etanólico (*EF*) e diclorometânico (*DF*) das folhas de *T. rhoifolia* Willd;
- Avaliar a capacidade leishmanicida de macrófagos pré-tratados com extratos *EF* e *DF* de *T. rhoifolia* Willd infectados com a forma promastigota da *L. amazonensis*;
- Verificar a toxicidade dos extratos *EF* e *DF* de *T. rhoifolia* Willd em macrófagos residentes de BALB/c, infectados com *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar a ação imunomoduladora em macrófagos infectados com *L.(L.) amazonensis* pré-tratados com extratos *EF* e *DF* de *T. rhoifolia* Willd e;
- Identificar compostos voláteis dos extratos *EF* e *DF* de *T. rhoifolia* Willd por GC-MS/MS, confirmando através de compostos descritos na literatura que apresentem atividade biológica;
- Desenvolver método cromatográfico aplicando o *QbD* para separação dos compostos do extrato *DF* de *T. rhoifolia* Willd, visando aplicá-lo na identificação de compostos por LC-MS/MS;
- Identificar compostos não voláteis por UPLC-MS/MS em tandem quadrupolo no modo positivo e negativo buscando compostos descritos na literatura com atividade biológica na família Burseracea e *T. rhoifolia* Willd.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DA AMOSTRA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

As folhas verdes de uma árvore conhecida como almecega ou breu-branco foram coletadas em abril de 2014, no município de Candeias do Jamari - Estado de Rondônia, nos imediações do Batalhão de Polícia Ambiental (BPA), coordenada geográficas (S 08° 48' 35" e W 62° 41' 44).

As amostras coletadas foram identificadas pela Universidade Federal de Rondônia como pertencente à espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, sob o número de depósito 10.242/2015.

4.1.1 Secagem e Transporte

As folhas foram secas em estufa de ar circulante a 40°C durante o período de 5 dias. Após término da secagem, as amostras foram trazidas para a Universidade Estadual de Londrina onde foram preparadas e analisadas no: Laboratório de Desenvolvimento, Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica (DIA) (preparo dos extratos e análise estatística); Laboratório de Parasitologia da Patologia Experimental (avaliação da atividade biológica); Laboratório de produção de Imunorreagente e Técnicas moleculares (LIM/DCTA) (identificação de compostos por UPLC-MS/MS TQD) todos da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram feitas análises ainda no: realizadas no Laboratório Fenn de Espectrometria de massas na UFPR- Campus Jandaia do Sul. (identificação de compostos por HRGC-MS/MS).

A autorização para o transporte e utilização do material vegetal coletado foi feita junto ao ICMBio/IBAMA no SISBio sob o número de cadastro nº 57314 e o cadastro geral da propriedade no IBAMA/CGEN 5571551 (10009004-2/AGERDÂNIO ANDRADE DE SOUZA).

4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS BRUTOS

4.2.1 Preparação dos extratos brutos folhosos etanólico e diclorometânico

As folhas secas em estufa de ar circulante a 40°C por 5 dias foram pulverizadas em moinho de facas portáteis (Oster 4126, São Paulo, Brasil) e submetidas à extração com etanol 96° e diclorometano, ambos grau p.a. (Vetec Química, Xerém, Rio de Janeiro, Brasil), produzindo os extratos brutos denominados de “Etanol Folha” (*EF*) e “Diclorometano Folha” (*DF*).

Para cada extrato, utilizou-se uma proporção de 15,00 g de folha para 60 mL de solvente. A mistura foi submetida a banho ultrassom (Elmasonic P, Elma, Alemanha) com um ajuste de potência para 90 W, frequência de 37 Hz, temperatura a 25°C por 15 min, a fim de se maximizar a extração dos compostos. Em seguida as soluções foram filtradas em papel filtro qualitativas, seguindo os procedimentos adaptados de Rocha et al.(1994), Melecchi (2005) e Moritz (2010). Após a filtração, 60 mL do solvente foram adicionados novamente e, repetiu-se o processo de extração por ultrassom até a exaustão.

Os extratos *EF* e *DF* foram secos em evaporador rotatório (Fisatom 801, São Paulo, Brasil) com temperatura inferior a 40°C, resultando em massas de extratos residuais de 2,168 g para *EF* e 5,5100 g para *DF* das folhas de *T. rhoifolia* Willd.

4.2.2 Desenvolvimento de método cromatográfico utilizando abordagem *Quality by Design*

O desenvolvimento do método cromatográfico para as determinações de UPLC-MS/MS foi realizado no Laboratório de Aplicações Luis Barsotti da Waters do Brasil (Alphaville Industrial, Barueri, São Paulo) utilizando sistema ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Milford, MA, EUA). O sistema consistiu de: gerenciador de solventes quaternário; injetor automático; válvula seletora (flow-through needle selector valve); controlador de temperatura do forno de colunas; 4 colunas de UPLC de seletividades diferentes (BEH C18, BEH C8, CSH Fluorophenyl e HSS C18); detector de arranjo de fotodiodos (Acquity PDA), integrado ao *software*

Fusion AE Method Development™ (S-Matrix Corporation, Eureka, CA, EUA). O desenvolvimento do método cromatográfico se deu através de planejamentos experimentais baseados na abordagem *Quality by Design* (QbD) com *Design of Experiments* (DoE) utilizando avaliação quimiométrica. O controle dos experimentos, a aquisição e o processamento de dados foram realizados pelo *software* Empower 3 (Waters, Milford, MA, USA).

O desenvolvimento do método para separar os compostos do extrato das folhas de *T. rhoifolia* Willd foi realizado a partir de um planejamento experimental contendo duas etapas: *screening* e otimização. Para ambas as etapas foram utilizados como critério de avaliação: a obtenção do maior número de picos no cromatograma, considerando: a quantidade de picos com resolução ≥ 1 ; a quantidade de picos com resolução $\geq 1,5$; a quantidade de picos com resolução ≥ 2 ; e a quantidade de picos com assimetria ≤ 2 . Além destes parâmetros, também foi utilizado o critério visual do analista, quanto a melhor separação cromatográfica.

Na etapa de *screening* foram avaliados: a seletividade dos 4 tipos de fases estacionárias, o uso de tampão em diversos pH e diferentes solventes orgânicos (Tab. 3). Utilizou-se o comprimento de onda fixo de 286 nm para aquisição dos dados e realizou-se a varredura na faixa de 200 a 500 nm. Foram realizadas 45 corridas de 20 minutos cada. A amostra analisada foi o extrato bruto *DF* dissolvido em acetonitrila na concentração de $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os tampões foram preparados utilizando 1% (v/v) de ácido fórmico (pH 2,5); 0,1% (v/v) de acetato de amônio (pH 6,0); e 0,1% (v/v) de hidróxido de amônio (pH 10,8), todos grau p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os solventes de grau HPLC - metanol e acetonitrila foram obtido da J.T. Baker (Xalostoc, México).

Tabela 3. Parâmetros cromatográficos empregados na etapa de *screening* do desenvolvimento do método de separação dos compostos do extrato *DF* por UPLC-PDA

Parâmetros de triagem cromatográfica	
Vazão (mL min ⁻¹)	0,50
Temperatura do forno (°C)	30,0
Volume de Injeção (µL)	1,5
Fase orgânica inicial (%)	5,0
Fase orgânica final (%)	95,0
pH na fase aquosa	2,5; 6,0 e 10,8
Solvente orgânico	Acetonitrila e Metanol
Colunas UPLC™*	BEH C18, BEH C8, CSH Fluorophenyl e HSS C18

BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm), BEH C8 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm), CSH Fluorophenyl (2,1 x 50 mm, 1,7 µm), HSS C18 (2,1 x 50 mm, 1,8 µm) (Waters, Milford, MA, EUA).

Após as 45 corridas os resultados foram tratados pelo *software* Fusion AE Method Development™ para que fossem definidos os parâmetros adequados de análise, de acordo com os critérios pré-estabelecidos.

Na etapa de otimização, além das variáveis definidas na etapa de *screening*, com pequenas variações a partir das melhores condições analisadas, foram adicionadas variáveis que apresentavam menor influência na seletividade, tais como vazão, temperatura do forno, e composição final da fase orgânica. Foram realizadas 30 corridas nesta etapa.

Após a definição do melhor método cromatográfico foi avaliada a robustez a partir dos parâmetros vazão ($\pm 0,01$ mL min⁻¹); fase orgânica final ($\pm 2\%$); temperatura do forno ($\pm 2^\circ\text{C}$) e pH da fase aquosa ($\pm 0,1$).

4.2.3 Análise por HRGC-MS/MS realizadas no Laboratório Fenn de Espectrometria de massas na UFPR- Campus Jandaia do Sul

O extrato bruto *DF* foi analisado em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2010, Quioto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu QP 2010 Ultra) e equipado com uma coluna capilar (Restek 2560, 100 m x 0,25 mm, 0,2 µm, Bellefonte, PA, EUA). Utilizou-se hélio como gás de arraste com pressão de 75 kPa, velocidade linear de arraste de 34,6 cm s⁻¹, vazão na coluna de

0,83 mL min⁻¹ sendo a vazão total dos gases de 58,1 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 180°C, a injeção de 1,0 microlitro ocorreu no modo *splitless* amostrada em 2 min, com purga do septo a 3,0 mL min⁻¹. A rampa de temperatura foi de 150°C(2 min) atingindo 220°C(25 min). O espectrômetro de massas operou em modo *scan* (35 a 500 *m/z*) com aquisição de 23 a 62 min á uma velocidade de 1666 pts s⁻¹. A temperatura da fonte foi de 200°C e da interface de 220°C, com voltagem no detector de 750 V. A identificação dos compostos foi realizada usando-se a similaridade dos espectros de massas experimentais com os da biblioteca NISTMS (valores de similaridade superiores a 80% dos espectros).

4.2.4 Análise por LC-MS/MS realizadas no Laboratório de produção de Imunorreagente e Técnicas moleculares (LIM/DCTA) na UEL - Londrina

A corrida cromatográfica foi realizada em sistema de ultra-alta performance (UPLC[®] I-Class, Acquity, Waters) com bomba binária, sistema de gerenciamento de solventes e desgaseificador; injetor automático, utilizando uma coluna Acquity UPLC[®] BEH C8 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm; Waters), com eluição por gradiente (Tab. 5) utilizando água ultrapura e acetonitrila grau massas (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA), acidificados com ácido fórmico (0,1%, v/v) para análise no modo positivo e basificados com 10 mmol L⁻¹ de acetato de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase móvel (Tab. 4). Os dados foram adquiridos pelo *software* MassLynx v.4.1.

O volume injetado foi de 1,00 µL para as amostras no modo “Partial Loop With Needle Overfill”, sendo o extrato *DF* solubilizado em metanol e diluído em água utrapura na concentração de 17,0 mg L⁻¹, filtrado em membrana PTFE (0, 22 µm, Filtrilo, Colombo, Brasil). A temperatura da coluna foi mantida em 30°C.

Para detecção dos compostos empregou-se um detector Acquity TQD do tipo tandem quadruplo, no modo de ionização positivo e negativo, com temperatura do gás de solvatação de 500°C a uma vazão de 900 L h⁻¹ de N₂; gás do cone mantido a mesma temperatura a uma vazão de 20 L h⁻¹ de N₂. A temperatura da fonte foi de 120°C. A voltagem do cone e extrator foram mantidas em 30 e 2 V

respectivamente e a voltagem do capilar foi de 3,5 kV. Foram monitoradas massas de 100 a 800 m/z .

Tabela 4. Gradiente da fase móvel na análise de UHPLC-MS/MS TQD do extrato *DF* de *T. rhoifolia* Willd

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	% A	% B
Inicial		95,0	5,0
0,40		95,0	5,0
15,40	0,50	5,0	95,0
18,40		5,0	95,0
18,41		95,0	5,0
20,00		95,0	5,0

A: Água acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (modo positivo)/ Acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ (modo negativo); **B:** Acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v).

4.3 PROTOCOLOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.3.1 Parasita

Foram utilizadas as formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen®, Grand Island, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal-SBF (GIBCO Invitrogen®, Grand Island, EUA), 1,0 mol L⁻¹ de tampão biológico HEPES (AMRESCO®, Solon, EUA), 1% urina humana, 1% L-glutamina (Synth®, Diadema, Brasil), penicilina com estreptomicina (10 U/mL, 10 µg mL⁻¹, GIBCO Invitrogen®, Grand Island, EUA) e 10% bicabornato de sódio (Synth®, Diadema, Brasil). O cultivo celular foi realizado em estufa do tipo D.B.O. (Galaxy 170 S New Brunswick, Pleasant Prairie, WI, EUA) a 25°C, em frasco de cultura 25 cm².

4.3.2 Animais

Camundongos BALB/c do sexo masculino, entre 6 a 12 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ, Curitiba, PR, Brasil), foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da

UEL. Os animais foram alojados em condições padrões de luminosidade e temperatura, sendo realizados ciclos de claro/escuro (12/12 h), temperatura mantida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e havendo livre acesso à água estéril e ração comercial *ad libitum* autoclavada.

4.3.3 Obtenção de Macrófagos de Medula Óssea Murina

Células obtidas da medula óssea de camundongos BALB/C foram cultivadas a 37°C e 5% de CO_2 em estufa D.B.O. (Galaxy 170 S New Brunswick, Pleasant Prairie, WI, EUA) por 7 dias em frascos de cultura na presença de meio DMEM acrescido de 10% SBF e 30% v/v do sobrenadante de cultura celular da linhagem L929 (fator de diferenciação de macrófagos). Após a diferenciação, as células foram lavadas em PBS, tripsinizadas, testadas quanto a sua viabilidade pelo teste de exclusão do corante vital azul de tripan 0,02% e distribuídas em placas de cultura (24 poços) para os experimentos de infecção *in vitro* com *L. amazonensis*.

4.3.4 Atividade Antiproliferativa de Extratos Brutos *EF* e *DF*

A atividade antiproliferativa dos extratos *EF* e *DF* foi avaliada pelo cultivo de $2,5 \times 10^6$ células mL^{-1} de formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (LLa), mantidas em meio 199 suplementado com 10% de FBS a 24°C , em cavidades de microplaca de 96 poços na presença de distintas concentrações de cada extrato (5,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) solubilizado em meio de cultura contendo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e sem a presença de extrato (controle). Foram realizados três experimentos em triplicata.

O crescimento dos parasitas foi avaliado por meio de sucessivas contagens diretas das células viáveis em uma câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 h de incubação da microplaca. A atividade antileishmania foi expressa como a percentagem de inibição do crescimento em comparação com o controle.

4.3.5 Ensaio de Citotoxicidade Celular por MTT

A viabilidade de macrófagos de medula óssea murina após o tratamento com os extratos *EF* e *DF* foram avaliadas com base na oxidação mitocondrial, através do teste colorimétrico sal de tetrazólio MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio; azul de tiazolilo) (Amresco, Solon, OH, EUA) (MOSMANN, 1983). Macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços (3×10^5 células/poço) durante 2 h em meio RPMI 1640 suplementado a 37°C e 5% de CO₂ em estufa D.B.O. (Galaxy 170 S New Brunswick, Pleasant Prairie, WI, EUA). Após esse período as células receberam tratamento com os extratos *EF* e *DF* em concentrações de 25,0; 50,0 e 100,0 µg mL⁻¹. O tratamento foi realizado durante 48 h e mantido em incubadora D.B.O. a 37°C com 5% de CO₂. Células que não receberam tratamento foram utilizadas como controle. Após os tratamentos, os sobrenadantes foram removidos, e as células receberam 10 µL de MTT (5 mg mL⁻¹) durante 3 h nas mesmas condições de cultura na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os cristais de formazan foram solubilizados em 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% de dimetil formamida (DMF), e após 30 minutos a absorbância (DO) foi mensurada a 550 nm em um leitor de placas (Leitor de TP, Thermo Placa Thermo Plate - TP-Reader, EUA). Os resultados foram expressos como percentagem relativa da redução de MTT para o grupo controle calculado pela Equação 1.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{DO da célula tratada}}{\text{Do da célula não tratada}} \times 100 \quad \text{Eq.(1)}$$

4.3.6 Ensaio de Capacidade Leishmanicida

Macrófagos obtidos da medula óssea de camundongos BALB/C foram ajustadas para uma contagem de 3×10^5 células e incubadas por 1 h para aderência em placa de 24 poços, contendo lamínulas redondas de 13 mm (Ciencor Scientific, Brasil). A infecção foi realizada utilizando 3×10^6 das formas promastigotas de LLa. O período de fagocitose foi de 2 h. Em seguida as placas foram lavadas com PBS para a retirada dos parasitas não fagocitados e em seguida, foi realizada a adição do tratamento utilizando extratos brutos *EF* e *DF* em concentração igual a 25,0 µg mL⁻¹. Os tratamentos foram mantidos por 24, 48 e 72 h. Após o período estipulado o sobrenadante foi recolhido e armazenado em freezer -80°C. As

lamínulas coradas com Giemsa montadas em lâminas de vidro, para análise em microscópio óptico (e100, Nikon-led, Japão), onde se examinou 20 campos/tratamento para a análise do índice de infecção e da média de amastigotas por macrófagos.

4.3.7 Cinética de Recuperação de Promastigotas de Macrófagos Infectados

O ensaio de recuperação foi realizado conforme descrito por Silva et al. (2013). Macrófagos da medula óssea de camundongos BALB/c foram ajustados para uma contagem de 3×10^5 células e incubadas por 1 h para aderência em placa de 24 poços, onde receberam infecção com formas promastigotas de LLa (3×10^6) por 2 h. Em seguida as placas foram lavadas com PBS para a retirada dos parasitas não fagocitados e foi realizada a adição do tratamento utilizando extratos brutos *EF* e *DF* em concentração igual a $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 48 h. Após esse período os poços foram lavados com PBS e foi adicionado meio 199. A placa foi mantida em estufa a 24°C para a saída das promastigotas. Foi realizado o acompanhamento da saída das promastigotas durante uma semana com contagem de formas promastigotas no sexto e sétimo dia por meio de câmara de *Neubauer*.

4.3.8 Dosagem de Citocinas

Os sobrenadantes coletados dos ensaios leishmanicida foram utilizados para dosagem de citocinas através da técnica do ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) usando Kit da eBioscience (USA). A concentração de citocinas foi determinada baseada na curva padrão de referência feita por diluições seriadas, e a absorbância óptica mensurada a 492 nm. O perfil de citocinas foi analisado antes e após a infecção com o parasita. Foram avaliadas as produções das citocinas IL-10, IL-12, INF-gama, TNF-alfa e IL-1beta.

4.3.9 Dosagem de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico foi estimada pela determinação dos níveis de nitrito nos sobrenadantes coletados dos ensaios leishmanicida, de acordo com Panis et al. (2012) com algumas modificações. Resumidamente, as alíquotas do sobrenadante foram submetidas à redução de nitritos á nitratos pela incubação com

a enzima nitrato redutase, e a concentração de nitritos mensurada pela reação colorimétrica de Griess. A absorbância foi determinada a 550 nm em um leitor de microplaca.

4.3.10 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados dos ensaios realizados com a *Trattinnickia rhoifolia* Willd foi feita pelo programa Graph Prism InStat 3[®] e Statistica 8.0 utilizando os testes de ANOVA seguido de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.11 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos descritos neste estudo foram submetidos às normas e aprovação do Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (protocolo nº 1943.2015.67, anexo).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

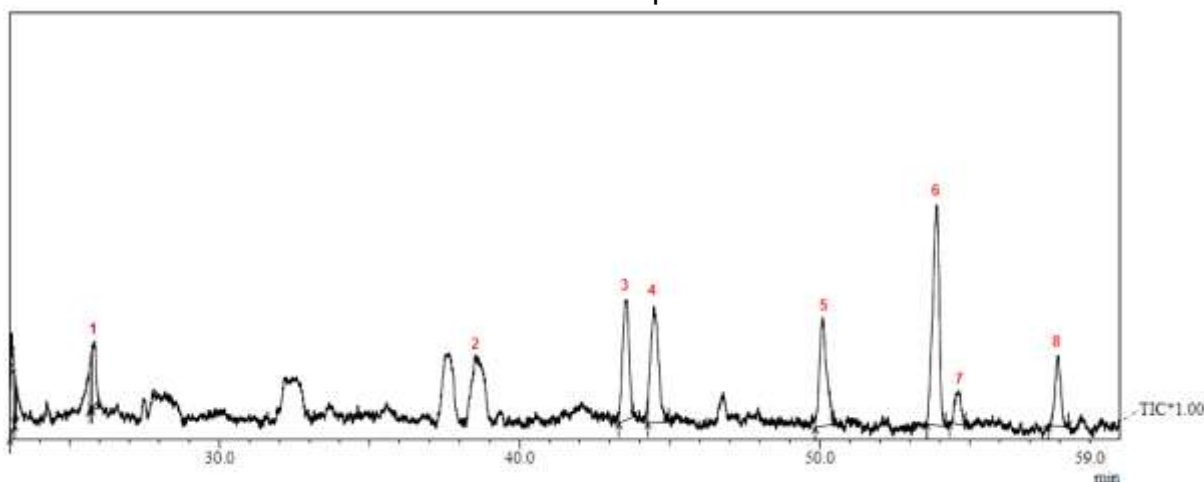
5.1 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

Pelo fato do extrato vegetal bruto, consistir em uma matriz complexa contendo centenas de compostos com parâmetros físico-químicos e espectroscópicos diversos, optou-se por uma detecção eficiente e rápida para a caracterização dos produtos naturais biologicamente ativos. Ressalta-se que, na avaliação biológica os 2 extratos brutos *EF* e *DF* (discussão á frente no texto) apresentaram respostas leishmanicida e imunomoduladora, tendo o extrato bruto *DF* apresentado maior atividade biológica. Por isso, o extrato bruto *DF* da *Trattinickia rhoifolia* Willd foi submetido às técnicas analíticas cromatográficas empregando a cromatografia a gás de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas (HRGC-MS/MS) e a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao espectrofotômetro de massas do tipo tandem quadrupolo (UPLC-MS/MS), para a identificação de seus compostos.

