

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

NADJA SOARES VILA NOVA

AÇÃO LEISHMANICIDA DE ALCALÓIDES E ACETOGENINAS
EXTRAÍDAS DE ANNONACEAE DO ESTADO DE CEARÁ

FORTALEZA-CE
2008

NADJA SOARES VILA NOVA

AÇÃO LEISHMANICIDA DE ALCALÓIDES E ACETOGENINAS
EXTRAÍDAS DE ANNONACEAE DO ESTADO DE CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa.Dra.: Selene Maia de Moraes

FORTALEZA-CE
2008

NADJA SOARES VILA NOVA

AÇÃO LEISHMANICIDA DE ALCALÓIDES E ACETOGENINAS
EXTRAÍDAS DE ANNONACEAE DO ESTADO DE CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Selene Maia de Moraes
Orientadora – UECE

Claudia Maria Leal Bevilaqua
Examinadora-UFC

Heitor Franco de Andrade Jr
Examinador-USP

DEDICATÓRIA

**A todos que acreditaram em mim e tinham certeza que era capaz,
até quando eu mesma duvidei.**

AGRADECIMENTOS

Obrigada a todos os funcionários e servidores da Universidade Estadual do Ceará. Universidade Federal do Rio Grande do Norte e Universidade de São Paulo, sem estes o processo de desenvolvimento deste trabalho seria impossível.

A professora orientadora Selene Maia de Moraes pelo tempo e paciência que teve comigo e para toda equipe do Laboratório de Produtos Naturais que trabalharam unidos para o desenvolvimento deste estudo. A professora Cláudia Bevilaqua pelo tempo e paciência que me disponibilizou.

As Dra. Selma M. B. Jerônimo, Dra. Daniella R. A. Martins and Dra. Gloria R. G. Monteiro por terem permitido a minha entrada no laboratório de biquímica da UFRN, o aprendizado adquirido será indispensável para toda a minha vida acadêmica. Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Jr., não tenho palavras para agradecer as horas de ensinamento, a paciência e a dedicação que demonstrou todas as vezes que precisei.

Minha família, meus pais Nadir e Jarbas Vila Nova por me empurrarem para buscar o conhecimento sempre mais e por me apoiarem mesmo que a distância. Meus irmãos Alexandre e Helena Maria que me aturam e me escutam mesmo não entendendo o que digo.

Minha querida Tia Zuila, meus primos Marcus Vinicius e Zuila e toda a família Carvalho, que foram e são maravilhosos comigo e me acolheram como se eu fosse realmente da família

Ao amor da vida Matheus Wagner, obrigada por existir e estar ao meu lado, por calar quando gritei, por me acalmar, por me amar.

A Deus que me levou em seus braços quando não pude andar.

A minhas amigas Marianna, Romena, Rosângela que torcem por mim a distância. As minhas amigas que conheci em Fortaleza e foram importantes neste período Iara Tercia, Iara Roberto, Darlete, Rafaela, Marina, Bruna, Marcela, Natalie e todas as outras, pelos momentos de descontração e risadas. A minha querida IC Lyeghyna Karla pelas horas e dias que dedicou a este trabalho minha eterna gratidão. A Fernanda Rondon que ajudou com muita competência na correção deste trabalho

Obrigada a todos que acreditaram em mim e de uma forma ou de outra me ajudaram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

Leishmanose é uma doença causada por pelo menos 17 espécies de um protozoário do gênero *Leishmania*. As formas da doença estão relacionadas à espécie do parasito, e diferem em distribuição geográfica, hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade. A quimioterapia utilizada no tratamento da leishmaniose não é satisfatório em termos de efetividade e toxicidade, a resistência a drogas já existentes e a sensibilidade de diferentes cepas a estas drogas também dificultam o tratamento. Na tentativa de encontrar novos agentes com ação leishmanicida, as plantas têm sido investigadas. Vegetais produtores de alcalóides e acetogeninas vêm mostrando estudos promissores com resultados contra protozoários; entre estas se destaca-se a família Annonacea. Alguns metabólitos secundários encontrados em plantas vêm sendo estudados no tratamento de doenças parasitárias, incluindo alcalóides e acetogeninas presentes em plantas da família das Annonaceae. Espécies de Annonaceae como *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. vêm sendo estudadas na busca de novos compostos leishmanicidas em todo mundo e o resultados destes estudos vem se mostrando bastante promissores. Assim este estudo teve como objetivo procurar novos metabólitos com atividade leishmanicida a partir de extratos de *A. squamosa* e *A. muricata*. Para este estudo foi feito testes in vitro com as formas promastigotas e amastigotas de *leishmania chagasi*, utilizou-se o método colorimétrico MTT para avaliação da efetividade dos extratos contra promastigotas e o método de ELISA in situ para a avaliação contra amastigotas. Nos resultados observou-se que o extrato metanólico contendo acetogeninas e alcalóides das *A. squomosa* com a CE₅₀ de 26,43 µg/ml, seguindo pelo extrato metanólico contendo acetogeninas extraída das sementes de *A. muricata* CE₅₀54,93 µg/ml e do no extrato contendo alcalóides das folhas de *A. squomosa* CE₅₀73,31 µg/ml, a pentamidina utilizada como droga referência no controle possui uma CE₅₀ de 1,63 µg/ml. Neste estudo apenas o extrato bruto das semente de *A. muricata* mostrou efeito significativo contra a forma intracelular amastigota, reduzindo o parasita em 11,11% na dose de 100 µg/ml. A droga padrão usada no controle Glucantime reduzindo a carga parasitária em 12% na dose de 30 µg/ml e em 100% na dose de 300 µg/ml.

Palavras Chave: Leishmaniose, acetogeninas, alcalóides, *Annona squamosa*, *Annona muricata*

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by at least 17 species of a protozoan of the genus *Leishmania*. The forms of the disease are related to species of the parasite, and differ in geographical distribution, hosts and vectors involved, the incidence and mortality. The chemotherapy used to treat leishmaniasis is not satisfactory in terms of effectiveness and toxicity, the resistance to existing drugs and sensitivity of different strains to these drugs also hamper the treatment. In an attempt to find new agents with leishmanicidal action, the plants have been investigated. Vegetable producers of alkaloids and acetogenins studies are showing promising results with against protozoa; stands out among these is the family Annonaceae. Some secondary metabolites found in plants have been studied for the treatment of parasitic diseases, including acetogenins and alkaloids present in plants of the family of Annonaceae. Species of Annonaceae as *Annona squamosa* L. and *Annona muricata* L. have been studied in the search for new leishmanicidal compounds worldwide and the results of these studies has been showing very promising. Therefore this study aimed to seek new metabolites with leishmanicida activity from extracts of *A. squamosa* and *A. muricata*. For this study was done *in vitro* tests with the forms promastigote and amastigote of *Leishmania chagasi*, using the MTT colorimetric method for evaluating the effectiveness of the extracts against promastigotes and the method leishmania in situ for evaluation against amastigotes. The results we observed the methanolic extract containing acetogenins and alkaloids of *A. squamosa* with EC₅₀ 26.43 µg / ml, following the methanolic extract containing acetogenins extracted from the seeds of *A. muricata* EC₅₀ 54, 93 µg / ml and the extract rich in alkaloids from the leaves of *A. squomosa* EC₅₀ 73, 31 µg / ml, the pentamidine used as reference in controlling drug has a EC50 of 1.63 µg / ml. In this study only the crude extract of the seeds of *A. muricata* showed significant effect against intracellular amastigote form, reducing the parasite burden at 11.11% at a dose of 100 µg / ml. The standard drug used was Glucantime reducing burdens by 12% in the dose of 30 µg / ml and 100% at the dose of 300 µg / ml.

Keywords: Leishmaniasis, acetogenins, alkaloids, *Annona squamosa*, *Annona muricata*