5.1.1 Perfil Químico de Extratos em Diclorometano (*DF*) de Folhas da Espécie *Trattinnickia Rhoifolia* Willd por HRGC-MS/MS

Os compostos encontrados nos cromatogramas obtidos por HRGC-MS/MS do extrato bruto *DF* da *Trattinickia rhoifolia* Willd, identificados pelo cromatograma do íon total (TIC) (Fig. 12), levando-se em conta similaridades superiores á 80% dos espectros experimentais em relação aos da Biblioteca NISTMS, estão apresentados na Tabela 5.

Figura 12. Cromatograma dos íons totais (TIC) para o extrato bruto *DF* da *Trattinickia rhoifolia* Willd obtido por HRGC-MS/MS



Shimadzu GC 2010: hélio á 75 kPa, vazão na coluna (0,83 mL min⁻¹) com velocidade linear (34,6 cm s⁻¹); T°C injetor (180°C), vol. inj.(1,0 µL), injeção modo *splitless* (2 min), purga do septo (3,0 mL min⁻¹); coluna capilar (Restek 2560, 100 mx0,25 mm, 0,2 µm) a T°C (150°C – 2 min e 220°C – 25 min). Espectrômetro QP 2010 Ultra no modo *scan* (35 a 500 *m/z*) 23 min após a injeção com término em 62 min, T°C da fonte (200°C) e da interface (220°C), voltagem no detector (750 V), contendo biblioteca NIST.

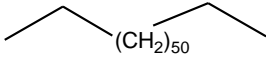
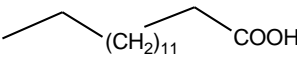
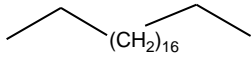
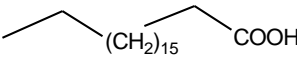
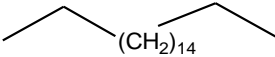
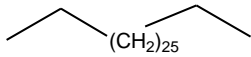
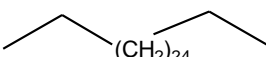
Fonte: do Autor.

As análises foram realizadas com o extrato bruto *DF*, considerando-se a polaridade do solvente diclorometano para extração de bioativos, conforme indicado por Rüdiger (2012).

Assim, a análise por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada á espectrometria de massas (HRGC-MS/MS) foi realizada para obtenção do perfil químico, com a identificação de seus constituintes. A análise possibilitou a identificação de 8 picos (Tab. 5) presentes no cromatograma (Fig. 12), comparando-se os espectros de massas obtidos com os da Biblioteca NISTMS, levando-se em conta os compostos descritos da literatura para a família ou espécie da planta, que apresentavam atividade biológica.

No tocante, aos outros picos do cromatograma aqui não apresentados, esses não foram identificados, por apresentarem baixa similaridade (< 80%).

Tabela 5. Identificação dos compostos encontrados no extrato bruto das folhas de *Trattinickia rhoifolia* Willd em diclorometano (DF) por HRGC-MS/MS (Fig. 14)

Picos	Fórmula Estrutural/ Nome do composto	Fórmula Molecular	tR médio (min)	Massa molar (m/z)
1	 Tetra-Pentacontano	C ₅₄ H ₁₁₀	25,820	758
2	 Ácido pentadecanóico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	38,555	242
3	 Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	43,554	282
4	 Ácido nonadecanóico	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	44,482	312
5	 Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	50,099	580
6	 Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	53,916	408
7	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_3$ Éster metil-11,14,17-eicosatrienoato	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	54,630	320
8	 Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	57,957	394

tR: tempo de retenção do composto

Fonte: do Autor (Identificação com base em similaridade da biblioteca NISTMS).

Nota-se a presença de diversos hidrocarbonetos arrastados no processo de extração. Dentre os compostos indicados como possíveis, no tempo de retenção de 43,554 minutos e relação massa/carga (m/z) de 282, atribuiu-se este pico o de número 3 ao eicosano. Os demais compostos, que saem no tempo de corrida de até 62 minutos, como os hidrocarbonetos: octadecano ($C_{18}H_{38}$ – pico 5), octacosano ($C_{28}H_{58}$ – pico 8), nonacosano ($C_{29}H_{60}$ – pico 6) e tetra-pentacontano ($C_{54}H_{110}$ – pico 1), os ácidos pentadecanóico ($C_{15}H_{30}O_2$ – pico 2), ácido nonadecanóico ($C_{19}H_{38}O_2$ – pico 5) e o éster metil-11,14,17-eicosatrienoato ($C_{21}H_{36}O_2$ – pico 7) também foram identificados na *Trattinickia rhoifolia* Willd, os quais são caracteristicamente encontrados em ceras vegetais.

Segundo Melecchi (2005), em um estudo comparativo de métodos de extração para as folhas do *Hibiscus tiliaceus* L. ele identificou nas frações de hexano e diclorometano por GC-MS, os mesmos hidrocarbonetos identificados no *DF* do nosso estudo. Leite et al.(2002) também identificaram os mesmos compostos no extrato hexânico das folhas da *Capsicum annum*. Salazar (2010) identificou o nonocasano na *Trattinickia rhoifolia* Willd por GC-MS, além de amentoflavona, β -sitosterol, $5\alpha,6\alpha$ -epoxy- β -sitosterol e $5\beta,6\beta$ -epoxy- β -sitosterol por HPLC. A semelhança entre esses extratos, é que eles foram obtidos de folhas com solventes capazes de promover a extração de ceras vegetais. Essas ceras vegetais conferem às folhas impermeabilidade, evitando a perda excessiva de água pela transpiração, visto que são insolúveis em água. Além disso, as ceras vegetais atuam como defesa, impedindo a entrada de fungos e bactérias patogênicas nos tecidos vegetais (MEDINA, 2002; GIRALDO et al., 2000; RÜDIGER, 2012).

5.1.2 Perfil Químico de Extratos em Diclorometano (*DF*) de Folhas da Espécie *Trattinickia Rhoifolia* Willd por UPLC-MS/MS

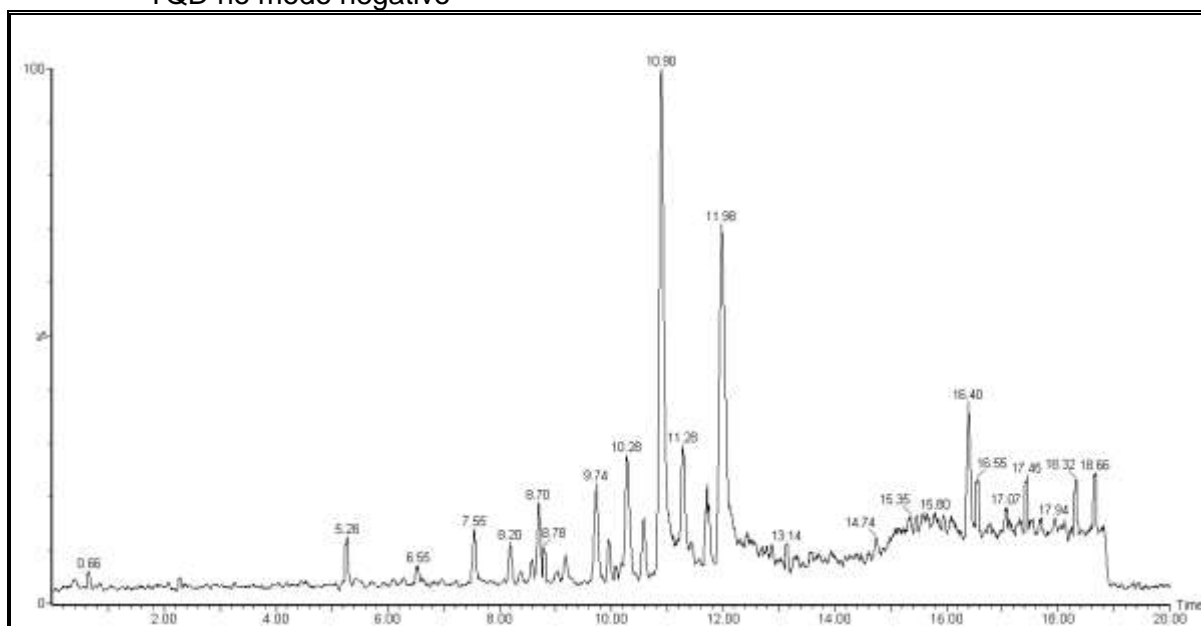
Para suplantar as dificuldades de separação dos extratos contendo muitos compostos não resolvido com eluições isocráticas, considerando sua baixa resolução e corridas extremamente demoradas (MULLER, 2006, LANÇAS, 2009), a ferramenta *Quality by Design (QbD)*, conjuntamente com o UPLC, foram utilizados.

As melhores condições de separação cromatográficas, encontradas pela aplicação de um planejamento experimental “on-line” usando o *QbD*, controlado

pelo *software* Fusion, integradas á um sistema cromatográfico de alta eficiência (UPLC-PDA), foram transferidas para as análises no UPLC-MS/MS da UEL. As determinações para identificação dos compostos do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd ocorreram com eluição por gradiente, utilizando meio básico, tendo sido desenvolvidas as melhores condições para detecção dos compostos do espectrômetro de massas TQD, testadas nos modos positivo e negativo.

As Figuras 13 e 21 apresentam os cromatogramas obtidos no UPLC-MS/MS TQD para o extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd, empregando-se os modos negativo e positivo, respectivamente. Já os compostos identificados que apresentam atividade biológica descritos na literatura e presentes no extrato *DF* analisados estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, com a indicação das estruturas nas Figuras 14 e 22, e espectros de massas de 17 a 22 para o modo negativo e, de 25 a 27 para o modo positivo.

Figura 13. Cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo



UPLC® Acquity I-Class Waters: fase móvel de A: acetato de amônio (10 mmol L⁻¹), B: acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) conforme eluição de gradiente (Tab. 5); vol. injeção (1,00 µL) no modo “Partial Loop With Needle Overfill” extrato *DF* (17,0 mg L⁻¹); coluna Acquity UPLC® BEH C8 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm) a 30°C; detector Acquity TQD no modo de ionização negativo, T°C gás de solvatação (500°C) com vazão (900 L h⁻¹ N₂) gás do cone (500°C) à (20 L h⁻¹ N₂), T°C da (120°C), voltagens: cone (30 V), extrator(2 V) e capilar (3,5 kV). Massas monitoradas (100 a 800 *m/z*) adquiridos pelo *software* MassLynx v.4.1.

Pelo cromatograma é possível verificar que o método desenvolvido mostrou-se adequado para avaliação dos diferentes compostos presentes na

espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd descritos na literatura (ASSIS, 2013, SUSUNAGA *et al.*, 2000, MESSA e PEÑARANDA, 2003, SALAZAR *et al.* 2010, MEDINA, 2012) empregando-se UPLC-MS/MS TQD.

A intensidade de sinais com um maior número de compostos identificados para o modo negativo (Fig.15), comparado ao modo positivo (Fig.23), por isso, inicialmente foi feita a descrição dos compostos identificados por esse modo.

Os resultados do extrato bruto *DF* (Tab. 6) estão em consonância com as caracterizações realizadas na literatura, feitas também com extratos brutos e reportados em estudos de identificação química para a família Burceraceae. Ressalta-se que todas as massas encontradas, estiveram dentro da margem de exatidão de massa (erro) permitida (FERREIRA *et al.*, 2012; LANÇAS, 2013).

Tabela 6. Indicações dos íons encontrados no extrato *DF* da espécie *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo, relacionados aos compostos que apresentam atividades biológicas descritas na literatura.

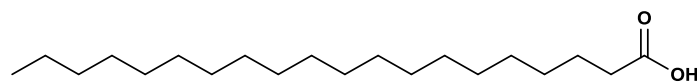
tR(min)	[M-H] ⁺ *	[M-H] ⁻ **	Erro*** ppm<0,30	Nome do Composto	Referência Química	Caracterização nas Burseraceae	Partes da Planta
8,195	311,43	311,42	-0,03	Ácido eicosanóico	AMARAL, 2008; CABRAL, 2010; MURPHY, 2015	MEDINA, 2002; SALAZAR, 2010	Folhas e Sementes
8,808	453,09	453,06	0,13	Ácido Betulônico	GU et al., 2014; LI et al., 2011; SATIRAPHAN et al., 2012;	GIGLIARELLI et al., 2015	Folhas
10,289	253,14	253,04	-0,03	Crisina	FALCÃO et al., 2009; HUANG et al., 2015; MCNAB et al., 2009; TRUDIĆ et al., 2016; VALENZUELA et al., 2015	KRUMHAR, 2000	Folhas e Sementes

Tabela 6. Cont. - Indicações dos íons encontrados no extrato *DF* da espécie *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo, relacionados aos compostos que apresentam atividades biológicas descritas na literatura.

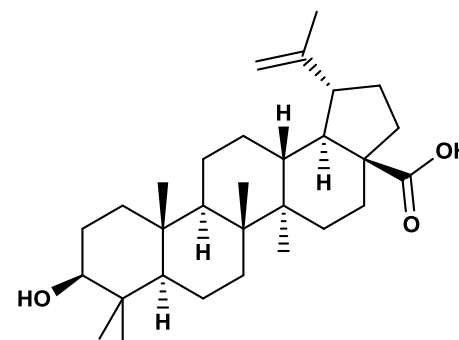
tR(min)	[M-H] ⁻ *	[M-H] ⁻ **	Erro*** ppm<0,30	Nome do Composto	Referência Química	Caracterização nas Burseraceae	Partes da Planta
10,289	253,14	253,18	0,04	Daidzeína	ZOCOLO, 2010; CUNHA, 2013; OLIVEIRA, 2011; COLLINS, 2011	PEIXOTO, 2012 MUKHERJEE, 2012	Folhas
14,740	367,20	367,18	0,03	Ácido feruloilquínico	SILVA, 2012; STALMACH, 2016; CLIFFORD, 2008	DECHAKHAMP HU et al., 2015	Folhas e Sementes
17,063	269,12	269,16	0,02	Genisteína	YE et al., 2012; ZAZHI, 2007; LIAO et al., 2013	ALMEIDA, 2013; FILARD, 2010	Folhas

tR; tempo de retenção. [M-H]⁻ : massa do íon molecular encontrada pela relação massa carga (*m/z*). no modo negativo. *Valor experimental. **Valor da literatura. ***Erro= $\frac{\frac{M}{z}(\text{experimental}) - \frac{M}{z}(\text{composto})}{\frac{M}{z}(\text{composto})} \times 10^6$

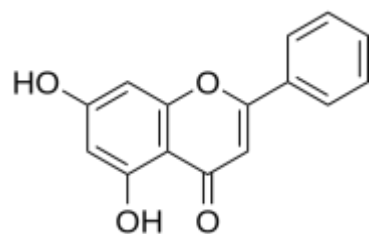
Figura 14. Estruturas para os compostos atribuídos para o extrato *DF* da espécie *T. rhoifolia* Willd presentes nos cromatogramas empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13).



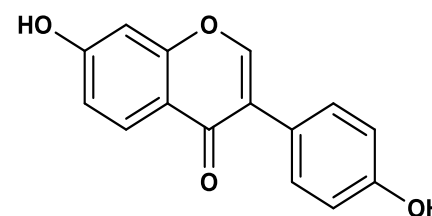
(a) Ácido eicosanóico



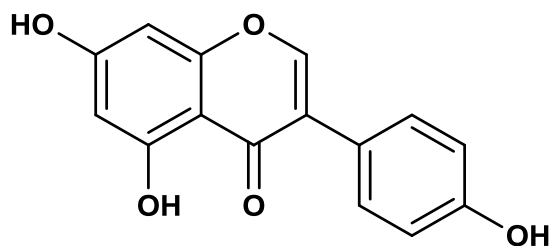
(b) Ácido betulônico



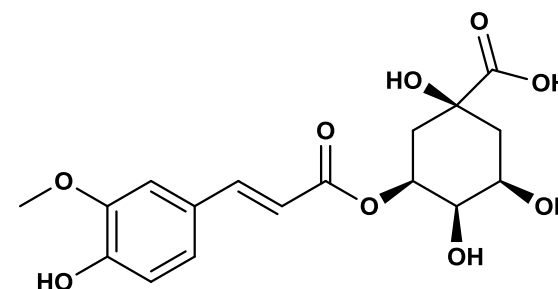
(c) Crisina



(d) Daidzeína



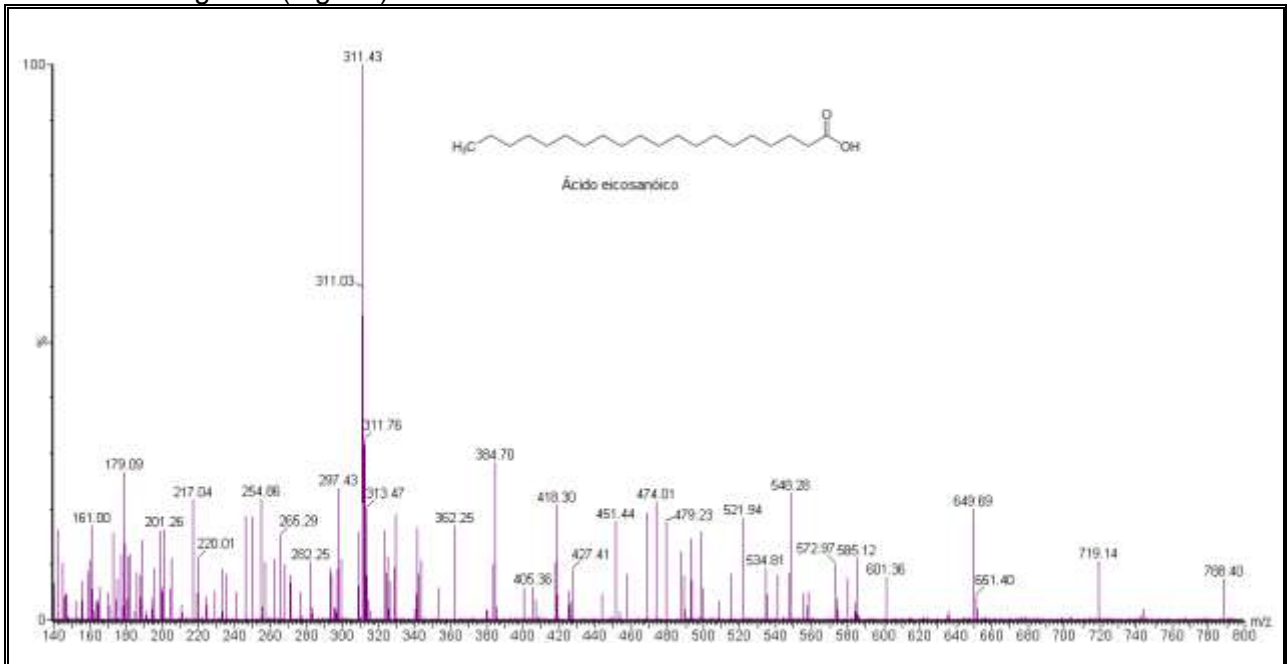
(e) Genisteína



(f) Ácido feruloilquínico

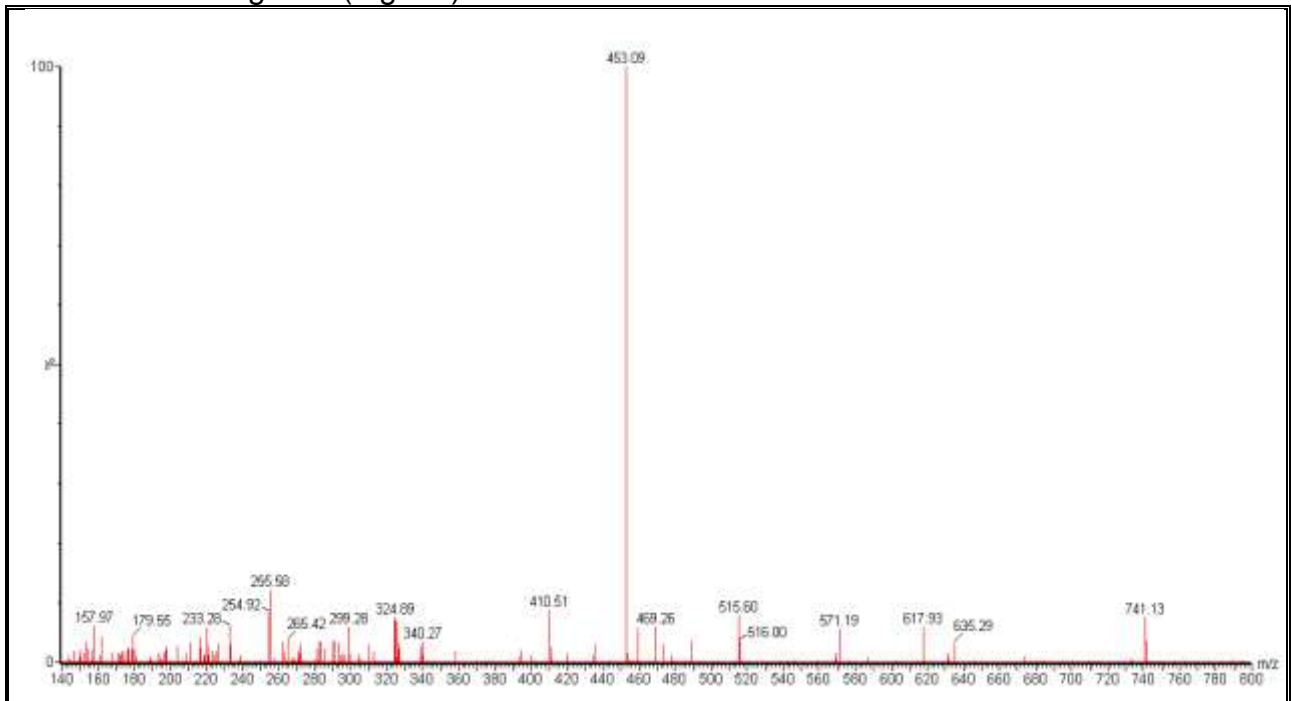
Fonte: do Autor.