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Classificação taxonômica da <i>Leishmania</i> sp.....	13
Figura 2 Flebótomo transmissor da Leishmaniose <i>Lu. Longipalpis</i>	15
Figura 3 . Forma amastigota de <i>L. chagasi</i>	16
Figura 4 Forma promastigota de <i>L. chagasi</i>	17
Figura 5 Ciclo de Vida da <i>Leishmania</i>	18
Figura 6 Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil entre 1984 a 2003.....	20
Figura 7 Casos de LV por Unidade Federativa entre os anos de 1984 a 2002.....	20
Figura 8 Casos de incidência e confirmados de LV no estado do Ceará entre os anos de 1986 a 2006.....	21
Figura 9 Antimoniato de N-metilglucamina.....	24
Figura 10 Isetionato de Pentamidina.....	25
Figura 11 Anfotericina B.....	26
Figura 12 Estrutura molecular da miltefusina.....	26
Figura 13 <i>Annona muricata</i>	29
Figura 14 <i>Annona squamosa</i>	31
Figura 15 Acetogenina anti-helmíntica isolada das sementes de <i>A. squamosa</i>	32
Figura 16 Acetogeninas isoladas da <i>A. squamosa</i>	33
Figura 17 Acetogeninas isoladas da <i>A. muricata</i>	34
Figura 18 Estrutura química da piperina.....	35
Figura 19 Estrutura química de alcalóides da família Annonaceae.....	36
Figura 20 Estrutura química de alcalóides bisbenzilisquinolinicos leishmanicidas	37
Figura 21 Estrutura química do O-methylarmepavine.....	37
 CAPÍTULO I	
Fig. I - Chemical structure of compounds from <i>A. squamosa</i> leaves present in leishmanicidal extracts, <i>O</i> -methylarmepavine (1) and acetogenins (2).....	57
Fig II- Determination of the EC ₅₀ value of <i>A. squamosa</i> extracts against <i>L. chagasi</i> promastigote	58
Fig III- Determination of the EC ₅₀ value of <i>A. muricata</i> methanolic extracts against <i>L. chagasi</i> promastigote	59

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 Classificação e caracterização das plantas utilizadas nesta Dissertação.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WHO	Worl Health Organization
OMS	Organização Mundial de Saúde
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LT	Leishmaniose Tegumentar
MAC	Complemento de Ataque a Membrana
LPG	Lipofosfoglicanos
PH	Potencial Hidrogênio Iônico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
GIPL	Glico-inositol-fosfolípide
ON	Óxido Nítrico
NK	Células Natural Killer
ATP	Trifosfato de adenosina
GTP	Guanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
THF	Mono-tetrahidrofurano
EC₅₀	Concentração Efetiva
μl	Microlitros
μM	Micromolar
ml	Mililitros
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
g	Gramma
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
α	Alfa
β	Beta
%	Porcentagem
Há	Hectare
K⁺	Potássio

SUMÁRIO

	Pág
1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	13
2.1 Leishmaniose.....	13
2.1.1 Ciclo de Vida.....	15
2.1.2 Reservatório.....	18
2.1.3 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos.....	19
2.1.4 Controle.....	22
2.1.5 Tratamento.....	22
2.2 Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose.....	24
2.2.1 Compostos Antimoniais.....	24
2.2.2 Pentamidina.....	25
2.2.3 Anfotericina B.....	25
2.2.4 Miltefosina	26
2.3 Uso de Plantas Medicinais.....	27
2.3.1 Família Annonaceae.....	29
2.3.1.1 <i>Annona Muricata</i>	29
2.3.1.2 <i>Annona Squamosa</i>	30
2.4 Acetogeninas	32
2.5 Alcalóides.....	35
3. Justificativa.....	40
4. Hipótese Científica.....	41
5. Objetivos.....	42
5.1 Gerais.....	42
5.2 Específicos.....	42
Capítulo I.....	43
Conclusão.....	60
Perspectiva.....	61
Referências Bibliográficas.....	62

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são zoonoses na qual a principal forma de transmissão do parasito para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 88 países são afetados, compreendendo uma prevalência de 12 milhões de pessoas infectadas, e com uma incidência de 500 mil pessoas por ano (WHO, 2008). O gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas, existindo 350 espécies catalogadas, distribuídas desde o sul do Canadá até o norte da Argentina. Destas, pelo menos 200 ocorrem na bacia amazônica (GILL et al., 2003). A forma visceral causada pela *Leishmania chagasi* e transmitida pelo flebótomo *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é mais diagnosticada no Brasil (GONTIJO & MELO, 2004).