Figura 15. Espectro de massas do íon de m/z 311,43, atribuído ao ácido eicosanóico, obtido do cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13)



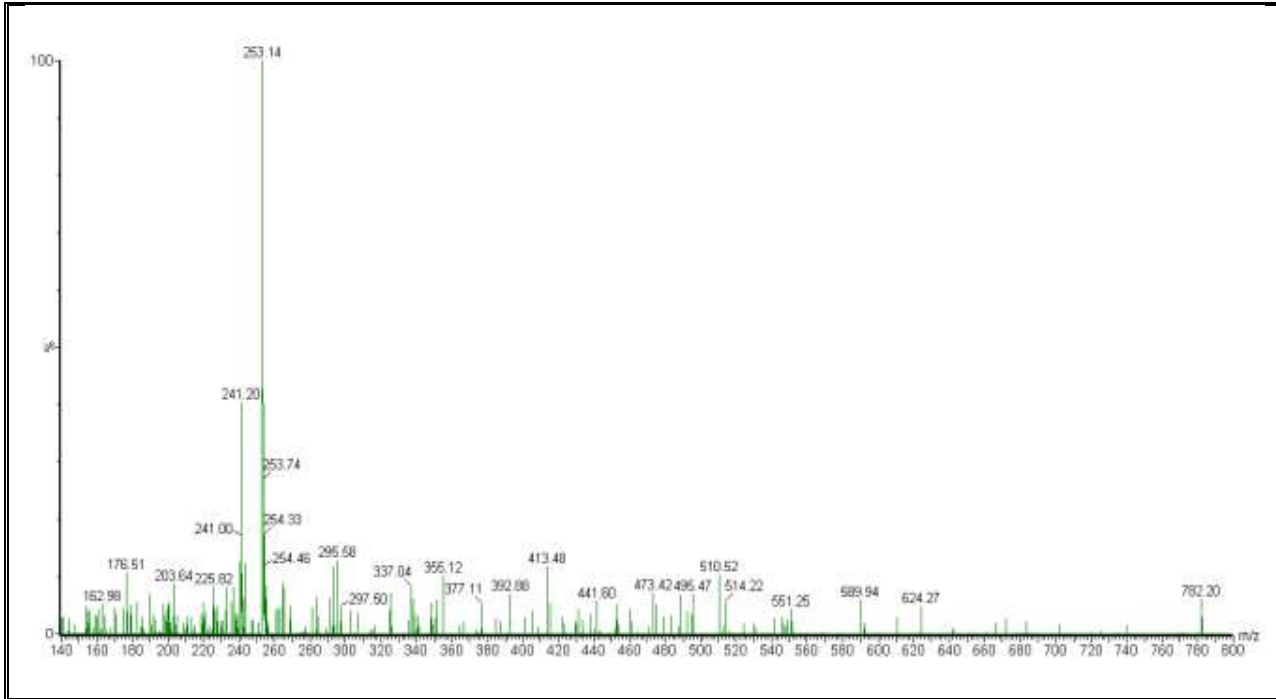
O espectro de massas no modo negativo (Fig.15), que apresentou pico intenso referente ao íon $[M-H]^-$ de m/z de 311,43 (Tab. 6), também foi reportado nos estudos de caracterização e identificação do íon por Amaral (2008), Cabral (2010) e Muroh (2015). Esse conjunto de dados é compatível com a estrutura do ácido eicosanóico ou ácido araquídico (Fig. 16-a), substância natural presente em diversas plantas medicinais (MEDINA, 2012, MUROH, 2015), ainda sendo caracterizada na Família Burseraceae, em específico na espécie *T. rhoifolia* Willd por SALAZAR et al. (2010) e MEDINA (2012). Suas respectivas atividades leishmanicida e imunomoduladora estão apresentadas nos itens 5.2.

Figura 16. Espectro de massas do íon de m/z 453,09, atribuído ao ácido betulônico, obtido do cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13)



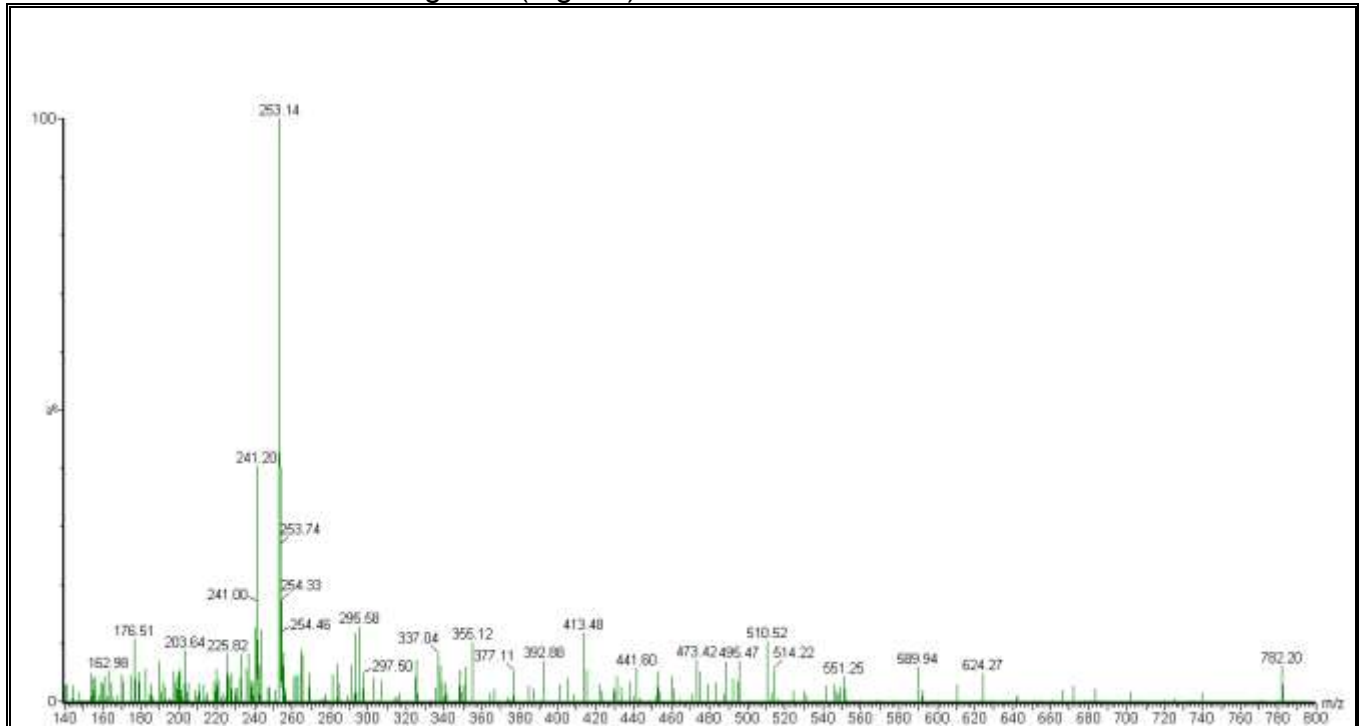
O espectro de massa que apresentou íon $[M-H]^-$ de m/z de 453,09 (Fig. 16 e Tab. 7) condiz com a atribuição da presença do ácido betulônico (Fig. 14-b) de acordo com Gu et al. (2014); Liet al. (2011) e Satiraphan (2015), presentes de modo geral em extratos vegetais (KONO et al., 1987, MISSKO et al., 1993; PAVLOVA, 2003) e na família Burseracea segundo Gigliarelli et al. (2015).

Figura 17. Espectro de massas do íon $[M-H]^-$ de m/z 253,14, atribuído a crisina, obtido do cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13)



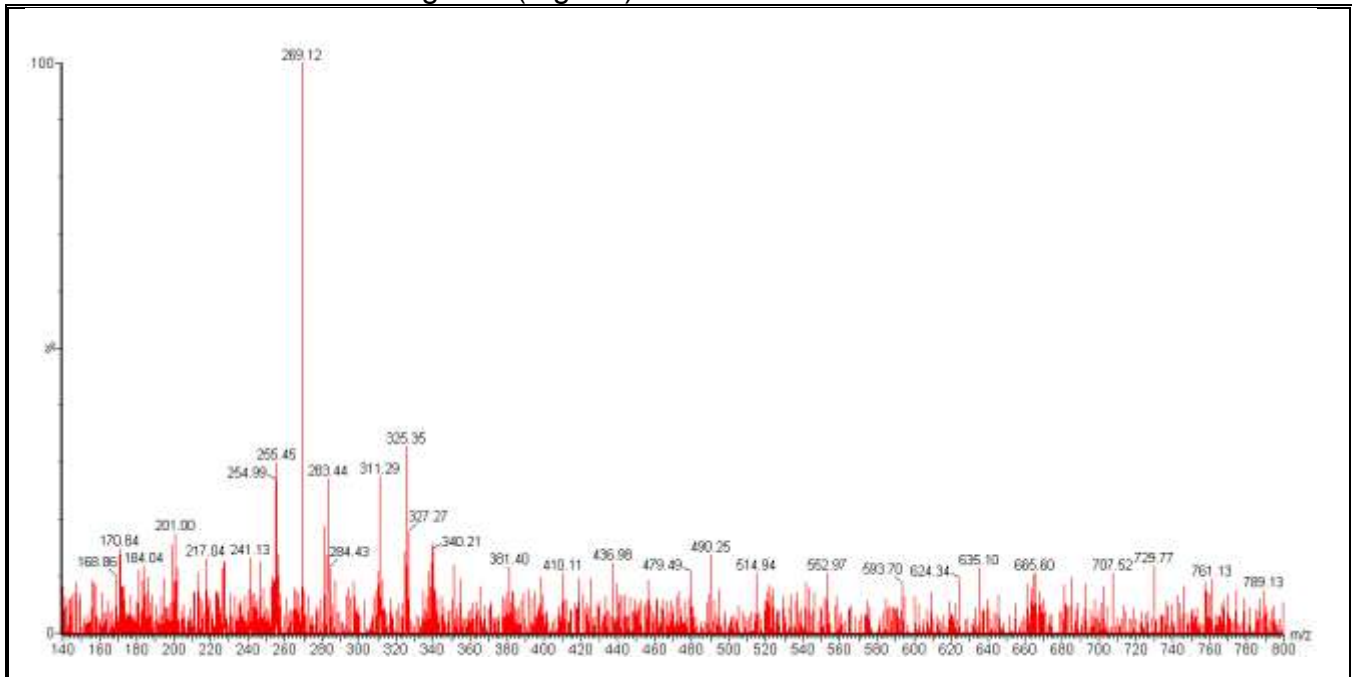
Já o íon $[M-H]^-$ de m/z de 253,14 encontrado nas análises realizadas (Fig. 19 e Tab. 7) é caracterizado na literatura como o composto crisina (Fig. 14-c) (FALCÃO, 2009; HUANG et al., 2015; MCNAB et al., 2015; TRUDĆ et al., 2016, VALENZUELA, 2015), comumente encontrado em forrageiras e na classe dos angiospermas, incluindo as Burseraceae (HUANG, 2015; NINOSKA, 2008, OZBILGE, 2010; VALENZUNA, 2015).

Figura 18. Espectro de massas do íon de m/z 253,14, atribuído a daidzeína, obtido do cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13)



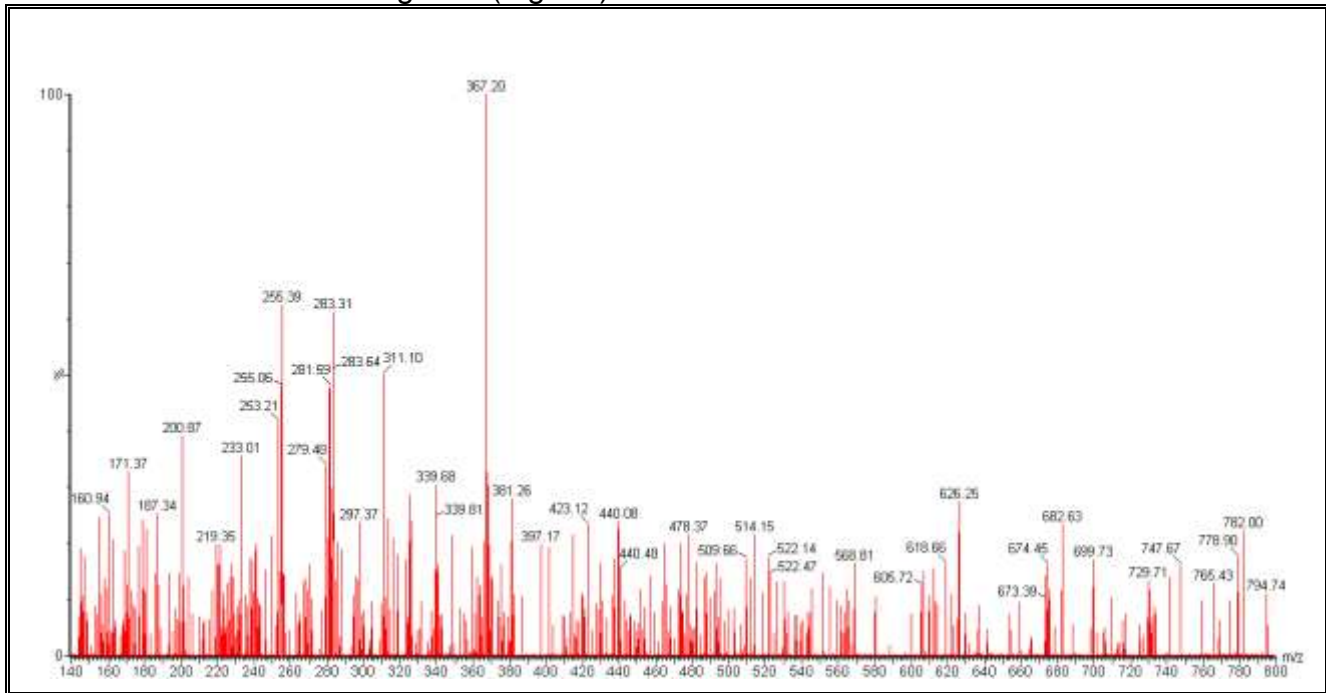
Comumente, a daidzeína (Fig. 14-d) é encontrada em dicotiledôneas bastante estudadas, estando entre um dos constituintes do óleo de soja, possibilitando assim sua identificação na literatura (CUNHA, 2013; OLIVEIRA et al., COLLINS et al., 2011; ZOCCOLO, 2010), remetendo ao íon $[M-H]^-$ de m/z de 253,14, encontrado no extrato analisado (Fig. 18) e à espécie pertencente à família da planta estudada (MUKHERJEE et al., 2015; PEIXOTO, 2012).

Figura 19. Espectro de massas do íon de m/z 269,12, atribuído a genisteína, obtido do cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13)



A genisteína indicada pelo íon $[M-H]^-$ de m/z de 269,12 (Fig. 19, Tab. 6, Fig. 14-f) está congruente com a literatura sendo correlacionada às espécies vegetais (YE et al., 2012; ZAZHI et al., 2007; LIAO et al., 2013) e com as Burseraceae (ALMEIDA, 2013; FILARD, 2010).

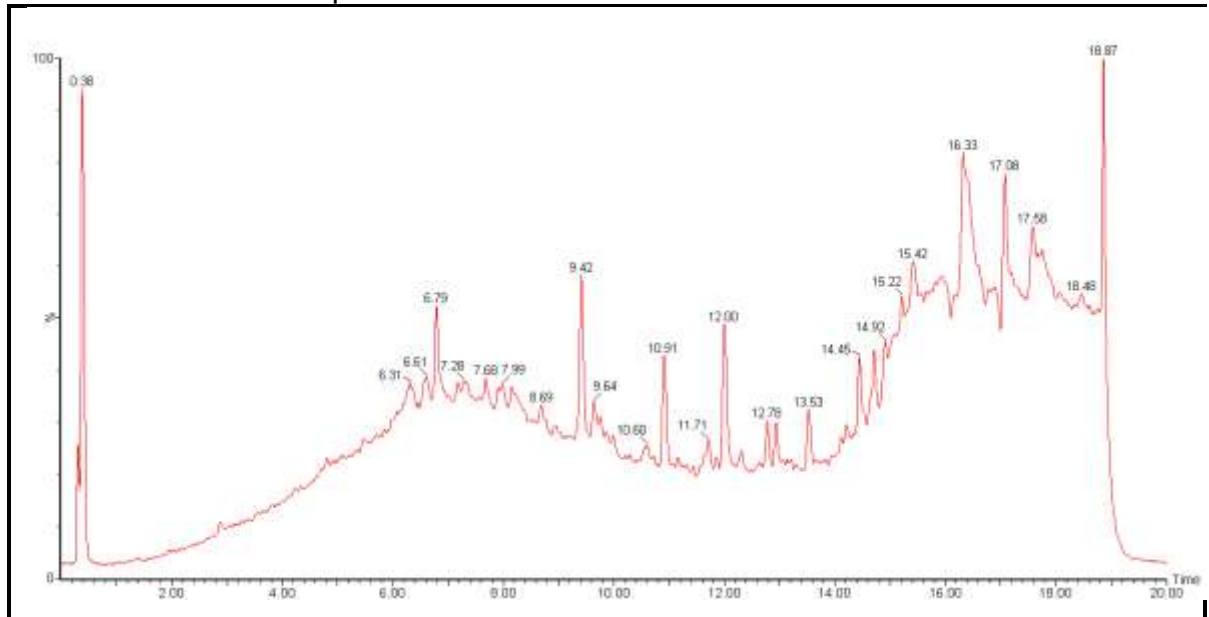
Figura 20. Espectro de massas do íon de m/z 367,20, atribuído ao ácido feruloilquínico, obtido do cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo negativo (Fig. 13)



Com relação às análises do íon $[M-H]^-$ de m/z de 367,20 (Fig. 20 e Tab. 6) foi possível remeter aos dados da literatura, indicando o ácido feruloilquínico (Fig. 16-g), já caracterizado em extratos vegetais com ampla atividade biológica e presentes nas Burseraceae, visto que o espectro está em conformidade com os estudos de caracterização do composto (SILVA, 2012, STALMACH et al., 2016 CLIFFOR, 2008 e DECHAKHAMPHU, et al., 2015).

A Figura 21 apresenta o cromatograma obtido no UPLC-MS/MS TQD para o extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd, empregando-se o modo positivo. Já os compostos identificados que apresentam atividade biológica descritos na literatura e presentes no extrato *DF* analisados estão apresentados na Tabela 7 com a indicação das estruturas nas Figuras 22.

Figura 21. Cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo



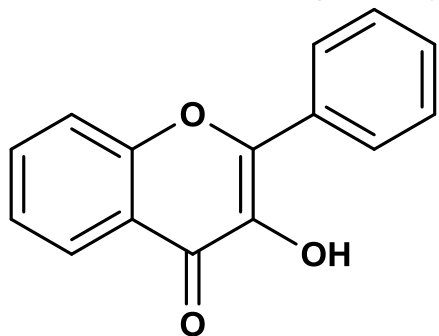
UPLC® Acquity I-Class Waters: fase móvel de A: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) e B: acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) em eluição de gradiente (Tab. 5); vol. injeção (1,00 μL) no modo “Partial Loop With Needle Overfill” extrato *DF* (17,0 mg L^{-1}); coluna Acquity UPLC® BEH C8 (2,1 x 50 mm; 1,7 μm) a 30°C; detector Acquity TQD no modo de ionização negativo, T°C gás de solvatação (500°C) com vazão (900 L h^{-1} N_2) gás do cone (500°C) à (20 L h^{-1} N_2), T°C da (120°C), voltagens: cone (30 V), extrator(2 V) e capilar (3,5 kV). Massas monitoradas (100 a 800 m/z) adquiridos pelo software MassLynx v.4.1.