A quimioterapia utilizada no tratamento da leishmaniose visceral em humanos é baseada na utilização medicamentos que possuem metais pesados tóxicos, conhecidos como antimoniato, entre eles os mais usados são o antimoniato de meglumine (Glucantime®) e o stibogluconato de sódio (Pentostan®). Quando este tipo de tratamento não é efetivo, outros medicamentos como Pentamidina e Anfotericina B também são utilizados. Todos esses medicamentos são de administração injetável e requerem supervisão clínica ou hospitalização devido a severidade dos efeitos colaterais (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001). Assim o tratamento da leishmaniose visceral não é satisfatório em termos de efetividade e toxicidade, a resistência a drogas já existentes e a sensibilidade de diferentes cepas às drogas existentes também dificultam o tratamento (OSÓRIO et al, 2007). O tratamento de cães não é uma medida recomendada, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito e não proporciona a cura para este (SESSA et al, 1994; ALVES & BEVILACQUA, 2004).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA Jr. et al, 2005). Plantas que são usadas tradicionalmente para o tratamento de doenças causadas por protozoários com fitoterapia, vem recebendo considerável atenção em pesquisas na procura de atividade antiparasitária

(TEMPONE et al, 2005), onde os extratos e derivados de plantas podem prover uma imensa fonte de agentes medicinais (ROCHA et al, 2005).

Na tentativa de encontrar novos agentes com ação leishmanicida, as plantas tem sido investigadas, já que produzem compostos contra patógenos oriundos do meio ambiente. Plantas produtoras de alcalóides e acetogeninas vem mostrando estudos promissores com resultados contra protozoários; entre estas destacam-se as da família Annonaceae (ROCHA et al, 2005). Os vegetais desta família possuem boas possibilidades na procura de novos agentes com potencial para o tratamento da Leishmaniose Visceral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

A *Leishmania* foi inicialmente identificada pelo Major W.B. Leishman, professor de patologia da Royal Army Medical College, que fica em Londres, Inglaterra. Ele descreveu um caso de um jovem militar inglês que havia regressado de Dum-Dum na Índia. O paciente demonstrava sintomas semelhantes a outros que Leishman observou. Estes pacientes apresentavam febre intermitente, anemia grave, atrofia muscular e esplenomegalia. A doença progrediu durante 7 meses e o paciente morreu, na autópsia constatou-se um aumento excessivo do baço e no exame histológico observaram-se microorganismos redondos ou ovais, com um núcleo redondo. Características das formas amastigotas de *Leishmania* (GILLESPIE E PEARSON, 2001)

Leishmaniose é uma doença causada por pelo menos 17 espécies (Figura 1) de um protozoário do gênero *Leishmania* (CROFT E COOMBS, 2003).

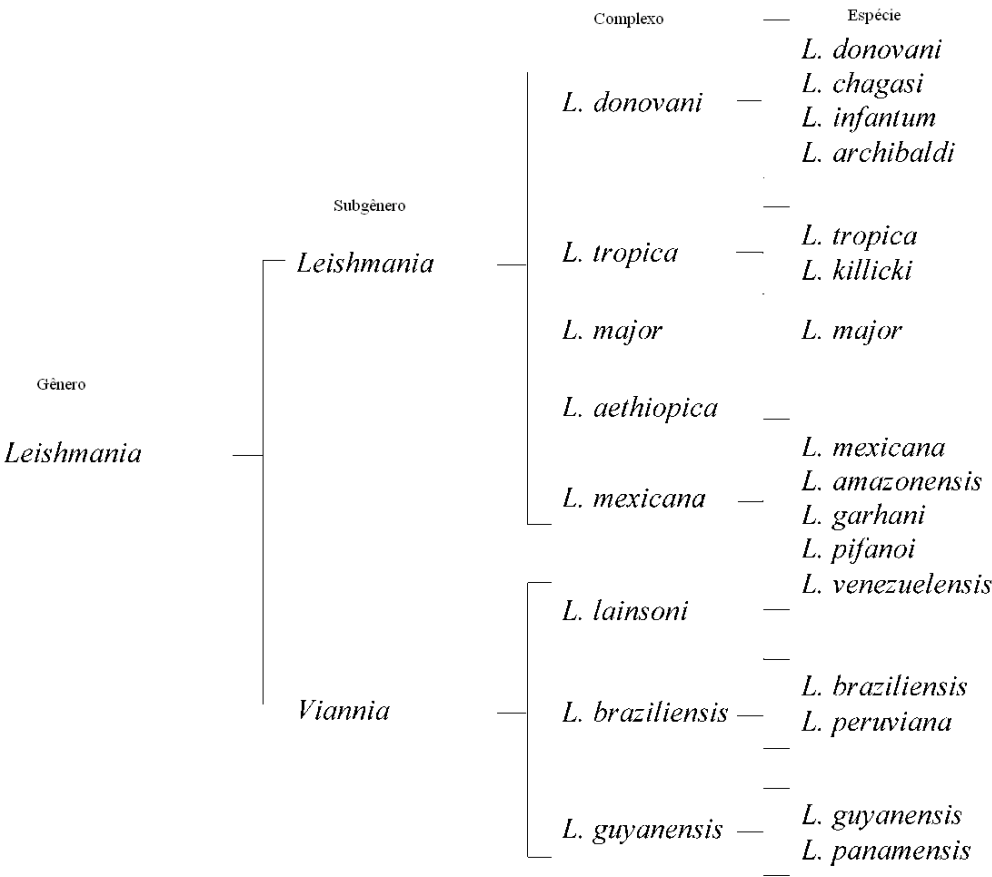


Figura 1. Classificação taxonômica da *Leishmania* sp.

Fonte: Gillespie e Person, 2001

É primariamente considerada como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose (WHO, 2008).

Como em outras doenças tropicais as leishmanioses estão relacionadas ao desenvolvimento econômico e a mudanças ambientais humanas que promovem a exposição de hospedeiros susceptíveis aos insetos vetores infectados (WHO, 2008). Embora as leishmanioses sejam consideradas doenças rurais, o recente aparecimento destas enfermidades em grandes centros urbanos e a re-emergência em várias cidades do mundo representa um problema de saúde pública emergente (ASHFORD, 2000).

As formas da doença diferem de acordo com a espécie do parasito, a distribuição geográfica, tipos de hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade (ASHFORD et al, 1992). Quanto às características clínicas e à relação parasito-hospedeiro, este complexo pode ser dividido basicamente em duas doenças distintas: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT). Dentre os 88 países acometidos pelas Leishmanioses, seis merecem atenção especial por representarem cerca de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral - Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Sudão e Venezuela (WHO, 2008).

A forma clínica visceral é causada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infatum* no velho mundo, atingindo partes do continente asiático, africano e europeu. No novo mundo, a *Leishmania (L.) chagasi* é o principal agente etiológico da LV (GRAMICCIA & GRADONI, 2005).

Este parasito possui um tropismo tecidual, esta estabelecendo-se primariamente, em órgãos viscerais como o fígado e baço, bem como na medula óssea de mamíferos. Já a doença ativa, conhecida como leishmaniose visceral ou calazar. Esta é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, com sua forma clássica caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo levando à caquexia e, até mesmo, ao óbito se o paciente não for submetido ao tratamento específico. A lesão primária na pele é raramente observada e uma porcentagem substancial de infecções parecem ser assintomáticas ou auto-resolutivas (JAFFE & GREENBLAT, 1991). As formas clínicas são diversas, podendo o indivíduo apresentar desde cura espontânea, formas oligo e assintomáticas, até manifestações graves (BASANO & CAMARGO, 2004).

O diagnóstico pode ser baseado nos achados clínicos e na demonstração do parasito em aspirados de medula óssea ou de baço. A especificidade deste método é de 100%, porém a sensibilidade é muito variável, pois a distribuição dos parasitas não é homogênea no mesmo

tecido. A sensibilidade mais alta (98%) é alcançada quando se utiliza aspirado do baço (GONTIJO E MELO, 2004).

Quando não se consegue demonstrar o parasito, opta-se pelas técnicas de detecção de anticorpos específicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA). Os testes tem limitações, podem permanecer positivos durante longo tempo após o tratamento em casos humanos, não permitindo avaliação do efeito da terapia e podendo ocorrer reações cruzadas com outras doenças (como na doença de chagas e leishmaniose cutânea). Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas em relação ao grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de especificidade e sensibilidade (GONTIJO & MELO, 2004).

Apesar de serem conhecidas há muito tempo e dos inúmeros estudos voltados ao seu entendimento, as leishmanioses são consideradas, ainda, doenças emergentes e sem controle – doença de categoria I – cujo foco das pesquisas deve ser a aquisição de novos conhecimentos e de medidas eficazes de controle (WHO, 2008)

2.1.1 Ciclo de vida

O principal parasita causador da LV no Brasil e na maioria dos países da América Latina é a *L. chagasi*. Os vetores são flebótomos hematófagos, do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. No novo mundo a espécie mais comum é a *Lutzomyia longipalpis* (Figura 2) conhecida popularmente como mosquito da terra, mosquito palha, birigui entre outros (GAMA et al, 1998; BASANO E CAMARGO, 2004).