Tabela 7. Indicações dos íons encontrados no extrato *DF* da espécie *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo, relacionados aos compostos que apresentam atividades biológicas descritas na literatura

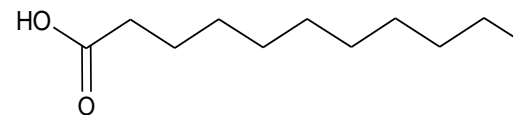
tR	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺⁺	Erro ^{***} ppm<0,30	Nome do Composto	Referência Química	Caracterização nas Burseraceae	Partes da Planta
10,91	239,48	239,00	0,03	Flavonol/ hidroxiflavona	TSIMOGIANNIS et al., 2007; CHEN et al., 2016; KANG et al., 2007	ABBAS et al., 2007	Folhas e Sementes
12,00	341,66	341,54	0,02	Dodeicosanóico	SIQUEIRA et al., 2003 SAMPAIO, 2010	MOTHANA et al., 2011	Folhas e Sementes
14,45	429,78	429,50	0,035	Epi-friedelanol	KUNDU et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2007; SATIRAPHAN et al., 2012; RODRIGUES, 2015	GUIMARÃES et al., 2007	Folhas e Sementes

tR; tempo de retenção. [M+H]⁺ : massa do íon molecular encontrada pela relação massa carga (*m/z*). no modo negativo. *Valor experimental. **Valor da literatura. ***Erro= $\frac{M_z(\text{experimental}) - M_z(\text{composto})}{M_z(\text{composto})} \times 10^6$

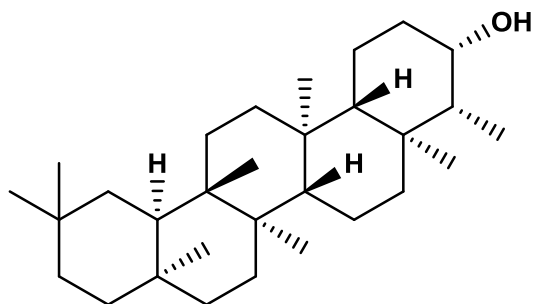
Figura 22. Estruturas para os compostos atribuídos para o extrato *DF* da espécie *T. rhoifolia* Willd presentes nos cromatogramas empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo (Fig. 23)



(a) Flavonol



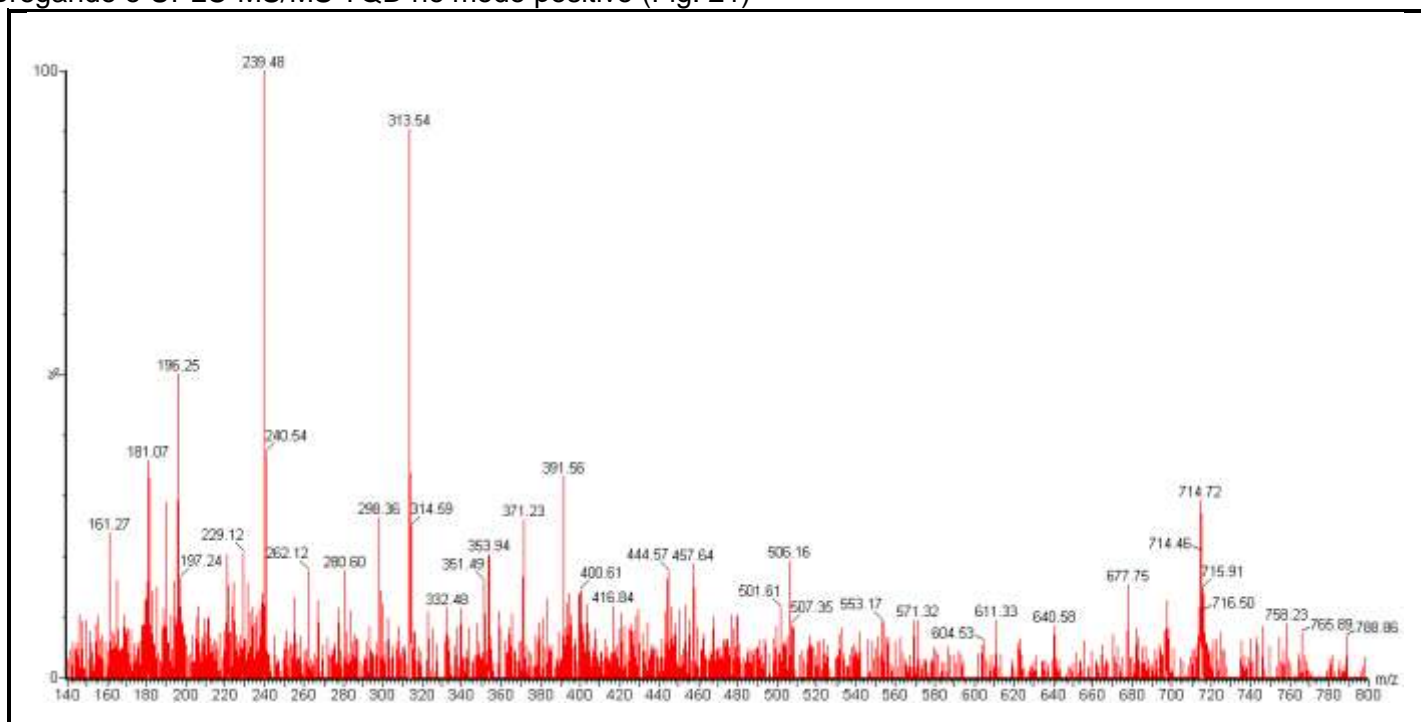
(b) Dodeicosanoico



(c) Epi-friedenalo

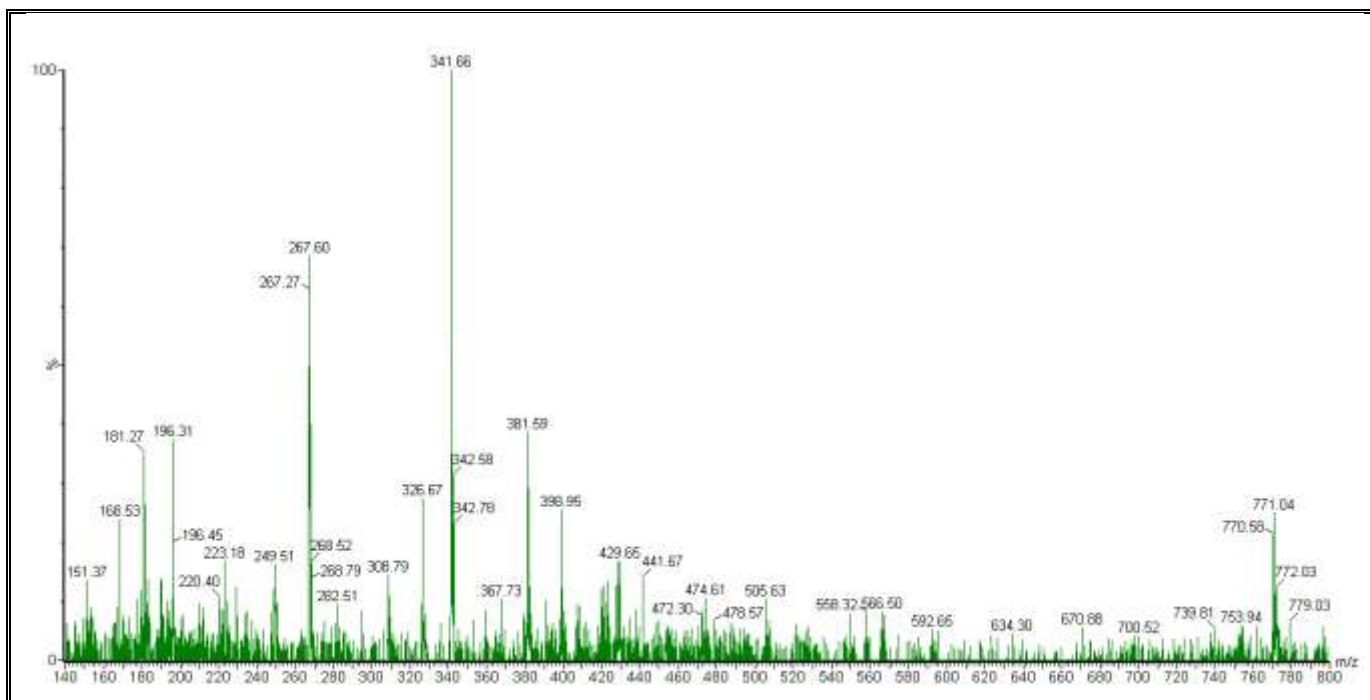
Fonte: do Autor.

Figura 23. Espectro de massas do íon de m/z 239,48, atribuído ao flavonol, obtido do cromatograma do extrato *DF* da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo (Fig. 21)



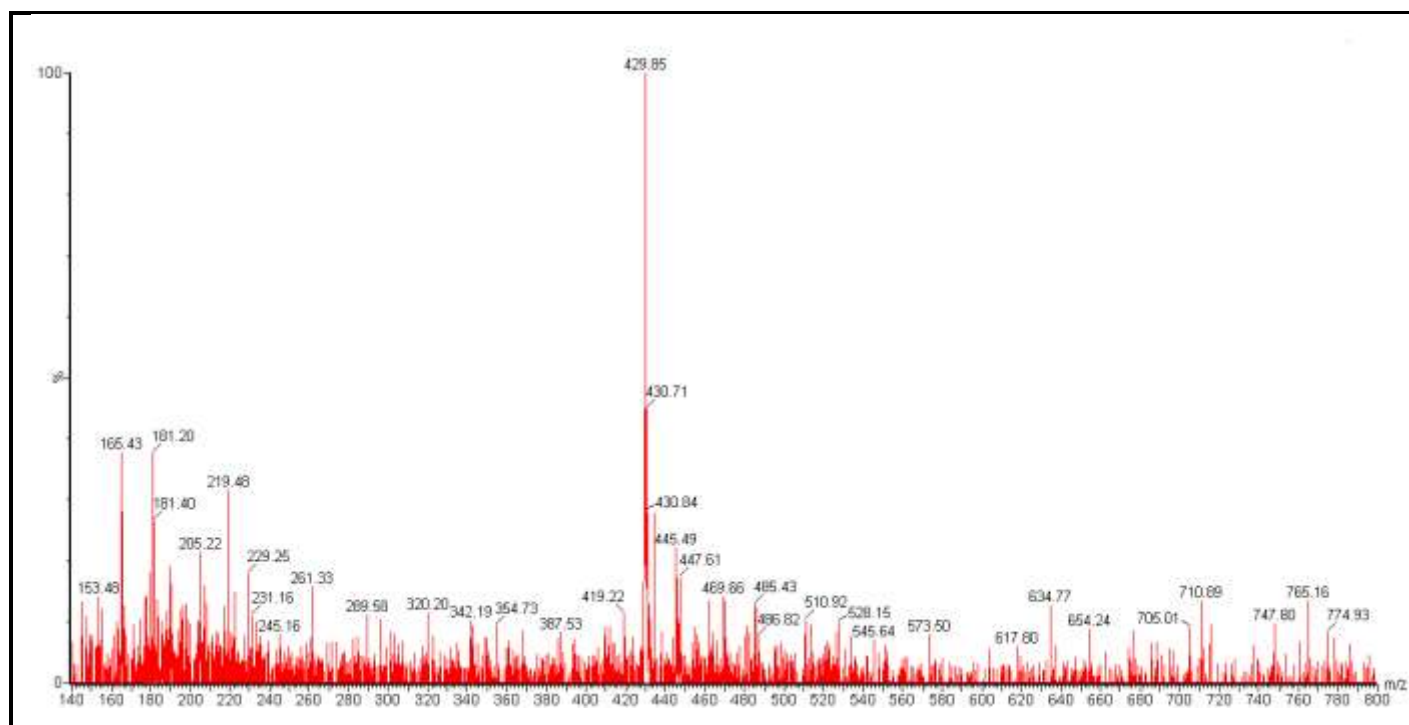
Também foi indicado o íon $[M+H]^+$ de m/z de 239,48 (Fig. 23) como sendo o flavonol ou conhecido como hidroxiflavona (Fig. 22-a) (TSIMOGIANNIS et al., 2007; CHEN et al., 2016; KANG et al., 2007), em comparação com a caracterização química realizada na família Burseracea, já caracterizado anteriormente (ABBAS et al., 2007).

Figura 24 Espectro de massas do íon de m/z 341,66, atribuído ao dodeicosanóico, obtido do cromatograma do extrato DF da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo (Fig. 21)



Para o espectro de massa (Fig. 24) que apresentou íon $[M+H]^+$ de m/z de 341,66 (Tab. 7), remetido à literatura indica tratar-se do dodeicosanóico (Fig. 22-b) (SIQUEIRA, 2003; SAMPAIO et al., 2010), esse composto foi identificado no gênero *Protium* (GOMES et al., 2012; MOTHANA et al., 2011).

Figura 25 Espectro de massas do íon de m/z 429,850, atribuído ao epi-friedelanol, obtido do cromatograma do extrato DF da *T. rhoifolia* Willd empregando o UPLC-MS/MS TQD no modo positivo (Fig. 21)



Na realização do método pré-estabelecido por *QbD* no modo positivo indicou o íon $[M+H]^+$ de m/z de 429,78 (Fig. 25 e Tab. 7) como condizendo com o composto epi-friedelanol (Fig. 22-c) (KUNDU et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2007;

SATIRAPHAN et al., 2012;), já caracterizado em extratos entre eles os da Burseraceae (KUNDU et al.,2000; RODRIGUES, 2015; YANG et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2007).

5.2 ENSAIO LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR

5.2.1 Atividade Antiparasitária

A avaliação leishmanicida da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd frente a *L. amazonensis* está sendo relatada pela primeira vez neste trabalho de dissertação, para os extratos folhosos etanólico (*EF*) e diclorometânico (*DF*). A avaliação da atividade anti-leishmania foi realizada sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Todos os ensaios foram realizados no mínimo em três experimentos independentes em triplicata.

Os efeitos leishmanicidas *in vitro* sobre as formas promastigotas e amastigotas da espécie *L. amazonensis* foram expressivos, quando utilizados os extratos folhosos de *DF* e *EF* da *Trattinnickia rhoifolia* Willd.

Os extratos *DF* e *EF* foram eficientes quanto à citotoxicidade em macrófagos da medula óssea de camundongos BALB/c, exceto a concentração de 100 µg mL⁻¹ do *DF*, visto que apresentaram menor citotoxicidade que os fármacos sintéticos, antimoniais pentavalentes. Ambos os processos imunomoduladores desencadeados pelos extratos folhosos da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd e a identificação fitoquímica do extrato *DF* por HRGC-MS/MS e UPLC-MS/MS TQD, principalmente do efeito dos compostos caracterizados - ácido eicosanóico ou ácido araquídico, ácido betulônico, crisina, daidzeína genisteína, ácido feruloilquínico, epi-friedelanol, dodeicosanóico, salienta possível efeito sinérgicos dos compostos no extrato.

Com relação ao ácido epi-friedelanol, em modelo de inflamação aguda induzida por zimosan, Chatuverdi et al. (1974), verificaram que este composto apresentava capacidade anti-inflamatória quando administrado por via oral em camundongos na concentração de 30 e 100 mg kg⁻¹, quando medida 4 horas após indução. O mesmo efeito anti-inflamatório foi observado no modelo de pleurisia induzida por lipopolissacarídeo com tratamento via oral nas mesmas concentrações (30 e 100 mg kg⁻¹), medida 24 h após a indução. Na leishmaniose, não há relatos de sua atividade anti-inflamatória com o composto isolado, contudo, Almeida et al. (2011) verificaram a atividade de extratos de *Gustavia elliptica* contra formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. Este extrato apresenta entre

outros compostos o ácido epi-friedelanol na concentração de aproximadamente 5%. Os autores relataram que o extrato em clorofórmio apresentou maior inibição em *Leishmania (V) braziliensis* e *L. (V) guyanensis*, enquanto que os extratos em hexapostos e metanol apresentaram inibição contra *L. (V) braziliensis*.

Outro dos compostos encontrados em nosso extrato, o ácido ferulilquímico, foi demonstrado por Stalmach et al. (2006) que este composto presente em café, seu extrato apresentava ação antioxidante e antibacteriana. Além disso, Yang et al. (2003), estudando extrato de *Scorzonera divaricata* isolaram este ácido e, verificaram que este apresentava atividade antioxidante. Do mesmo modo, com relação ao dodecoisanóico, Deon (2004) verificou que este composto também apresenta atividade antioxidante, contudo, não encontramos relatos na literatura até o momento, de estudos correlacionados a possível atividade leishmanicida de ambos os compostos. Estes relatam sugerem que estes compostos podem participar na atividade leishmanicida observada neste estudo, contudo novos testes com cada um deles devem ser realizados.

Em perspectiva a avaliação citotóxica, quando realizados o tratamento pós-infecção com $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato *DF*, os resultados demonstram efetiva capacidade de inibir a replicação dos parasitas *in vitro* e o extrato *DF* apresentou eficiência em relação ao tratamento para todos os períodos em que foi analisado. Assim, o composto e os derivados do eicosano, já caracterizado na espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, juntamente com os outros compostos identificados são congruentes aos dados da literatura.

A avaliação cinética de recuperação, pela primeira vez relatada para a espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, avaliada para os extratos *EF* e *DF* ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram redução da formas prosmatigotas recuperadas em 7 dias após infecção com prosmatigotas de *L. amazonensis* em 100%.

Os extratos *EF* e *DF* modularam a produção das citocinas IL-1 β ; TGF- β ; IL-12, que induziram a eliminação do parasito. Os testes de níveis NO, não foram satisfatórios, porém sabendo que alguns compostos podem apresentar atividade direta em protozoários independente da atividade imunomoduladora, devem ser mais claramente elucidados, por mais estudos, como forma de identificar os mecanismos de ação envolvidos na sua atividade direta, pois a espécie *Trattinnickia rhoifolia*, apresentou resultados concisos quando atividade

leishmanicida *in vitro* para as formas promastigotas e amastigotas da espécie *L. amazonensis*.

5.2.1.1 Atividade Leishmanicida dos Extratos *EF* e *DF* em Formas Promastigota de *L. amazonensis*

Os ensaios frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizando-se os extratos *EF* e *DF* de *Trattinnickia rhoifolia* Willd foram realizados com as concentrações 5,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, durante 24, 48 e 72 h, (Fig. 28).

No presente estudo, observou-se que os parasitos do grupo controle apresentaram crescimento exponencial ao longo do período testado (Fig. 26A e B). Os extratos *EF* (Fig. 26A) e *DF* (Fig. 26 B) exibiram efeito leishmanicida *in vitro* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. No entanto, não houve diferença entre os tempos e as concentrações testadas, demonstrando que a ação desses extratos não foram concentração ou tempo-dependente.

O extrato *EF* reduziu a proliferação das formas promastigotas em todas as concentrações testadas após 24 horas de tratamento, quando comparado com o controle. Neste período, as maiores taxas de redução foram 30% e 25% nas concentrações de 25,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), respectivamente. Em 48 h, essa redução de promastigotas viáveis diminuiu e diferiu do controle apenas nas concentrações de 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (22%) e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (30%). Nos experimentos realizados com 72 h foi demonstrado novamente redução na proliferação de formas promastigotas em todas as concentrações testadas com redução de 22%, 34%, 35%, 38% e 32% nas concentrações de 5,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Fig. 26C).

Em relação ao extrato *DF*, o efeito leishmanicida observado após o tratamento com diferentes concentrações deste extrato foi mais tardio quando comparado ao extrato *EF*, apresentando uma redução mais expressiva após 72 h de tratamento (Figura 26D).

Após 24 h de tratamento com as diferentes concentrações de *DF*, não houve redução na porcentagem de promastigotas viáveis quando comparado ao controle. No entanto, após 48 h observou-se redução de 23%, 32,5%, 19% e 23%

nas concentrações de 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Nos experimentos realizados com 72 h, todas as concentrações testadas apresentaram efeito leishmanicida sendo o tratamento com 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *EF*, o mais eficaz na redução da viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* (35%) (Fig. 26D).