Figura 2. *Lu. longipalpis* flebótomo transmissor da Leishmaniose

Fonte: <http://faculty.vetmed.ucdavis.edu/faculty/gclanzaro/lab/images/sandflybylanzaro.jpg>

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas (Figura 3) da *Leishmânia* (GONTIJO E MELO, 2004).

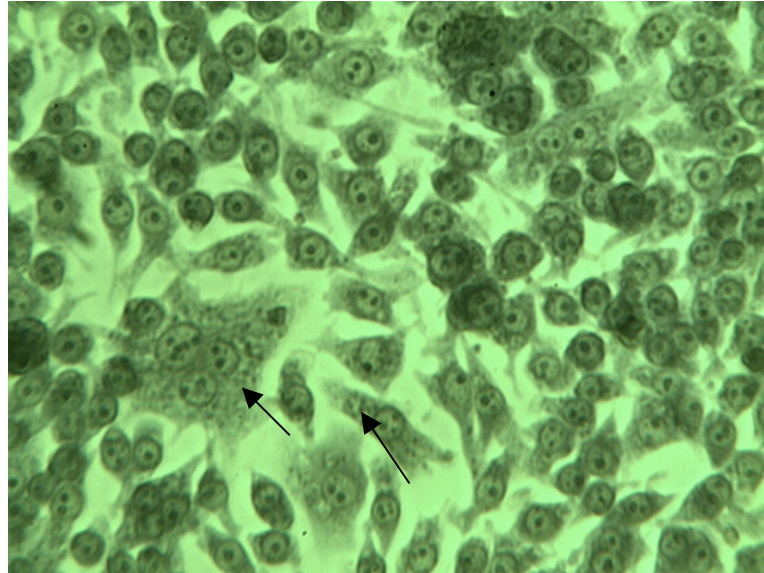


Figura 3. Forma amastigota de *L. chagasi*
Fonte: Vila-Nova, 2008

No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas (Figura 4), que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas (GILLESPIE E PEARSON, 2001).

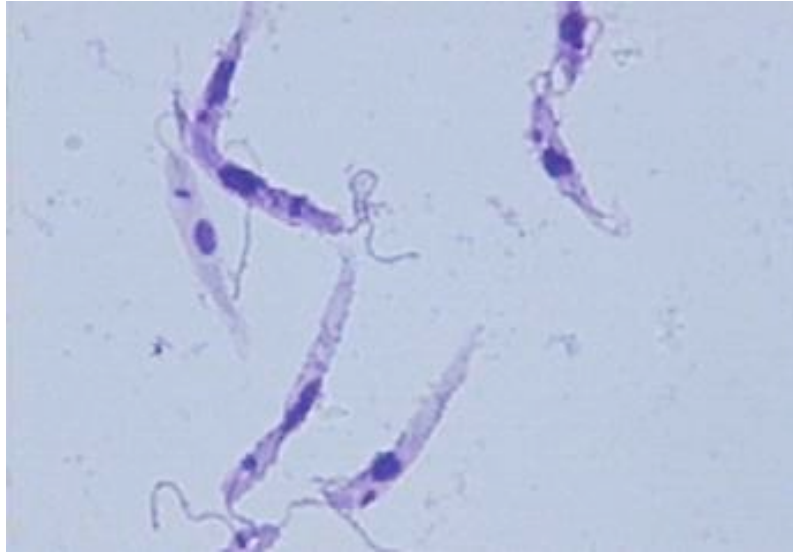


Figura 4. Forma promastigota de *L. chagasi*

Fonte: www.fcfrp.usp.br

O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantas de *Lu. longipalpis* (Figura 5) ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro mamífero liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