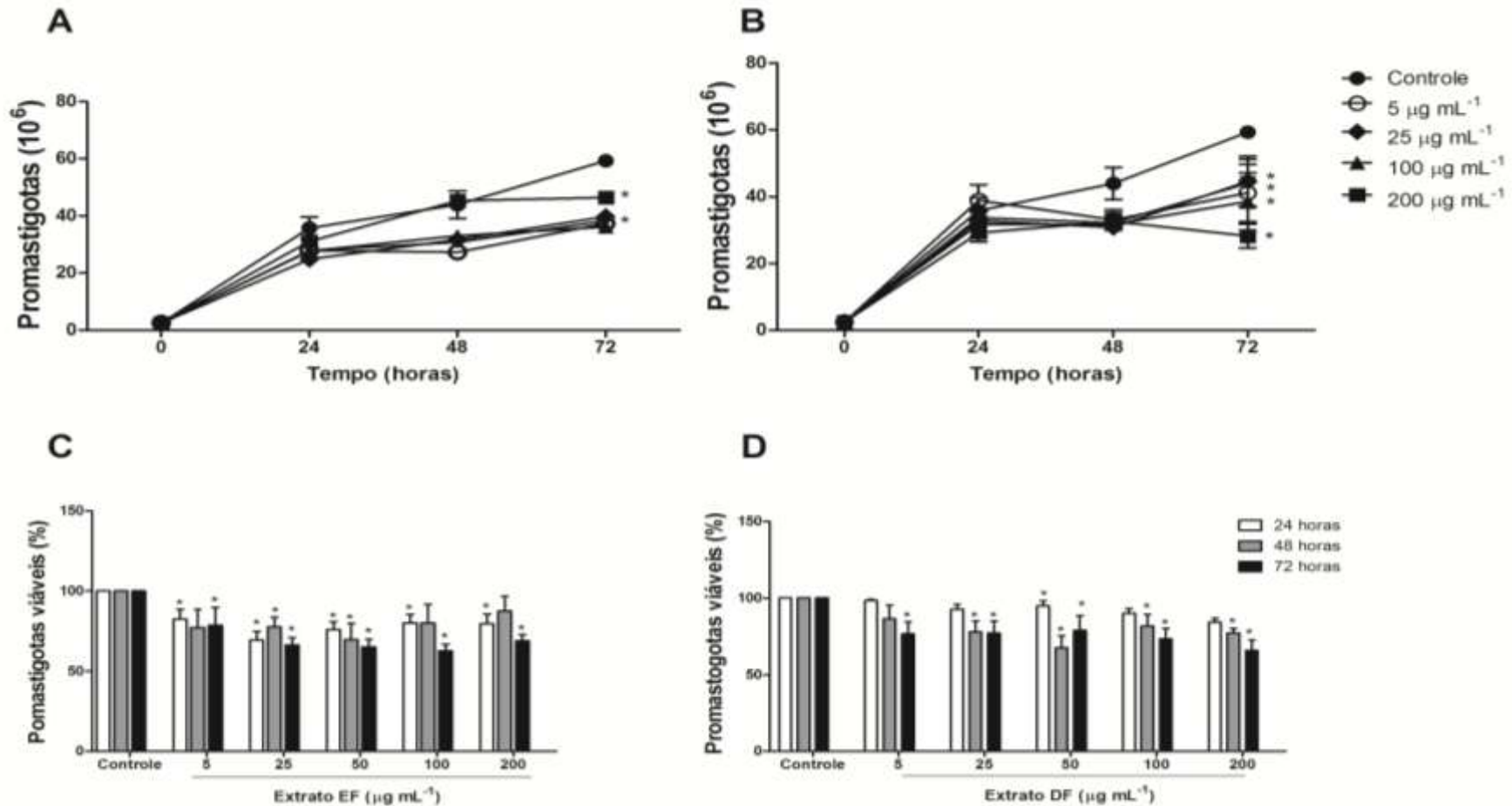
O efeito tardio desencadeado pelo tratamento com *DF* possivelmente deve-se a diferença nos constituintes dos extratos. Dentre os compostos indicados em análises por cromatografia LC-MS e GC-MS no extrato *DF* de *Trattinnickia rhoifolia* Willd, destacamos a crisina, a daidzeína e a hidroxiflavona. A crisina, assim como a daidzeína e hidroxiflavona foram associadas a uma atividade tripanomicida e leishmanicida *in vivo* para as espécies *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei rhodesiense* e *Leishmania donovani*, respectivamente, sendo a hidroxiflavona, um dos compostos mais potente, possuindo o IC_{50} de 0,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. donovani* (TASDEMIR et al., 2006).

Ainda, com propriedades leishmanicida Takahashi et al. (2004) pesquisaram vários compostos e, verificaram que dentre eles o ácido betulônico também apresenta esta característica. O efeito deste composto foi observado em formas promastigotas tanto de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. brasiliensis*.

A genisteína, outro constituinte deste extrato, é um agente inibidor das tirosinas quinases, enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas, sendo a chave central no mecanismo intracelular de regulação e transdução de sinais celulares (SILVA et al., 2009).

Deste modo, dos diversos componentes indicados nos extratos de *Trattinnickia rhoifolia* Willd, vários possuem atividade contra parasitos e micro-organismos (Tab. 8), demonstrando seu alto potencial na utilização terapêutica.

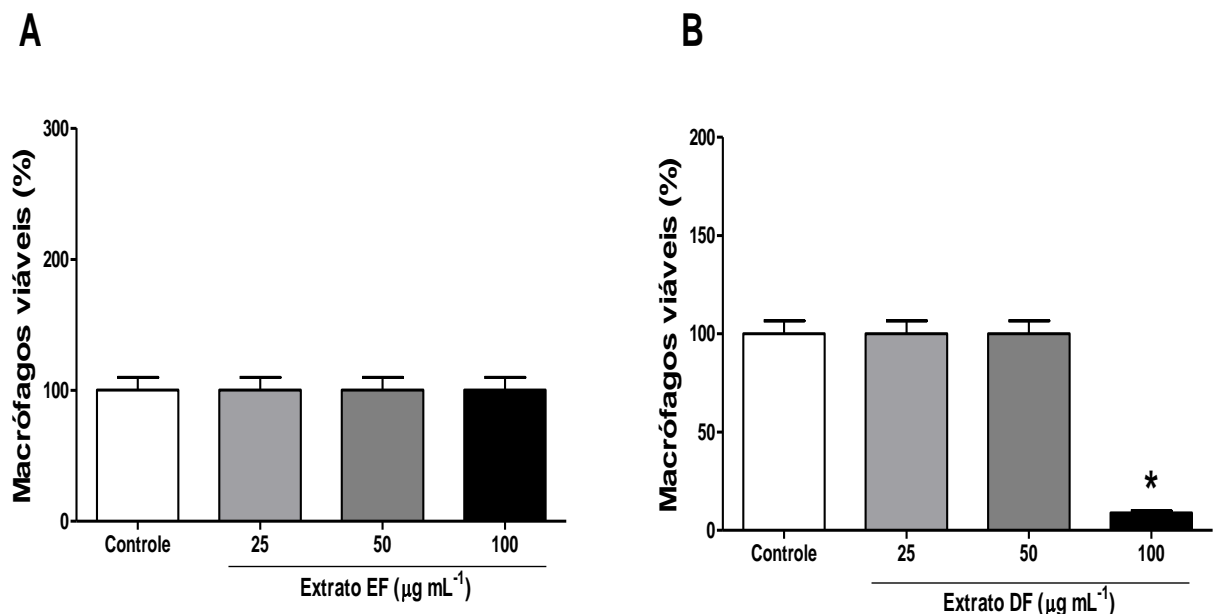
Figura 26 Atividade leishmanicida dos extratos brutos de *EF* e *DF* na cinética de proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 5,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato de *EF* (A) e *DF* (B) por 24, 48 e 72 h. Como controle, foram utilizadas promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em cultura sem tratamento. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0.05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]



5.2.2 Ensaios de Viabilidade Celular por MTT com Extratos *EF* e *DF*

Com a finalidade de aprofundarmos nos conhecimentos sobre os efeitos dos extratos *EF* e *DF* como moduladores da resposta biológica, primeiramente foi avaliado a ação citotóxica destes extratos, sobre macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Estas células foram tratadas com concentrações de 25,0; 50,0 ou 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de *EF* e *DF* por 72 h. Os resultados obtidos estão representados na Figura 27.

Figura 27 Ensaio de viabilidade por MTT em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c tratados com 25,0; 50,0 ou 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos *EF* (A) e *DF* (B) por 72 horas. Células que não receberam tratamento foram utilizadas como controle. Os dados representam a porcentagem de células viáveis. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]



Neste experimento não foi observado alteração na viabilidade de macrófagos tratados com o extrato *EF* nas concentrações de 25,0; 50,0 ou 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 27A). No entanto, para o extrato *DF* a concentração de 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou toxicidade para as células em comparação ao controle (Fig. 27B). Desse modo, a concentração de 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos *DF* e *EF* tornou-se a escolha para as próximas avaliações, devido ao seu efeito leishmanicida similar às outras

concentrações no ensaio anti-promastigota e, por não apresentar efeitos tóxicos para os macrófagos.

5.2.3 Ensaio Leishmanicida de BMDM de Camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e Tratadas com Extratos *EF* e *DF*.

Para avaliar o efeito leishmanicida em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* do extrato *EF* e *DF*, macrófagos medulares de camundongos BALB/c foram infectados com os parasitos e posteriormente tratados com os extratos na concentração de 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A quantificação do número de macrófagos infectados e a relação do número de amastigotas por macrófagos foram realizadas após 24 h, 48 h e 72 h do início do tratamento.

Ambos os extratos apresentaram ação sobre os macrófagos infectados sendo capazes de reduzir a porcentagem de infecção e o número de amastigotas por célula. Com relação ao extrato *EF*, este tratamento foi capaz de reduzir cerca de 7% a porcentagem de macrófagos infectados, após 24 horas de tratamento, quando comparado ao controle. A partir de 48 h de infecção, observou-se que o tratamento com o extrato *EF* aumentou sua atividade leishmanicida reduzindo em 50% a infecção celular. Após 72 h de tratamento, não houve diferença significativa entre as células tratadas com o extrato *EF* e o controle (Fig. 28A).

Essa mesma relação foi observada quando avaliada a ação de *EF* sobre o número de amastigotas por macrófago. O tratamento com o extrato *EF* após 24 h reduziu em 22% o número de amastigotas intracelulares, quando comparado ao controle. Após 48 h, houve 37% de redução no número de amastigotas intracelulares nos macrófagos tratados. Já, após 72 h, as células tratadas com *EF* apresentaram números semelhantes ao controle, não apresentando diferença significativa (Fig. 28B).

Com relação ao tratamento com o extrato *DF*, os resultados demonstraram que após 24 h e 48 h, ocorreu uma redução de 21% e 58%, respectivamente na porcentagem de macrófagos infectados, enquanto em 72 h, o tratamento com *DF* apresentou índice de redução de infecção de 20% em relação ao controle (Fig. 28A).

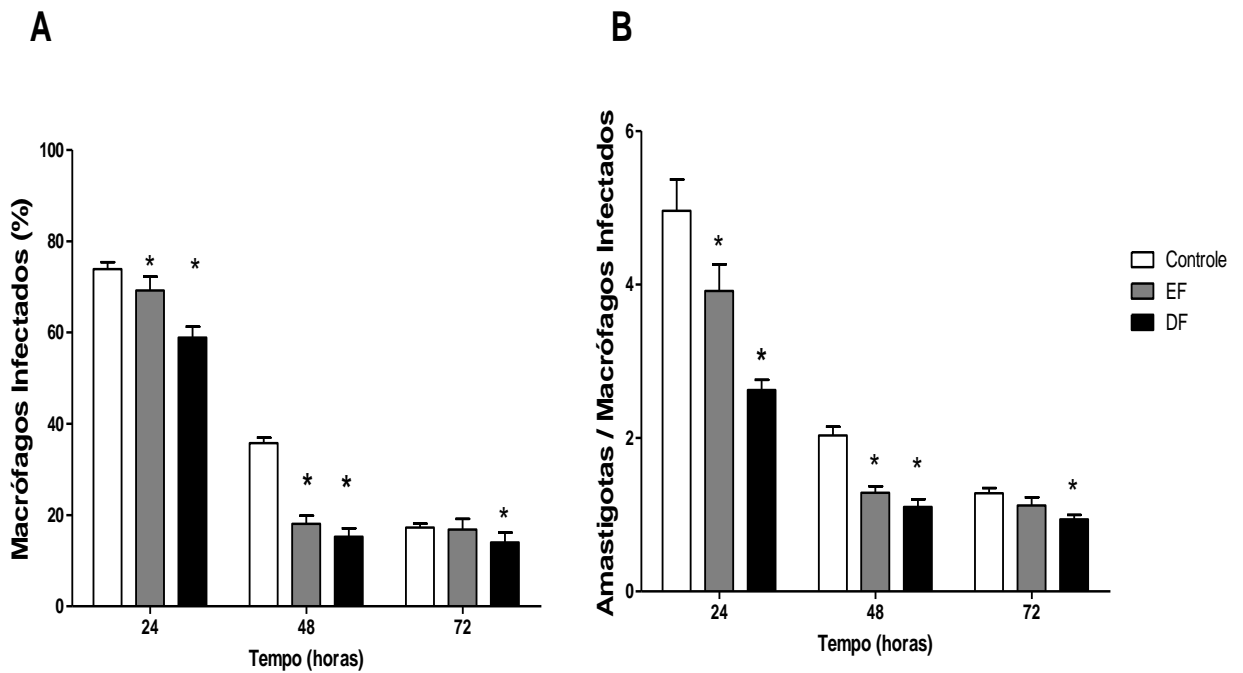
Para relacionar a ação do extrato *DF* com a eliminação das formas intracelulares, o número de amastigotas por células foi determinado. Após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento, o número de amastigotas intracelulares reduziu em 52%, 46% e 27% respectivamente, quando comparado ao controle (Fig. 28B).

Notamos que em ambos os extratos, o número de macrófagos infectados e de amastigotas por célula tende a diminuir conforme o tempo de tratamento. Isso nos sugere que, os extratos *EF* e *DF* são capazes de inibir a replicação dos parasitas *in vitro* e que o extrato *DF* apresentou melhor eficiência para todos os períodos analisados.

Novamente, vale ressaltar, a genisteína como inibidor de tirosinas quinases que estão envolvidas na infecção da *L. donovani* em macrófagos, como demonstrado por Ghosh e Chakraborty (2002). Ao utilizar a genisteína como inibidor, resultou na diminuição da captação do parasita pela célula, sendo dose-dependente.

O mesmo parece não ocorrer com a espécie *L. amazonensis*. O uso da genisteína diminuiu a liberação de óxido nítrico e aumentou a carga parasitária em macrófagos murinos (MARTINY et al., 1996). Em contrapartida, Love et al. (1998) reportaram uma inibição de amastigotas *L. amazonensis*, após o tratamento com genisteína. Sendo assim, as diferentes condições experimentais e tempo prolongado envolvendo a toxicidade em parasitos, pode explicar estas divergências na literatura.

Figura 28 Atividade leishmanicida em macrófagos da medula óssea de camundongos BALB/c após infecção com promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratamento com 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato bruto *EF* (A) e *DF* (B) por 24, 48 e 72 horas. Células que não receberam tratamento foram usadas como controle. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]



5.2.4 Cinética de Recuperação de Promastigotas de Macrófagos Infectados

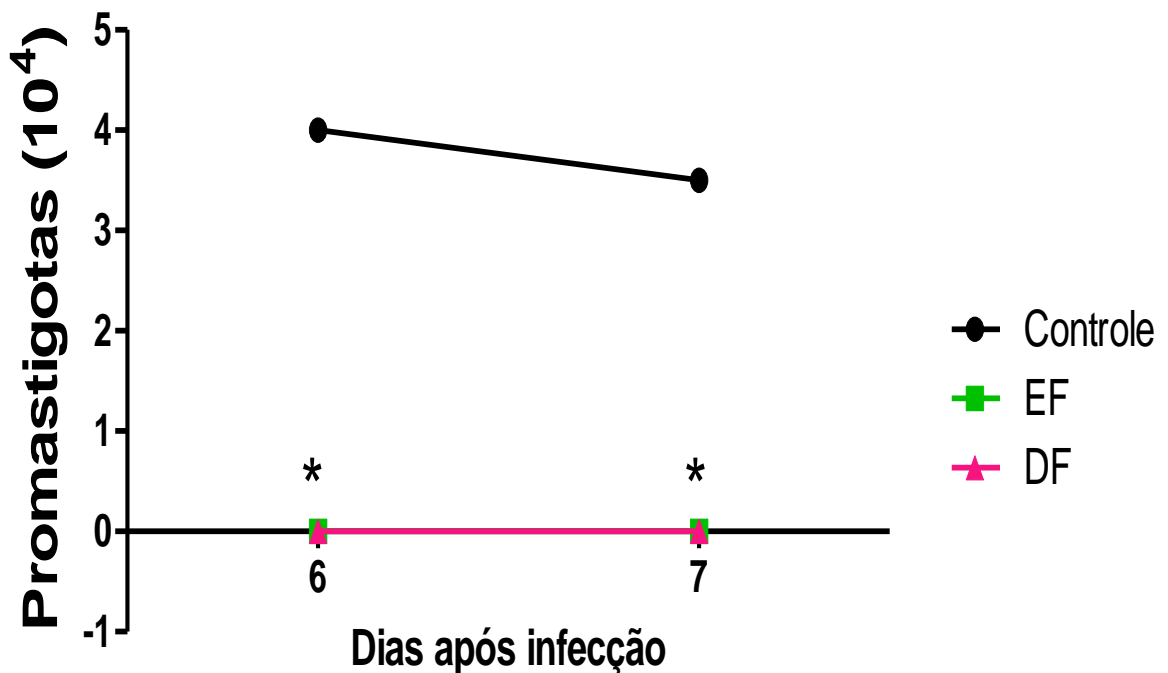
Os tratamentos com os extratos *EF* e *DF* foram capazes de reduzir o percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos quando comparado com o controle não tratado (Fig. 29). Assim, para ratificar os resultados, foi realizada a cinética de recuperação, onde se avalia o efeito leishmanicida indireto dos extratos *EF* e *DF in vitro* após o tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* por 48 h, através da recuperação das formas promastigotas viáveis.

Com isso, foi observado que após o tratamento com *EF* e *DF* de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, não foi evidenciado formas promastigotas recuperadas em ambos os tratamentos após 7 dias (Fig. 29).

Trabalhos relatados na literatura com cinética de recuperação de *Leishmania braziliensis* envolvendo extrato de própolis apresentaram uma redução na recuperação de 94,4% de formas promastigotas recuperadas (SILVA, 2013). Vários grupos químicos são encontrados na composição heterogênea da própolis, entre eles hidrocarbonetos, tais como eicosano e nanocosano, os quais também são encontrados na espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd (RODRIGUES, 2010). Em bioensaios realizados com extrato de diclorometano demonstraram atividade sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e atividade citotóxica em células tumorais por eicosano e nanocosano (COELHO, 2011).

Bocanegra et al. (2010) estudaram o extrato hidroalcoólico de *Aspidosperma desmanthum*, *Tabebuia serratifolia*, *Brunfelsia grandiflora*, plantas da Amazônia peruana contendo os compostos como derivados do eicosano e nanocosano, em três diferentes concentrações (800, 400 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum in vitro*, sendo observada no extrato elevada atividade antileishmania (BOCANEGRA, 2010).

Figura 29 Recuperação de promastigotas a partir de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com extrato *EF* e *DF* *in vitro*. Após a infecção com promastigotas de *L. amazonenses*, macrófagos foram tratados com $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato bruto *EF* e *DF* onde permaneceram incubados por 48 horas. Após este período, foram quantificadas diariamente as formas promastigotas através de contagem por câmara de Neubauer. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)].



5.2.5 Dosagens de Citocinas

Para avaliar se a atividade anti-mastigota dos extratos *EF* e *DF* poderiam estar relacionada a uma imunomodulação dos macrófagos medulares murinos, investigou-se a produção das citocinas IL-1 β ; TNF- α ; IL-12; TGF- β e IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com os extratos *EF* e *DF*. Verificamos que o tratamento não alterou os níveis das citocinas TNF- α e IL-10, mas interferiu na produção de IL-1 β , IL-12; e TGF- β (Fig. 30 A, C e D).

Com relação aos níveis de IL-12, observamos no nosso modelo, um aumento significativo nos níveis de IL-12 quando tratamos com *EF*, nos períodos de 48 h e 72 h, enquanto o extrato *DF* apresentou um perfil diferente, com redução em 24 h e aumento em 72 h (Fig. 30C).

A IL-12 está envolvida na estimulação das respostas imune natural e adaptativa, e desempenha um papel essencial na indução da resposta Th1 e supressão da Th2. Além do mais, esta citocina aumenta a atividade citotóxica e produção de IFN- γ , principal citocina ativadora de macrófagos (ARCHAMBAUD et al., 2009). Vários trabalhos experimentais vêm demonstrando que a resistência à infecção por *Leishmania* sp. está associada a uma resposta Th1, demonstrando portanto, a importância da produção de IL-12 no combate ao parasito (TRINCHIERI, 2011; BARROS, 2012).

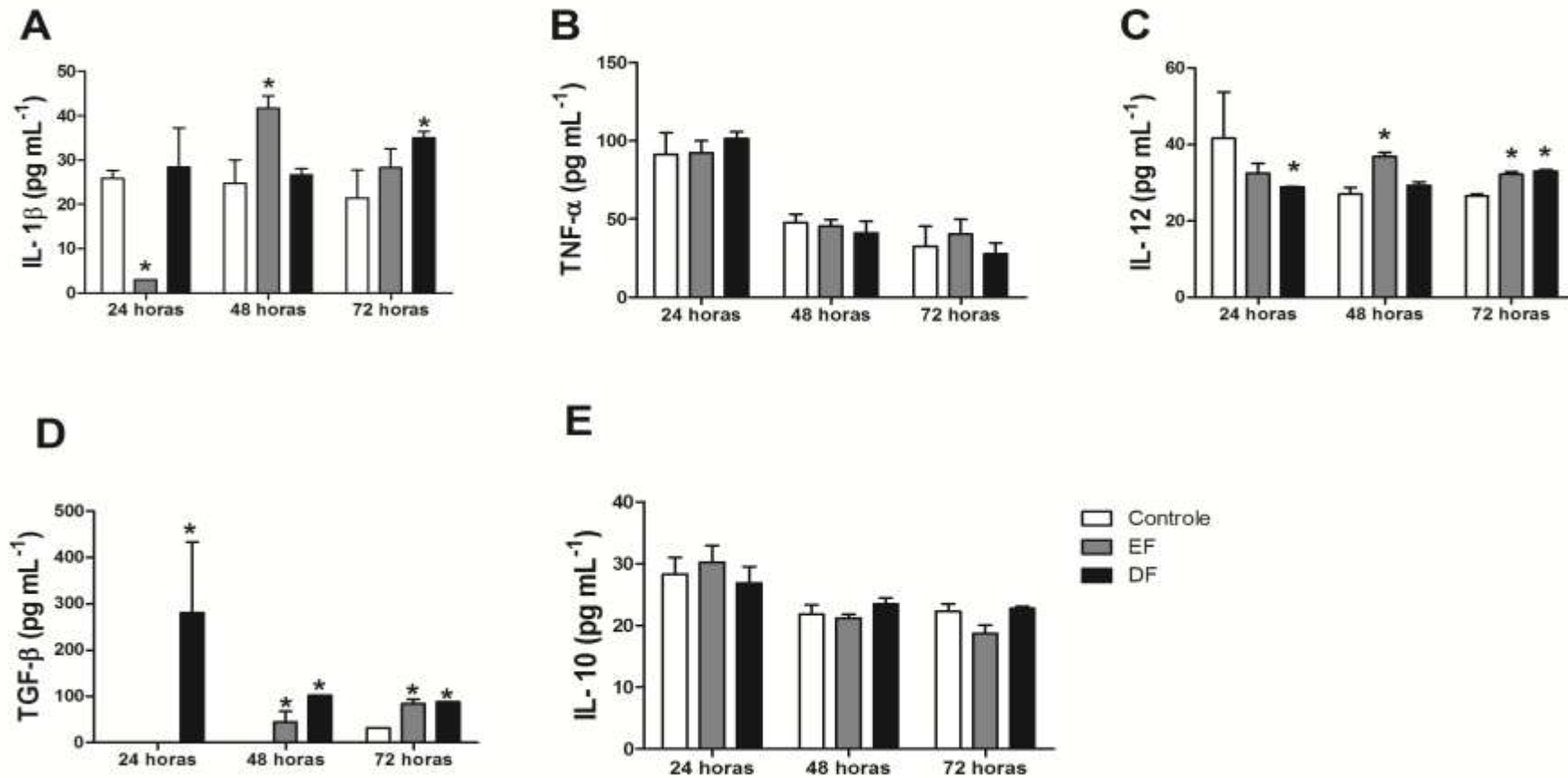
Estudos mostram, que espécies de *Leishmania*, como a *L. major* (CARRERA et al., 1996) e *L. amazonensis* (RUHLAND; KIMA, 2009) são capazes inibir a produção de IL-12 de macrófagos medulares provenientes de camundongos susceptíveis. Nossos extratos foram capazes de aumentar os níveis de IL-12 mesmo na presença de *L. amazonensis*, induzindo um perfil de resistência ao parasito.

Do mesmo modo, observamos que ambos os extratos foram capazes de alterar a produção de IL-1 β por macrófagos infectados, sendo que o *EF* apresentou uma redução na produção desta citocina no período de 24 h e um aumento em 48 h de tratamento. O extrato *DF* foi capaz de aumentar os níveis desta citocina em 72 h em relação ao controle (Fig. 30A).

Sabe-se que a IL-1 β é um dos mediadores centrais das reações imunológicas, desempenhando uma função semelhante ao TNF- α , e em conjunto, ambas agem na imunidade inata e na inflamação, sendo, portanto, importante na resposta do hospedeiro a infecções e outros estímulos (SIMS et al., 1994; BACHIEGA, 2011).

Lima-Junior et al. (2013) mostraram que o inflamassomo pode ser induzido em resposta a infecções por várias espécies de *Leishmania*, como a *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi*, sendo importante na restrição da replicação do parasito em macrófagos *in vitro* e *in vivo*. Desse modo, a produção de IL-1 β facilita a resistência do hospedeiro à infecção, bem como a sinalização do receptor IL-1R e da molécula MyD88 capaz de induzir a produção de NO.

Figura 30 Perfil da produção de citocinas em macrófagos medulares tratados com os extratos *EF* e *DF* *in vitro* após a fagocitose de *L. amazonensis*. Quantificação de IL-1 β (A); TNF- α (B); IL-12 (C); IL-17 (D); TGF- β (E); IL-10 (F) realizada por meio do teste de ELISA dos sobrenadantes dos ensaios fagocíticos. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]



Com relação ao TGF- β , esta citocina assim como a IL-10, são citocinas com efeitos reguladores da resposta Th1/Th2 (CARVALHO et al., 2012; ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007). O papel do TGF- β tem sido mostrado nos modelos de leishmaniose experimental, utilizando-se macrófagos peritoneais murinos infectados por *L. amazonensis* (BARRAL-NETTO et al., 1992), *L. braziliensis* (BARRAL et al., 1993) e *L. major* (NACY et al., 1991). Na infecção *in vivo*, a produção local de TGF- β nas patas de camundongos já foi demonstrada por imunohistoquímica (NACY et al., 1991). Durante o processo infeccioso, a produção de TGF- β leva ao aumento da carga parasitária *in vitro* (NACY et al., 1991; BARRAL et al., 1993) e *in vivo* (BARRAL-NETTO et al., 1992; BARRAL et al., 1993).

Ao analisarmos os níveis de TGF- β , observamos que o extrato *DF* foi capaz de induzir a produção desta citocina em todos os tempos testados, no entanto, o extrato *EF* aumentou os níveis em 48 e 72 h.

Embora tivéssemos a produção aumentada de TGF- β pelos extratos, quando avaliamos o teste antiamastigota e de recuperação de promastigotas, observamos redução na infecção e ausência de promastigotas recuperadas, nos grupos tratados com os extratos *EF* e *DF*, porém observamos promastigotas nos controles, no qual não houve produção inicial de TGF- β . Sendo assim, embora esta citocina pudesse induzir o aumento da carga parasitária, o mesmo não foi observado no nosso modelo, já que concomitantemente também foi observado o aumento na produção de IL-1 β e IL-12, citocinas importantes para o controle da infecção por *Leishmania amazonensis*.

5.2.6 Dosagem de Óxido Nítrico

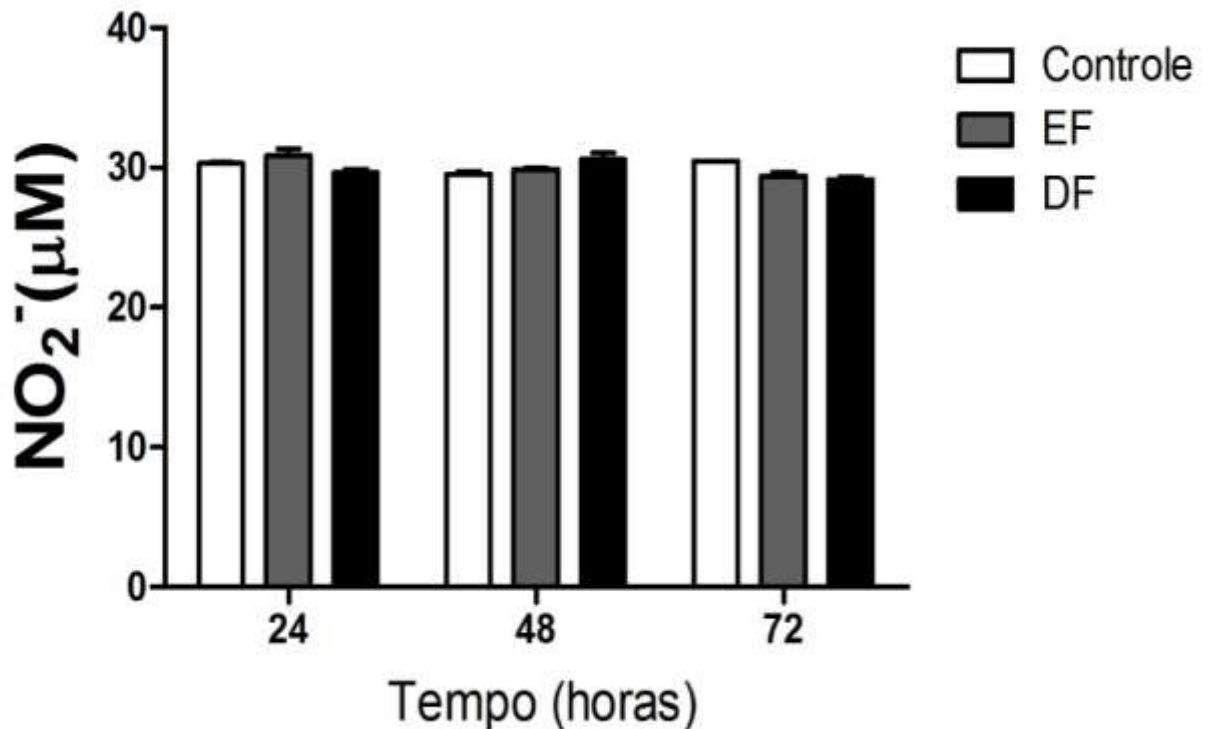
Sabemos que a IL-1 β apresenta ação sinérgica com o outras citocinas na indução de iNOS e, conseqüente na produção de NO *in vitro* (KANE, 2000; DINIZ, 2004; LIMA-JUNIOR et al., 2013). O NO é uma das moléculas consideradas cruciais no controle das infecções por *Leishmania* spp. gerada através da ativação dos macrófagos, após a indução por IFN- γ e TNF- α e IL-1 β (GANTT et al., 2001; LIMA-JUNIOR et al., 2013). Contudo, em nosso experimento não observamos diferença nos níveis de NO entre os períodos avaliados após os

tratamentos com os extratos *EF* e *DF* (Fig. 31). Este evento pode ser decorrente da produção não significativa de TNF- α encontrada no nosso modelo.

Sabe-se que espécies de *Leishmania* possuem vários mecanismos de escape (OLIVIER, GREGORY, FORGET, 2005). Entre eles, reduzir a produção de NO por macrófagos infectados induzidos pelo aumento da expressão da enzima arginase, enzima esta, responsável por catalisar a clivagem de L-arginina, aminoácido precursor de NO (DA SILVA et al., 2012; WANASEN, SOONG, 2008; BOGDAN, RÖLLINGHOFF, 1999).

Quando o patógeno é reconhecido pelos fagócitos e engolidos, gatilha um processo denominado *burst* respiratório, no qual eleva o consumo de oxigênio dentro do fagócito. A enzima NADPH-oxidase possui um papel essencial no *burst* respiratório e ataca a membrana do fagossomo durante a fagocitose (YANG et al., 2011). As espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas podem agir diretamente na membrana do parasito, levando a danos como peroxidação lipídica, ruptura da cadeia de DNA, deaminação, oxidação da metionina, entre outros se mostrando importante na eliminação de espécies de *Leishmania* como *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. donovani*, controlando a carga parasitária (LIU et al., 2005; PRATICO, 2001; CUNHA-JÚNIOR et al., 2017; DA SILVA et al., 2016; ROMA et al., 2016; BOSE et al., 2016; MANDAL et al., 2016).

Figura 31 Perfil da produção de óxido nítrico estimada pela determinação dos níveis de nitrito nos sobrenadantes coletados dos ensaios fagocíticos. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. [*Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). (One-way ANOVA seguido do teste de Tukey)]



Sendo assim, acreditamos que no nosso modelo houve produção de ROS e consequente eliminação do parasito, o que explicaria a morte parasitária mesmo com resultados não-significativos de NO. Podemos sugerir também, que os extratos *EF* e *DF* apresentaram atividade leishmanicida independente de NO. Sabendo-se que alguns compostos podem apresentar atividade direta em protozoários, acreditamos que nossos extratos devem ser mais bem estudados como forma de identificar os mecanismos de ação envolvidos na sua atividade direta.

6 CONCLUSÃO

A atividade leishmanicida *in vitro* foi verificada através da redução significativa da proliferação das formas promastigotas e amastigotas da espécie *L. amazonensis*, ao se empregar os extratos brutos *DF* e *EF*, preparados a partir das folhas da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, utilizando diclorometano e etanol como solvente extrator. O maior efeito antiproliferativo foi verificado para as menores concentração dos extratos de *EF* e *DF* ($25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, para o menor tempo de tratamento.

Os extratos *DF* e *EF* foram eficientes quanto à citotoxicidade em macrófagos da medula óssea de camundongos *BALB/c*, exceto para concentração de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do *DF*, apresentando menor citotoxicidade que os fármacos sintéticos antimonialis pentavalentes. Pela avaliação citotóxica, quando realizados o tratamento pós-infecção com os extratos de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, houve efetiva capacidade de inibir a replicação dos parasitas *in vitro*, sendo que o extrato *DF* foi o que apresentou maior eficiência em relação ao tratamento para todos os períodos analisados e, portanto foi selecionado para ser caracterizado quimicamente. Assim, os derivados do eicosano, já caracterizado na espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, conjuntamente com outros compostos identificados são congruentes aos dados da literatura.

A avaliação da cinética de recuperação, pela primeira vez relatada para a espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd, demonstrou uma redução de 100% das formas promastigotas infectadas com *L. amazonensis*, após 7 dias de tratamento com os extratos *EF* e *DF* ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Os extratos *EF* e *DF* modularam a produção das citocinas IL-1 β ; TNF- α ; IL-12, respostas que estão de acordo com as atividades anti-inflamatórias relatadas para a espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd.

Os testes de níveis de NO não foram conclusivos, já que não apresentaram elevação em suas taxas. Portanto, mais estudos são requeridos, a fim de se elucidar os mecanismos de ação envolvidos, já que os resultados quanto á atividade leishmanicida *in vitro* foram concisos, considerando-se que há compostos que podem apresentar atividade direta sob os protozoários, independente de sua atividade imunomoduladora.

A identificação sugerida de compostos químicos voláteis do extrato *DF* feita por HRGC-MS/MS, considerando-se 80% de similaridade com os compostos da biblioteca NIST, possibilitou atribuir à atividade biológica aos: ácido eicosano, octadecano, octacosano, nonacosano, tetra-pentacontano, ácidos pentadecanóico, ácido nonadecanóico e o éster metil-11,14,17-eicosatrienoato, corroboradas pela presença desses compostos, em dados de caracterização e de atividade leishmanicida reportados pela literatura, para a família Burseraceae e em específico para *T. rhoifolia* Willd, salientando possível efeito sinérgicos dos extratos.

A determinação da composição química do extrato *DF* por UPLC-MS/MS TQD, possibilitou atribuir a atividade leishmanicida e imunomoduladora, no modo negativo ao: ácido eicosanoico, ácido betulônico, crisina, daidzeína, genisteína, ácido feruloilquínico, e no modo positivo ao: flavonol, dodeicosanóico e epi-friedelanol, presentes em espécies vegetais, da família Burseraceae e alguns descritos na literatura para a *T. rhoifolia* Willd.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é o primeiro reporte acerca da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd com o objetivo de estudar a atividade leishmanicida e imunomoduladora, relacionando-a a sua composição química. Para aprofundar os estudos será:

- Realizada a extração fracionada dos constituintes das partes vegetais da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd com solventes de diferentes polaridades, a fim de separar e determinar os constituintes em grupos de substâncias.
- Realizar o perfil químico com a caracterização e identificação dos compostos de cada uma das frações isoladas por UPLC-MS/MS utilizando as condições pesquisadas neste trabalho.
- Realização de novos testes para avaliar a atividade leishmanicida e imunomoduladora com as frações ou grupo de substâncias da espécie *Trattinnickia rhoifolia* Willd.
- Verificar o que há de comum entre as frações ativas para promover o isolamento dos compostos ativos de interesse.
- Separar as substâncias ativas em um sistema preparativo automatizado de

coletor de frações, que permita obter uma quantidade razoável de substância para caracterizá-la por UHPLC-ToF, RMN e Infravermelho, testando sua atividade biológica, pensando na aplicação em novos fármacos, para o tratamento das doenças negligenciadas, como a leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, F. A.; AL-MASSARANY, S. M.; KHANZ, S.; AL-HOWIRINY, T. A. Phytochemical and biological studies on *Saudi Commiphora opobalsamum* L. **Natural Product Research**, v.21, n.5, p.383-392, 2007.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, n.8, p.942-942, 2007.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, v.61, n.7, p.2953-9, 1993.
- AHMED, A. A.; WAHBI A, H.; NORDLIN, K. Neuropeptides modulate a murine monocyte-macrophage cell line capacity for phagocytosis and killing of *Leishmania major* parasites. **Immunopharmacol-immunotoxicol**, v.23, p.398-400, 2001.
- AKENDENGUE, B. NGOU, M. E. LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite**, n.6, p.3-8, 1999.
- ALMEIDA, M. F. MELO, A. C. R.; LEONOR, L. P. L. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida De *Gustavia elliptica* (*Lecythydaceae*) **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p.1182-87, 2011.
- ALMEIDA, P. D. O. Avaliação da atividade anti-inflamatória de Triterpenos isolados de óleo-resinas de *Protium paniculatum* Engler (*Burseraceae*), **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)**, v.1 p.10-13, Universidade Federal do Amazonas, 2013. - Disponível em: <<http://tede.ufam.edu.br/handle/tede/2561>>. Acesso em: 16 mai. 2016.
- ALVARENGA, R. F; SILVA, D. R. C; MARIA, E. Síntese de Indicuminas: Análise retrossintética para a obtenção de cumarinolignoides, **Congresso Fluminense de Inovação Tecnológica**, UENF 2014, Disponível em:< <http://www.essentiaeditora.iff.edu.br> >. Acesso em: 12 out. 2016.
- AMARAL, J. A. S.; Contribuição para a Caracterização Química das Folhas e Sementes de Aveleira (*Corylus avellana* L.) e de Nogueira (*Juglans Regia* L.). **Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas)**, p.5-255, 2008. Disponível em:< https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/.../104560_FFD_AMA_6121_ex2_TD_01_C.p >. Acesso em: 02 Jan. 2016.
- AMORIM, R.; GALHARDO, A.; VALADÃO, C. A. A.; PECCININI, R. G. Determinação de cetamina em plasma por HPLC: aplicação em um estudo de farmacocinética de associação medicamentosa em cães. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.1, p.68-74, 2008.

ANTHONY, J.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – A resource for ant parasitic agents? **Trends in parasitology**, v.21, p.462-468, 2005.

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G. A possible mechanism for and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.85, p.27-35, 2006.

ARMELINI, A. I. P. V. Avaliação do perfil de permeação cutânea in vitro da daidzeína em nanoemulsão cosmética: uma abordagem com foco na avaliação de segurança, p.9-43, 2015. **Dissertação (Mestre em Farmacêutica)**- Universidade de São Paulo. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde>>, Acesso em: 2 ago. 2016.

ARNOLDI, J.; MOLL, H. Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. **Dev Immunol**. n.6, p.1-2, 1998.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonosis. **Int. J. Parasit.**, n. 30, P. 1269-1281, 2000.

ASSIS, I. M. Lignóides de Burseraceae da Amazônia. p.12-30, 2013,. **Dissertação (Mestre em Química Orgânica)** - Universidade Federal do Alagoas. Disponível em < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis> >. Acesso em: 02 ago. 2016.

AWASTHI, A. MATHUR. R. K. Immune response to Leishmania infection. **Indian Journal of Medical Recombinant**, v.119, p.238 -258, 2004.

AZEVEDO, A. C. R. Natural infections of lutzomyia (nyssomyia) whitmani by leishmania of the braziliensis complex in baturite, ceara state, northeast. Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 251-257, 1990.

BACHIEGA, T. F. Produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por macrófagos estimulados *In Vitro* com própolis, Alecrim-Do-Campo, Capim-Limão e Cravo-Da-Índia. **Dissertação (Pós-graduação em Patologia)** - Universidade Estadual de São Paulo , v.1, n.1, p.9-30, 2011. Disponível em: < http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95858/bachiega_tf_me_botfm.pdf?sequence=1 >. Acesso em: 4 abr. 2016.

BANERJEE, T.; VALACCHI, G.; ZIBOH, Z. Inhibition of TNF α -induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF- κ B activation in A549 cells. **Mol. Cell. Biochem.**, v.238, p.5-10. 2002.