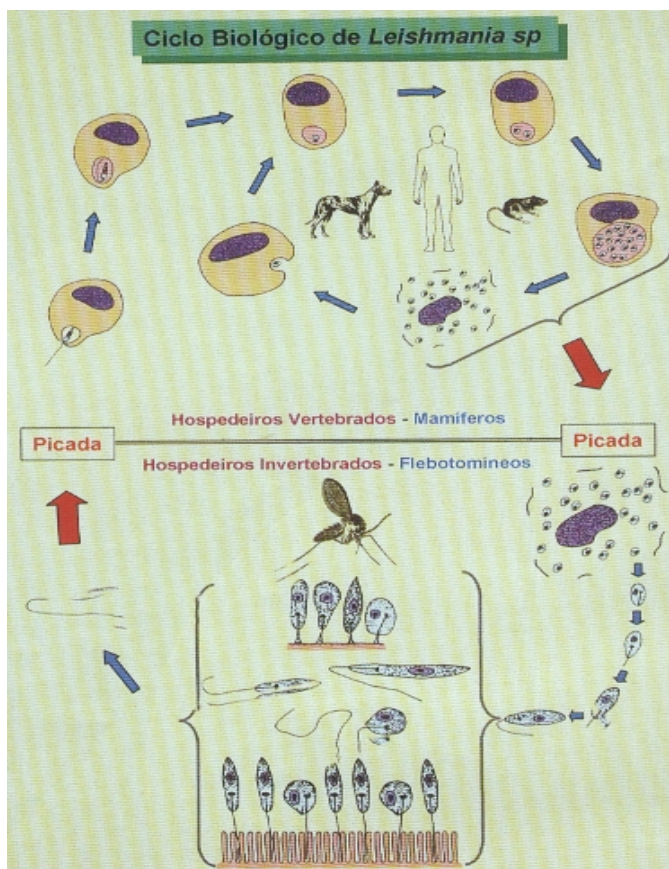


Figura 5. Ciclo de Vida da *Leishmania*

Fonte: www.sucen.sp.gov.br

2.1.2 Reservatórios

No ciclo silvestre da *L. chagasi*, as raposas *Cercopithecus thous*, no nordeste do Brasil (DEANE & DEANE, 1962), e *Dusicyon vetulus* na região norte do Brasil (LAINSON *et al.*, 1969) são, até o momento, supostos hospedeiros silvestres. No ciclo rural e urbano da *L. chagasi*, os principais hospedeiros vertebrados reconhecidos como reservatórios são mamíferos pertencentes à família Canidae (DEANE & DEANE, 1954). Nesse contexto, o cão vem sendo apontado como o mais importante reservatório, tendo estes um intenso parasitismo cutâneo e também o grande número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (REIS *et al.*, 2001). Sendo assim, o cão representa uma abundante fonte de infecção para os hospedeiros invertebrados, demonstrando a sua importância como elo na manutenção da transmissão da infecção para o homem. Estes animais têm sido encontrados em todos os focos da doença humana, sendo considerados os principais elos na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (ARAÚJO, 2006)

Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados se apresentam assintomáticos. Porém já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos são fonte de infecção para flebotomíneos e conseqüentemente tem papel ativo na transmissão da doença (GONTIJO E MELO, 2004).

2.1.3 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 88 países são afetados, sendo 66 do velho mundo e 22 no novo mundo, a prevalência da leishmaniose no mundo é de 12 milhões de pessoas infectadas, sendo a incidência para LV de 500.000 pessoas infectadas (CARVALHO E FERREIRA, 2001; WHO, 2008). Na América Latina a LV já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). De acordo Organização Mundial de Saúde (2008), é estimado 500.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) no mundo por ano, e este número apenas tende a crescer.

O aumento da incidência desta zoonose apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, no Brasil envolve as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país. A LV possui uma alta incidência principalmente em crianças desnutridas, idosos, e pacientes imunossuprimidos, encontrando-se assim entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (ARAÚJO, 2006).

O primeiro caso relatado de LV no Brasil foi feito em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela. Somente 20 anos depois é que se registrou o primeiro surto da doença em Sobral, no Ceará (GONTIJO & MELO, 2004).

No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença endêmica onde epidemias são freqüentemente registrados. Inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, entretanto, em meados dos anos 80 constatou-se uma transformação drástica na distribuição geográfica da LV, ocorrendo uma expansão para grandes centros urbanos (GAMA et al, 1998).

De acordo com o Ministério da Saúde (2005) a leishmaniose visceral está distribuída em 19 estados da Federação. Nos últimos dez anos, a média anual de casos de leishmaniose visceral foi de 3.383 casos; e a incidência, de 2,00 casos por 100 mil hab (Figura 6).