BAÑUS, A. L.; HIDE, L. H.; TIBAURENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.23-9, 1999.

BARRETO, S. V.; FERREIRA, P. L.; VIVARINI, A. C.; CALEGARI-SILVA, T.; SOARES, D. C.; REGIS, E. G.; PEREIRA, R. M.; SILVA, A. M.; SARAIVA, E. M.; LOPES, U. G.; BOU-HABIB, D. C. IL-27 enhances *Leishmania amazonensis* infection via ds -RNA dependent kinase (PKR) and IL-10 signaling. **Immunobiology**. v.220, n.4, p.437-44, 2015.

- BARROS, N. B. Efeito do lupano lipossomal na infecção experimental por *Leishmania amazonensis*. **Dissertação (Mestre em Biologia Experimental)**. Universidade Federal de Rondônia, v.1, p.10-60, 2012. Disponível em: < http://www.pgbioexp.unir.br/downloads/2809_efeito_do_lupano_lipossomal_na_infeccao_experimental >. Acesso em: 14 out. 2016.
- BELKAID, Y; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (il)-10 in the persistence of *leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-il-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, v.194, p.1497-06, 2001.
- BERMAN, J. D.; Visceral leishmaniasis in the new world & Africa. The Indian. **Journal of Medical Research**, v.123, p.288-294, 2006.
- BOCANEGRA, O. C. S. Agentes antiparasitarios de plantas de la Amazonia Peruana empleadas en medicina tradicional. n.1, p.67 -169, 2010. **Tese (Doutorado em Ciências)** - Universidade de Madri. Disponível em: < <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=37452> >. Acesso em: 25 out. 2016.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol. Today**. v.15. p.22–28, 1999.
- BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J, VIEGAS-JR, C. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.12, p.326-337, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200025>. Acesso em: 25 out. 2016.
- BOLZANII, V. S. A.; VIEGAS, C. JR.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry, **Quím. Nova**, v.29 n.2, p.326-336, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689855/>>. Acesso em: 12 fev. 2016.
- BORGES, R. M. A. Adrenoleucodistrofia - uma doença peroxissômica desmielinizante. **Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas)**, Centro Universitário de Brasília Faculdade de Ciências Da Saúde disponível em: < <http://repositorio.uniceub.br/bitstream/123456789/2443/2/9808180.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Altas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF, p.12-54, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos) 180. 2007.
- BREDA, M. C. Fitoesteróis e os Benefícios na Prevenção de Doenças: um Revisão, Trabalho de Conclusão de curso, p.12-40, 2010. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia)**-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Disponível em: < <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/70nce=1>>.
Acesso em: 3 fev. 2016.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. As bases farmacológicas da terapêutica. **MCGRAW-HILL**, Rio de Janeiro, RJ; 11ª Edição, 2006.

CABRAL, E. A. Utilização da Técnica de Fingerprinting por Espectrometria de Massa para a Análise de Extratos de Produtos Naturais. **Tese (Doutor em Química Orgânica)**, p.10-130, 2010. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-25042011-113943/pt-br.php> > . Acesso em: 20 set. 2016.

CAMARGO, J. R.; Aislamiento de principios biológicamente activos presente en especies colombianas de la familia Burseraceae, p.08-37, 2000. **Dissertação (Mestre em Biologia)** - Pontifícia Universidade Javeriana. Disponível em: < http://www.javeriana.edu.co/gifuj/BURSERACEAE_F.pdf >. Acesso em: 9 dez. 2016.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A.. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**. v.1, p.34-47, 2003. Disponível em: < http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252003000100023&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 jul. 2016.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R. T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MULLER, W.; KUHN, R.; SACKS, D. L. L. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.**, v.2 n.1, p.515-26, 1996.

CARVALHO L. P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Front Immunol**. v.301, n. 3, 2012.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. ; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**. v.56. n.4. p.315-25, 1994.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. **Nature's leadership against an ancient disease. Fitoterapia**. v.72, p.599-618, 2001.

CARVALHO, M. L. R.; GORIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**. v.36, n.1, p.70-80, 2003.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CHEN, G.; LI, X.; SALERI F.; GUO, M. Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. **Molecules**, n.1 p.1-14; 2016.

COELHO, A. G.; FREITAS, R. M.; DANTAS, J. A.; RESENDE, L. C. L.Extraction and characterization of essential oil of roots and biological activity tests of hydroalcoholic extract of *operculina* alata (ham) urban. **Res. El. de Farmácia**, v.3, n.1, p.1-9, 2011.

COELHO, Z. C. B.; TEIXEIRA, M. J.; MOTTA, E. F.; SINDEAUX, M.; SILVA, F. *In*

vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. **Braz J. Infect Dis**, n.14, v.5, p.476-82, 2010.

COELHO, Z. C. B.; TEIXEIRA, M. J.; MOTTA, E. F.; SINDEAUX, M.; SILVA, F.. Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes. **Quim. Nova**, v.34, n.4, p.665-676, 2011.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. **Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro, v.5, 1987.

COSTA, I. S.F. Ação da molécula doadora de óxido nítrico S-Nitrosoglutathione (GSNO) na leishmaniose cutânea experimental. p.9- 23, 2007. **Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental)**, Universidade Estadual de São Paulo, Disponível em: < www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/.pdfpdf >. Acesso em: 30 mar. 2016.

COSTA, L. FIDELIS, G. P; CORDEIRO, S. L; OLIVEIRA, R. M; SABRY, R; B. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomed. Pharmacother.** v.64, p.21–28, 2010.

COUTINHO, E. M. O. Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *solanum* (*solanaceae*), p.12-109 2009. **Dissertação (Mestre em Farmacêutica)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro Disponível em: < <http://objdig.ufrj.br/59/teses/725577.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2016.

CUNHA, C. P. Contribuição na investigação fitoquímica de *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) – Otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides. P. 12-48, 2013. **Dissertação (Mestre em Ciências)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em:<http://www.cromatografialiquida.com.br/Arquivos/Carolina_dissertacao.pdf>. Acesso em: 6 nov. 2016.

CUNNIGHAM, A. C Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v.72, n.2, p.132-141, April 2002.

CUPOLLILO, E.; GRIMALDI, J. G.; MONEN, H. Genetic Diversity in Natural of New world *leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, São Paulo-BR, n.93, p.633-668, 1998.

DA SILVA, M. F. L.; ZAMPIERI, R. A.; MUXEL, S. M.; BEVERLEY, S. M.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **Immunobiology**. v.7, n.34022, p.12-35, 2012.

DECHAKHAMPHU, A. WONGCHUM, N. Rastreo para Propriedades de Lipase Anti-Pancreática de 28 Ervas Medicinais Tailandesas Tradicionais, **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, v.5, n.12, p.1042-45. 2015.

DEGANI, A. L.G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v12., n.7, p.21-25, 1998.

- DEMARCHI, I. G. Atividade de anti-retrovirais sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *in vitro* e *in vivo*. p.11- 59, 2009. **Dissetação (Mestre em Patologia)**, Universidade Estadual de Maringá. Disponível em: < <http://www.sbmt.org.br/medtrop2016/leshmanioses/>>. Acesso em: 17 jul. 2016.
- DESJEUX, P. Leishmania: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**. v.27, p.305-318, 2004.
- DESSOY, M. A.; LUIZ C. D. E. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v.32, n.9, p.2444-2457, 2009.
- DI STASI, L. C. HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2. ed. **Rev. e Ampl.** - São Paulo: Editora UNESP, 2002.
- DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. UNESP, São Paulo, ed. 1 n.1, Cap.7-8, 1996.
- DI STASI, L.C. & HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora Universidade Estadual Paulista, 2. ed. São Paulo; p. 604-630; 2002.
- DINIZ, A. G. Resistência de *L. Braziliensis* e *L. Amazonensis* ao óxido nítrico e correlação com a doença. p. 20-50, 2004. **Dissertação (Mestrado em Patologia)**. Disponível em: < livros01.livrosgratis.com.br/cp103373.pdf>. Acesso em: 30 out. 2016.
- DOMINGUEZ, M.; MORENO, I.; LOPEZ, T. M. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. **J. Exp. Med.**v.3, n.195, p.451-459, 2002.
- DONG, M.W. **Modern HPLC for Practicing Scientists**. Wiley: New Jersey, 2006.
- DUWIEJUA, M.; Isolation of picopoligramain from the resin of *Bursera simaruba*. **Planta Medica**. v.59, n.s, p.10-35, 1993.
- FALCÃO, I. S.; VILAS-BOAS, M.; ESTEVINHO, M. L.; BARROS, C.; DOMINGUES, M. R. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.396, n.2, p.887-97, 2009.
- FELIZARDO, T. C.; Borges, N B; Toma, L S. *Leishmania (leishmania) amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes. **Parasitology**, v.134, n.12, p.1699-707, 2007.
- FERREIRA, A. E. N. Alta Exatidão em Espectrometria de Massa: da Composição Elementar à Anotação em Metabolômica. **Centro de Química e Bioquímica**, n.124, v.01 p.6-40, 2012.

FILARDI, M. A. Potencial antitumoral de extratos da própolis brasileira e de folhas de graviola (*annona muricata*): efeito citotóxico sobre células hepatocarcinogênicas HEPG₂. p. 18-59, 2010. **Dissertação (Mestre em Ciências)** - Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: < <http://repositorio.ufv.br/handle/123456789/2437>>. Acesso em: 3 dez. 2016.

FILHO, B. R; Phytochemical Contribution to Development of a Emergent Country, **Quim. Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana. p.6-40, 2013. **Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade Fernando Pessoa. Disponível em: <<http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3979/1/Projeto%20final.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2016.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS, A. A.; TORRES, O. S.; FUENTES, S. NAKAYAMA, H.; SCHININI, A. A. In vitro efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania amazonensis*. **Antimicrob agents chemoth**, v.40, n.1, p.2447-2451, 1996.

FUMAGALLI, M. A.C. proteção contra a infecção por *Leishmania (leishmania) amazonensis* pela imunização de camundongos Balb/c com peptídeos sintéticos selecionados por *phage display* e *spot synthesis*. p.2- 90, 2008. **Dissertação (Mestrado Ciências)** - Universidade Federal de Minas Gerais, Disponível em: < <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3979/1/Projeto%20final.pdf>>. Acesso em: 10 nov. de 2016.

FUNASA. Fundação nacional de saúde (2000). **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. p.1-62. Disponível em:<<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 8 mar.2016.

GARRIDO, I. P. F. Mecanismos redox e eletroanálise de fármacos: temozolomida, clioquinol, daidzeína e azo-derivados da isatina. Mestrado em Química, Coimbra, p.12-79, 2012. Disponível em: < https://estudogeral.sib.uc/bitstream/10316/20505/1/Tese%20Mestrado_Isabel%20Fernandes.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2016.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Parasitologia Humana**. São Paulo. 11^a ed. Atheneu, p.41-83, 2005.

GIGLIARELLI, G.; BECERRA, J. X.; CURINI, M.; MARCOTULLIO, M. C. Chemical composition and biological activities of fragrant Mexican copal (*Bursera* spp.). *Molecules*, v.20, p.22383-22394, 2015.

GIRALDO, M. C. R.; SUSUNAGA, C. M. S. Actividad Antimicrobiana presente en partes Aereas de las Especies *Bursera Simaoruba* y *Bursera Graveolens* (*Burseraceas*) frente a microorganismos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *erwinia Carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinerea*. p. 22-230, 2000. **Tese (Doutorado em Microbiologia)** - Universidade de Santa-fé de Bogotá,

Disponível em: < [www.javeriana.edu.co/gifuj/burseraceae _ F.pdf](http://www.javeriana.edu.co/gifuj/burseraceae_F.pdf)>. Acesso em: 21 jul. 2016.

GOMES, B. A.; Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste: *Cissus verticillata* L. (Vitaceae). p.14-47, 2012. **Dissertação (Mestre em Química)** - Universidade Federal do Ceará. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/10919> >. Acesso em: 11 mai. 2016.

GOMES, I. N., CALABRICH, A. F.; TAVARES R. S.; WIETZERBIN, J.; FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of cba/j mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of leishmania. **Microbes infect**, v.5, n.4, p.251-60, 2003.

GOMES-SILVA, A. Ativação de linfócitos remanescentes na infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: reflexões sobre prognóstico, critérios de cura e imunoprofilaxia na leishmaniose tegumentar Americana. p.20-104, 2011. **Tese (Doutorado em Medicina Tropical)** - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/10919> >. Acesso em: 3 jul. 2016.

GONZÁLEZ, U.; BECKER, I; SALAIZA, N. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. Geneva: **John Wiley & Sons**, n.1, ed.1°,p.2-80, 2008.

GRIMALDI Jr, G.; TESH, R. B. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 41, p. 687-725, 1993.

GU, J.; DING, G.; CHEN, N.; ZHANG, Z. Development and validation of a sensitive LC-MS-MS assay for the quantification of betulonic acid in rat plasma. **Journal of Chromatographic Science.** v.52, p.195-200, 2014.

GUIMARÃES, A.C.; SIANI, A.C. Triterpenos das folhas de *Protium strumosum*. **Revista Fitos**, v.3, n.01, 2007.

HAWLISCH, H.; BELKAID, Y.; BAELDER, R.; HILDEMAN, D. C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses. **Immunity**, v.22, p.415-426, 2005.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, v.169, n.1, p.59-72, 1989.

HUANG, X.; GUO, X.; LUO, H.; FANG, X.; ZHU, T.; ZHANG, X.; CHEN, H.; LUO, P. Fast Differential Analysis of Propolis Using Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. **International Journal of Analytical Chemistry**, v.9, p.1-10, 2015.

ISHIKAWA, E. A.Y.; SILVEIRA, A. F. T.; MAGALHÕES, L. P.; GUERRA, R. B. JR.; MELO, M. N.; GOMES, R.; SILVEIRA, T. G.; SHAWN, J. J. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v.96, p.111-121, 2002.

JACKSON, P.; ERMER, J. Quality by design in pharmaceutical analysis. **Workshop case study Barcelona, Spain**, 2015.

JACOBS, T.; ANDRA, J.; GAWORSKI, I.; GRAEFE, S.; MELLENTIN, K. Complement C3 is required for progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. *Med. Microbiol. Immunol.(Berl)*, v., n.194, p.140-149, 2005.

JING, Y. K., XIA, L. J.; CHEN, D.; HAN, R.; FAN, Q. C.; WAXMAN, S. Boswellic acid acetate induces apoptosis through caspase-mediated pathways in myeloid leukemia cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.4, n.3, p.381-388, 2005.

JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U. SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol**, n.165, p.364-372, 2000.

JOSEPH, M. J. A qualidade desde o projeto: novos passos para o planejamento da qualidade em produtos e serviços. **J. Pioneira**, p.3-60, 1994.

JÚNIOR, F. P.; ARAÚJO, V. F. Plantas da Amazônia para produção cosmética: uma abordagem química - 60 espécies do extrativismo florestal não-madeireiro da Amazônia / Floriano. **Projeto Non-Wood II – PD 31/99 REV. UNB. BRASÍLIA**, v.2, n.2, p.12-244, 2005.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their plays to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.**, v.1,n.7, p.25-31, 2000.

KANG, J. G.; HICK, L .A.; PRICE, W. E. A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MSn ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.21, v.6, p. 857-868, 2007.

KANGUSSU, M. M. M.. Avaliação de atividade Leishmanicida *In Vitro* de Heteropolissacarídeos Ácidos: Não sulfatados e naturalmente sulfatados. p.18 - 40, 2010. **Dissertação (Mestre em Biologia)** - Universidade Federal do Paraná Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/23268/Dissertacao%20Monica%20Marcolino.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 29 set. 2016.

KHALID, S. A. Chemistry of the *Burseraceae*. In: WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. (eds). **Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales**. London, Academic, 1983.

KONNO, C.; OSHIMA, Y.; HIKINO, H.; YANG, L.L.; YEN, K.Y. Antihepatotoxic principles of Liquidambar formosana fruits. **Planta Medica**, n.5, v.54, p.417-419, 1988.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phy. and ins. Prop. of essential oil isolated from Turkish Orig. Acut. and its three Comp., Carvacrol, Thymol and _-Cymene. **Bioresource Technology**, n.99, p. 89-94, 2008.

KRUMHAR, K. C. **Method for treatment of inflammation and pain in mammals**, U.S. Pat. No. 6,534,086,06 Mar. 2000 n.9, p.519-27.

KUNDU, J. K.; ROUF, A. S. S.; HOSSAIN, M. N.; HASAN, C.M.; RASHID, M.A. Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. **Fitoterapia**, v.71, p-577-579, 2000.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas, **Scientia Chromatographica**, v.5, n.1; p.27-46, 2013.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**. v.1, n.2, p.35-61, 2009.

LAUNOIS, P.; GUMY, A.; HIMMELRICH, H.; LOCKSLEY, R.M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J.A. Rapid IL-4 production by Leishmania homolog of mammalian RACK1-raeactive CD4+ T-cells in resistance mice treated once with anti-IL-12R or IFN- γ antibodies at the onset of infection with Leishmania major instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. **J. Immunol.**, v.1, n.168, p.4628-4635, 2002.

LEAL, J. M. Potencialização do efeito protetor e da memória imunológica pela utilização do adjuvante caf01 associado a antígenos totais de *leishmania amazonensis* (*laag*) pela via intranasal contra a l. visceral murina. p.12-47, 2014. **Dissertação (Mestre em Doenças Infecciosas)** - Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em:<<http://dspace2.ufes.br/handle/10/4578>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

LEITE, A. C.; NETO. A. P.; AMBROZIN P. A, R.; FERNANDES, J. B; VIEIRA, P. L. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. **Rev. Bras. Farmacogn**, n.1, v.20, p.1-80, 2010.

LEITE, G. L. D.; PICANÇO, M.; MARCELO; J. G. Fatores naturais que influenciam o ataque da mosca-branca em pimentão, **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.37, n.8, p.95-00, 2002.

LEUNG, H. W.; WU, C.; LIN, C.; LEE, H. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**. v.508, n.2, p.77– 83, 2005.

LI, G. L.; YOU, J. M.; SONG, C.H.; XIA, L.; ZHENG, J.; SUO, Y.R. Development of a new HPLC method with precolumn fluorescent derivatization for rapid, selective and sensitive detection of triterpenic acids in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, n.1, p.2972-2979, 2011.

LIAO, X.-L., LUO, J.-G., KONG, L. Y. Flavonoids from *Millettia nitida* var. *Hirsutissima* with their anticoagulative activities and inhibitory effects on no production. **Journal of Natural Medicines**. v.4, n.67, p.856-861, 2013.

LIMA, G. S. Estudo da atividade tripon. e *leishmanicida* de extrato, frações e terpenos de *Crotion Cajucara Berth*. p.02-18, 2014. **Dissertação (Mestre em**

ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://cursos.ufrj.br/posgraduacao/ppgctia/files/2015/03/DO-2014-Gerson-Lima.pdf> >. Acesso em: 4 jun. 2016.

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V. C.; SILVA, A. L. N. Inflammasome-derived IL-1[β] production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**. v.19, n.7, p.909-15, 2013.

LINDOSO, J.A.L.; COSTA, J.M.L.; GOTO, I.T.Q.H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v.3, n.2, p.69-77, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, A. F. J. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. **Nova Odessa. Instituto Plantarum**, p.512, 2002.

LÜ, H. T.; LIU, J.; DENG, R.; SONG, J. Y. Preparative Isolation and Purification of Indigo and Indirubin from *Folium isatidis* by High-speed Countercurrent Chromatography. **Phytochemical Analysis, Chichester**, v.1, n.2, p.10-60, 2012.

LUCUMI, A.; ROBLEDO, S.; GAMA, V. & SARAVIA, N. G. Sensitivity of *Leishmania (Viannia) panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.8, p.2-5, 1998.

LUIZE, P. S. TIUMAN. T. S. Effects of medical plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Ver. Bras. Cien. Farm.**, v.41, n.1, p.85-94, 2005.

LYRA, M. A. M. SANTOS, L. A.; ALVES, D. S. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.33 n.1, p.37-47, 2012.

MACHADO, P. R. L.; ARAUJO, M. I. A. S.; CARVALHO, S. CARVALHO, E. M. Mecanismo de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.79, n.6, p: 647-664, 2004.

MARTINY, A ; VANNIER, S. M. A; BORGES, V. M; MEYER, F. J. R; ASSREUY, J. CUNHA, S. A fosforilação da tirosina induzida pela leishmania no macrófago hospedeiro e sua implicação na infecção. **Eur J Cell Biol.** v.2, n.71, p.206-15, 1996.

MARZOCHI, M.C. MARZOCHI, K.B.; CARVALHO, R.W. Visceral *leishmaniasis* in rio de janeiro. **parasitology today.** v.10, n.3, p.34-37, 1994.

MCMURRAY, W. J. ROBERTS, W. L.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrob. Agents Chemother.** v.42, n.5, p.1076-1082, 1998.

MCNAB, H.; FERREIRA, H.; HULME, E. Negative ion ESI-MS analysis of natural yellow dye flavonoids-An isotopic labelling study. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.284, n.10, p.57-65, 2009.

MEDINA, G. L. C.; Determinación de La Actividad Antiinflamatoria de Los Extractos Totales y Fracciones Aisladas de *Bursera Simaruba* (*Burseraceae*). P.23-80, 2002. **Tese (Doutorado em Biología)** - Universidade de Santafé de Bogotá. Disponível em: < www.javeriana.edu.co/gifuj/BURSERACEAE_F.pdf>. Acesso em: 13 out. 2016.

MELECCHI, M. I. S.; Caracterização Química de Extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo Comparativo de métodos de Extração, p.15-150, 2005. **Tese (Doutorado em Química)** - Universidade de Porto Alegre, Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/6036> >. Acesso em: 29 out. 2016.

MELHEM, H. S.; AGUILAR-SIERRA, C. T. M. Morfologia polínica da tribo *canarieae* (*burseraceae*) na América do Sul. **Revista Brasil. Bot.** São Paulo, v.21, n.1, p.27-34, 1998.

MENDES, S. S. BOMFIM, P. R; JSEUS, H. C; ALVES, P. B. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Copenhagen, v.129, n.3, p.390-399, 2010.

MESA, M. E. S. PEÑARANDA, L. M. O. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Partes Aereas de las Especies *Bursera Simaruba* e *Bursera graveolens*, CONTRA Algunos Microorganismos Patogeno. p.4-30,2003. **Dissertação (Mestre em Microbiologia Industrial)** - Universidade de Bogotá. Disponível em: < www.javeriana.edu.co/gifuj/burseraceae_f.pdf>. Acesso em: 29 out. 2016.

MIRANDA, M. M. Atividade biológica do estrato hidroalcoólico de própolis verde sobre o crescimento *in vitro* de formas promastigotas de *leishmania amazonensis* e *leishmania braziliensis*. Mon. de esp. em biologia aplicada à saúde, londrina-pr, p.10-25, 2011. **Dissertação (Mestre em Parasitologia)** - Universidade Estadual de Londrina, Disponível em: <Biblioteca UEL >. Acesso em: 12 ago. 2016.

MISHRA, P.; HUMAR, A.; KHARE, P. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mhaba of piper betle in *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **J. Med. Microbiol**, v.58, n.2, p.1058-66, 2009.

MISKO T.P.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W.M.; CURRIE, M.G. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species. **Analytical Biochemistry**. v.11, p.214, 1993.

MORAES, M. M; Composição química do óleo essencial das folhas de duas espécies do gênero *Protium* (*Burseraceae*). IX **Jornada de Ensino, P. e Ex.; Nacional de Ciência e Tecnologia**, UFRPE, 2009.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO. Produtos Naturais estudos químicos e biológicos. Fortaleza: Ed. UECE, **Quím. Nova**, v.29, p.907-910, 2007.

MOTHANA R. A. A.; SIDGI, S. H. C.; WULF, A. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic *Soqotraen Boswellia* species, **Journal Food Chemistry**, v.1, n.126, p.1149–1154, 2011.

MUKHERJEE, P. K. Evidence-Based Validation of Herbal Medicine, School of Natural Product Studies, **Pharmaceutical Technology**, p.12-203, 2012.

MURPHY, R. C. Novos Desenvolvimentos em Espectrometria de Massa, In: Espectrometria de Massa em Tandem de Lipídios: Análise Molecular de Lipídios Complexos. Massachusetts: **Ed. Sociedade Real de Química**, p.1-30, 2015.

MURRAY, H. W.; TSAI, C. W.; LIU, J. M. X.. Responses to *Leishmania donovani* in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. **Infect. Immun**, n.74, p.4370-4377, 2006.

NAGEM, T. J; LEÃO, A, L.; SILVA, R. L.; OLIVEIRA, T. Efeito de Flavonóides no Metabolismo do Ácido Araquidônico, **Medicina, Ribeirão Preto**, v.1, n.1, p.127-133, 2002.

NINOSKA, F.; JIMÉNEZ, A. I.; GIMÉNEZ, A.; GUTIÉRREZ, D.; BOURDY, G.; BAZZOCCHI, I. L. Benzoic acid derivatives from Piper Species and their antiparasitic activity. **Journals Natural Products**, v.7, n. 9, p.1538–43, 2008.

NOVA, N. S. V. Alternativas fitoterápicas para o tratamento da leishmaniose. p.10 - 23, 2012. **Tese (Doutorado em Biologia Experimental)** - Universidade Estadual Do Ceara. Disponível em: < http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/NadjaVlanova_Tese.pdf >. Acesso em: 2 de jan. 2016.

NUNES, X. P.; MAIA, G. L. A.; ALMEIDA, JR. G. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Ant. activ. Of the ess. Oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n.1, p.42-44, 2006.

OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.C.; LIMA JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, n.2, p.103-108, 2005.

OLIVEIRA, F.Q. Bárbara, G; GUIMARÃES, C; BATISTA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, G. G.; Identificação dos Constituintes e Atividade Biológica do óleo essencial de *Trattinnickia burserifolia* Mart. (Burseraceae) da Serra do teperquém, amajari-Roraima, p.4-49, 2004. **Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas)**. Disponível em: < http://www.btdt.ufrr.br/tde_arquivos/1/TDE-2015-02-10T055009Z-214/Publico/GiseleGuimaraesdeOliveira.pdf>. Acesso em: 4 janeiro . 2017.

OLIVEIRA, V. M. A. CARNEIRO, A. L. B; CAUPER, G. S. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazônica**, v.39, p.973 – 980, 2009.

OLIVERIA, S. L. Estudo químico e biológico da madeira de lei *Hymenolobium petraeum* (Angelim pedra), p. 12-98, 2011. **Dissertação (Mestre em Química)** - Universidade de Pernambuco. Disponível em:< <http://repositorio.ufpe.br/xmlui/>

bitstream/handle/123456789/8126/arquivo4118_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 6 mar. 2016.

Organização Mundial de Saúde. *Leishmania*/HIV co-infection. Epidemiological analysis of 692 retrospective cases. **Wkly Epidemiol Rec, New York**, v.72, n.1, p.20-59, 2007.

ORLANDA, J. F. Estudo da Composição Química e Atividade Biológica do Óleo Essencial de *Ruta Graveolens* Linneau (Rutaceae). P.7-96, 2011. **Tese (Doutorado em Química)** - Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: < http://www.quimica.ufpb.br/posgrad/teses/Tese_Jose_Fabio.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2016.

ORTEGA, E. A. P. Contribucion al Estudio Fitoquimico De *Bursera simaruba* (L) *Sarg.* p.13-69. 2002. **Dissertação (Mestrado em Biologia)** - Universidade de Bogotá. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/pdf/556/55661207.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2016.

OZBILGE, H.; KAYA, E. G.; ALBAYRAK, S.; SILICI, S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri própolis, **Journal of Microbiology Research**. v.4, n.7, p.556-60, 2010.

PAVLOVA, N.; SAVINOVA, O.V. NIKOLAEVA, S. N.; BOREKO, E. I.; FLEKHTER, O. Antiviral activity of betulin, betulinic acid and betulonic acid against some enveloped and non-enveloped viruses. **Fitoterapia**, n.5, v.74, p.489-492, 2003.

PEIXOTO, S. M. Obtenção, caracterização e avaliação toxicológica de extrato seco padronizado à base de *Bauhinia forficata*, p.12-100, 2012. **Dissertação (Mestre em Farmacêutica)** - Universidade Federal de Pernambuco. Disponível em: < <http://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/10305>>. Acesso em: 27 out. 2016.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v.64, n.2, p.227-229, 2002.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: leishmania and regulatory t cells. **Immunological reviews**, v.1, n.213, p.159-179, 2006.

POLYA, G. **Alvos Bioquímicos da Usina Bioactive Compounds**. A Pharmacological Reference Guide to Sites Action And Biological Effects. ed.2, p. 454-589, 2003.

RABITO, M. F.; ALMEIDA, M. B.; MOREIRA, A. L.; IGLESIAS, A. H.; PAULA, F. SILVA, B. S.; DIÓGENES, A. C.; NIXDORF, S. L. FERREIRA, I. C. P. Development and Validation of a Method for Simultaneous Determination of Bioactive Compounds of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip, **J. Braz. Chem. Soc.**, v.25, n.10, p.1824-31, 2014.

RANGEL, E. T. Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma do Cerrado, com ênfase em *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. p.2-140, 2010. **Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)**. Disponível em: < http://repositorio.unb.br/10482/9124/1/2010_EllenTanusRangel.pdf> Acesso em: 7 out. 2016.

RASO, P. GENARO, O. Patologia das principais doenças tropicais do Brasil- Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Bogliolo Patologia**. 5ª. ED. v.1, Rio de Janeiro, 1994.

ROCHA, A. J. O Impacto Social das Doenças Negligenciadas no Brasil e no Mundo. **Mono Grad**. Med, Salvador, Bahia. v.1. p. 5-20, 2012.

RODRIGUES, I. V.; Lopes, N. P. Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*. p. 10- 47, 2014. **Tese (Doutorado em Ciências e Toxicologia)**. Disponível em: < http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-30102014145840/publico/Tese_corrigida_Simplificada_I.pdf >. Acesso em: 26 nov. 2016.

RODRIGUES, N. C. Estudo toxicológico pré-clínico agudo do extrato padronizado de própolis vermelha do Brasil. v.1, n.2, p.14-73, 2010. **Dissertação (Mestre em Farmácia)** - Universidade de União Bandeirantes. Disponível em: < docplayer.com.br/16271380-Uniban-brasil-naiara-carvalho-rodrigues-estudo-toxicol.. >. Acesso em: 23 Fev. 2016

RODRIGUES, P.M. Estudo Químico de folhas de *Pouteria r.* (Mart.) Radlk. (Sapotaceae): biomonitoramento por inibição da alfa-amilase. p.130, 2015. **Dissertação (Mestrado e Ciências da Saúde)** - Universidade de Brasília, Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/19526>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

ROZET, E. BOUABIDI, M. A.; BOUKLOUZE, A. M.; EL, B. M.; GUEZZAR, E. Z. Do Placebo Based Validation Standards Mimc Real Batch Products Behaviour. **J.Pharm. Biomed**. v.2, n.12,p.538-90, 2011.

RÜDIGER, A. L. Estudo fitoquímico e citotóxico de oleorresinas de Burseraceae, p.15-90, 2012. **Tese (Doutorado em Química)** - Universidade Federal do Alagoas. Disponível em: <[fTese%20-%20Andr%C3%A9%20Luis%20\(1\).pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-30102014145840/publico/Tese%20-%20Andr%C3%A9%20Luis%20(1).pdf)>. Acesso em: 20 abr. de 2016.

SACKS, D. KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions *in leishmaniasis*. **Annu Ver. Microbiol**, v. 55, n.2, p.453-483, 2001.

SALAZAR, U. J; PORCAR, R. C.; Chemical constituents of the leaves from *Trattinickia rhoifolia*, **Avances en Química**, v.5, n.2, p.63-65, 2010.

SAMPAIO, C. G. Estudo químico bioguiado das sementes de *Morinda citrifolia* Linn (NONI) e suas aplicações. p.24-89, 2010. **Dissertação (Mestrado em Química)** - Universidade Federal do Ceará. Disponível em: < <http://www.pgquim.ufc.br/wp-content/uploads/2011/11/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf> >. Acesso em: 30 dez. 2016.

SAPONARA, R.; BOSISIO, E. Inhibition of rat adipocyte cAMP phosphodiesterase by biflavones of *Ginkgo biloba* L. **J. Nat. Prod.**, v.2, n.61, p.98-00, 1998.

SATIRAPHAN, M.; Phytochemical screening of two Thai tropical rainforest dipterocarps: *Hopea odorata* roxb. and *Dipterocarpus costatus* gaertn.f. p.322, 2012. **Tese (Doctored em Pharmacia)** - Universidad René Descartes, Paris, Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/ppgcf/>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*, **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v.43, n.2, p.2-15, 2007.

SILVA, A. P. D. Caracterização de Metabólitos não Voláteis da Cana-de-Açúcar. p.56-100, 2012^a. **Dissertação (Mestre em Química)** - Universidade de Araraquara.. Disponível em: < http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97965/silva_apd_me_araiq.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12 mar. 2016.

SILVA, C. A.; WANASEN, S.; BOGDAN, R. *Leishmania* spp. has been described as numerous escape mechanisms instance, it can reduce NO production in macrophages by increasing the expression of arginase, which catalyzed the cleavage of L-arginine. **Clin Microbiol Rev**. v.18, n.2, p.293–5, 2005.

SILVA, G. A. F. Evolução pós-tratamento de pacientes infectados por duas espécies de leishmania do subgênero *viannia*: *L. braziliensis* e *L. naiff*. **Ts. Dr. Ins. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.1, v.1, p.24-30, 2015b.

SILVA, G. A. F.; CAVALHEIRO, M. C.; BARRETO, M. R. F. Efeito da apigenina sobre a *Leishmania amazonensis* está associada à produção reativa de espécies de oxigênio seguidas por disfunção mitocondrial. **Nat Prod**. n. 24, v.78, p.880-4, 2015a.

SILVA, K. R.; ROBERTO C; RACHED, R. B; FILHO, F. M. Warfarin prevents venous obstruction after cardiac devices implantation in high-risk patients: partial analysis. **Ver. Bras Cir Cardiovasc**, v.23, n.4, p.542-9, 2008.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.12-29, 2012b.

SILVA, S. S. Atividade Leishmanicida e Imunomoduladora da Própolis Brasileira. **Dissertação (Pós Graduação em Patologia)** - Universidade Estadual de Londrina. p.10-30, 2012c. Disponível em: < Biblioteca UEL>. Acesso em: 15 out. 2016.

SIMS, J. E. GIRI, J. G.; E DOWER, S. K; The two *interleukin-1* receptors play different roles in il-1 action. **Clin. Immunol immunopathol**, v.02, n.72, p.9-14, 1994.

SIQUEIRA, D. S.; PEREIRA, A. S.; NETO, F. R. A.; CABRAL, J. A. Determination of high molecular mass compounds from Amazonian plant's leaves, **Quím. Nova**, v.26, n.5, p. 6-34. 2003.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3^a ed. p.960. Wiley, 2009.

SOARES, B. R. J. LEON, L.; GENSTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moleculares intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.139-149, 2004.

SOARES, J. M. B. G. Caracterização e estudo imunológico de uma nova proteína de *Leishmania*. **Dissertação (Mestrado Aveiro)**, Portugal, p.06-53, 2006. Disponível em: < <http://www.ua.pt/qopna/PageText.aspx?id=19507> >. Acesso em: 2 jul. 2016.

SOLBACH, W; LASKY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Adv. Immunol**, v.74, n.2, p.275 - 317, 2000.

SOLON, S. G. L. Qualidade analítica baseada no projeto como ferramenta de desenvolvimento de métodos em cromatografia líquida de ultra eficiência. cap. 01, p.12-120, 2016. **Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicina)** Universidade do Rio Grande do Norte. Disponível em: < [liliangracedasilvasolon_tese.pdf](#) >. Acesso em: 12 out. 2016.

STALMACH, A.; MULLEN, W.; NAGAI, CHIFUMI. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. **Braz. J. Plant Physiol**. n.18 v.1, p.253-62, 2006.

TAKAHASHIA, J. A.; RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. R.; GRÁCIA D. F.; SILVA, M. O.; SIMÕES, B. L.; MATILDESA, G.; THAISA, H. S.; MARIA A. G.; SIDNEY In vitro leishmanicidal activity of some scarce natural products. **Phytother Res**. n.18, v.7, p. 573-8, 2004.

TAKAHASHIA, J. A.; RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. R.; GRÁCIA D. F.; SILVA, M. O.; SIMÕES, B. L.; MATILDESA, G.; THAISA, H. S.; MARIA A. G.; SIDNEY A. V. F. *Salacia Crassifolia (Celastraceae)*: Chemical Constituents and Antimicrobial Activity. **Quim. Nova**, v.38, n. 2, p. 237-242, 2015.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, L.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies, **Antimicrob agents chemother**, v.4, n.50, p.1352–64, 2006.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE, Jr, H. F.; GUALDA, C. A.; YOGI, A. CARVALHO; C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. **Phytomedine**, v.12, n.2, p. 382-390, 2005.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v.19, n.1, p.641-644, 2003.

TRIPATHI, P. SINGH, V. NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.51, n.2, p.229-242, 2007.

TRUDIĆ, B.; ANDELKOVIĆ, B.; ORLOVIĆ, S.; TESEVIĆ, V.; PILIPOVIĆ, A.; CVETKOVIĆ, M., STANKOVIĆ, J. HPLC/MS-TOF Analysis of Surface Resins from

Three Poplar Clones Grown in Serbia, **Original Scientific Paper**, v.16, n.2, p.129-133, 2016.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V.. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxyl substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v.1, n.12, p.593-606, 2007.

TUON, F. F. B. Identificação e quantificação da expressão de receptores toll-like 2, 4 e 9 na leishmaniose cutânea humana, p.8-20, 2011. **Tese (Doutorado Medicina Tropical)** - Faculdade de Medicina de São Paulo. Disponível em: <file:///c:/users/andrade/downloads/felipefranciscobondantuon%20(1).pdf >. Acesso em: 27 ago. 2016.

TUON, F. F.; AMATO, V. S.; FLOETER, W. L.M.; ZAMPIERI R. A. Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids-fist report. **Int. J. Dermatol**, v.2, n.46, p.628-630, 2007.

VALENZUELA-BARRA, G.; CASTRO, C.; FIGUEROA, C.; BARRIGA, A. XIMENA, S.; HERAS D, B.; HORTELANO, S.; DELPORTE, H. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile, **Journal of Ethnopharmacology**, v.168, n.1, p. 35–44, 2015.

VELASQUEZ, L. G. Efeitos da resposta imune no curso da infecção de Balb/c, BALB/c nude e C57BL/6 e na ex. de proteínas específicas em formas amastigotas de *L. amazonensis* isolados de BALB/c e BALB/c nude. n.1, p.21- 43, 2014. **Tese (Doutorado em Biologia e Patógeno)** - Universidade do Estado de São Paulo. Disponível em: <btdtd.ibict.br/vufind/record/usp_99bb7 b953de6 7167c0 ed9c8517eb4c44>, acesso em: 27 ago. 2016.

VERPOORT, R. The role of secondary metabolites as leads in drug development. DDT, **Exploration of Nature's Chemodiversity**. v.3, n.5, p.2-40, 1998.

VILELA, E. C.; Influência ambiental, especial e genética na composição química dos óleos essenciais de *eugenia dysenterica* dc (myrtaceae). p.20-56, 2014. **Tese (Doutorado em Química)** - Instituto de Química de Goiânia. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/3007/5/tese_eliane.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2016.

VIOLANTE, I. M. P. LIDILHONE, H.; GARCEZ, W. S. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, SÃO PAULO, v.43, n.4, p.1302-8, 2012.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against Leishmania infection. **Immunol Res**. v.41, n.2, p.15-25, 2008.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N.G. Natural history, clinical evolution, and the host parasite interaction in the new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol**. v.1, n.1, p.433-450; 1996.

WHO; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis, **WHO Technical Report Series**. p.11-2011, 2011.

YANG, H. H.; SON, J. K.; JUNG, B.; ZHENG, M.; KIM, J.R. Epifriedelanol from the root bark of *Ulmus davidiana* inhibits cellular senescence in human primary cells. **Plant. Med.**, v.77, n.2, p. 441-449, 2011.

YE, M.; YANG, W. Z.; LIU, K. D.; QIAO, X.; LI, B. J.; CHENG, J. FENG, J. Caracterização de Flavonóides Em *Millettia Nitida* Var *.Hirsutissima* por HPLC / DAD / ESI-MS. **Jornal de Análise Farmacêutica**, v.2, n.1, p.35-42, 2012.

YOSHIMURA, T.; TAKEDA, A.; HAMANO, S.; MIYAZAKI, Y.; KINJYO, I; ISHIBASHI, T.; YOSHIMURA, A.; YOSHIDA, H. Two-sided roles of *il-27*: induction of th1 differentiation on naive cd4+ t cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including il- 23-induced il-17 on activated Cd4+ t cells partially through stat3-dependent mechanism. **J Immunol**, v.1, n.177, p.5377-85, 2006.

YU, L. X. LIU, K. D.; QIAO, X.; LI, B. J.; CHENG, J. FENG, Review article understanding pharmaceutical Quality By Design. **PMC Journals** v.16, n.4, p.1-29, 2014.

ZAZHI, Z. Z; Chemical constituents of isoflavones from vine stems of *Millettia nitita* var. *Hirsutissima*. **Scopus, Documen Details**; v. 32, p.321-322, 2007.

ZOCOLO, G. J. Ocorrência de isoflavonas de soja no ambiente e correlação com atividade estrogênica: estudo de caso da região de dourados (MS). p.12-96, 2010. **Tese (Doutorado em Química)** - Universidade de Araraquara. Disponível em: < http://repositorio.unesp/zocolo_gj_dr_araiq.pdf?sequence=1>. Acesso em: 07 jan. 2016.

ZOU, X. Q.; PENG, S. M.; HU, C. P.; TAN, L. H.; DENG, M. H. Furoxan nitric oxide donor coupled chrysin derivatives: Synthesis and vasculoprotection, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p.1222–26, 2011.