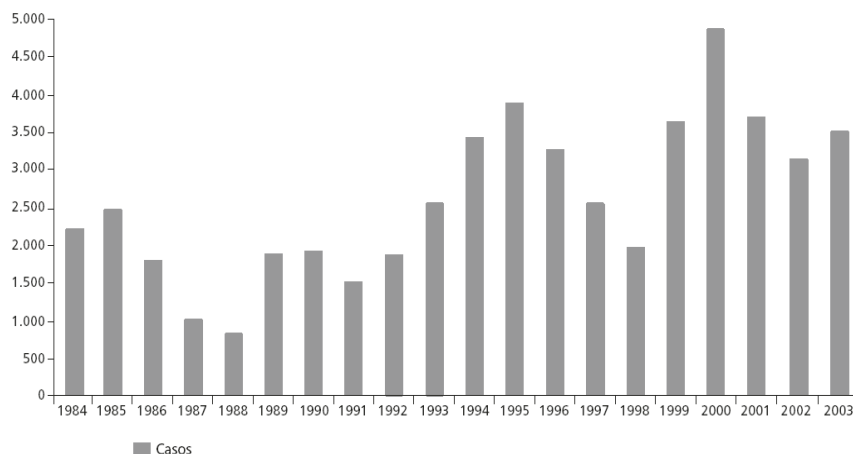


Figura 6. Número de casos de leishmaniose visceral no Brasil entre 1984 a 2003.
Fonte: Ministério da Saúde, 2005

Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos de LV notificados ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando: em 2002, a região Nordeste apresenta 55% dos casos do país (Figura 7).

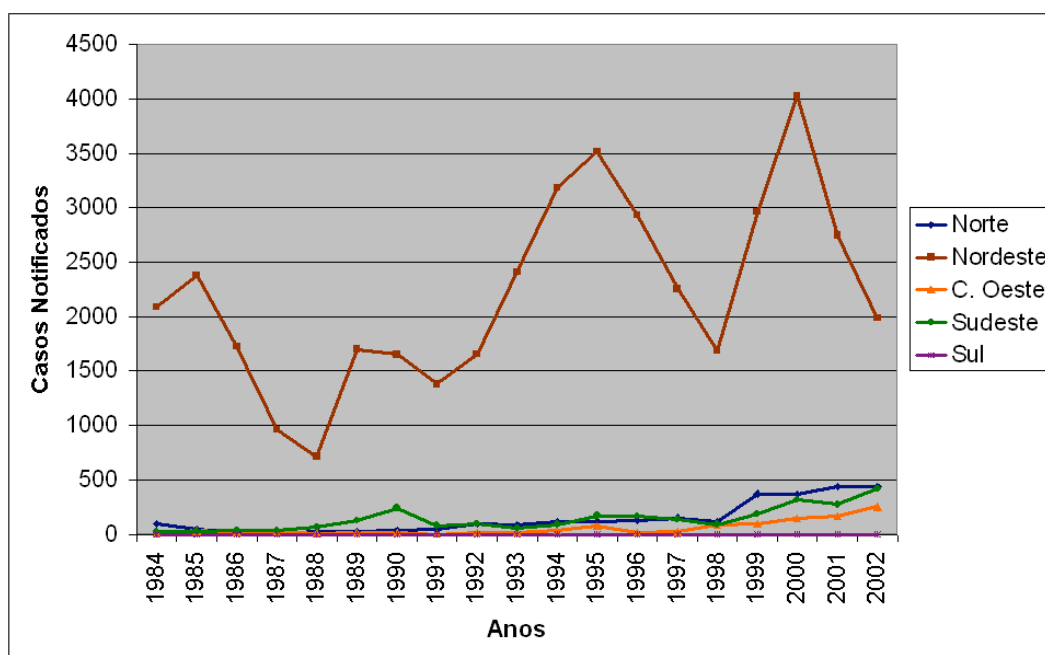


Figura 7. Casos de leishmaniose visceral por Unidade Federativa entre os anos de 1984 a 2002.

Fonte: Ministério da Saúde, 2003

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os casos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, mais recentemente, as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (WHO, 2002).

A LV no Estado do Ceará teve seus primeiros casos registrados por Deane (1954) no ano de 1934, provenientes de Sobral e se encontra em processo de expansão, tanto em magnitude, como geograficamente. A doença é endêmica no Ceará, com registro de surtos freqüentes. (BRAVO, 2007).

No período de 1986 a 2006, a maior incidência da doença foi em 2006 com 789 casos confirmados, com uma taxa de incidência de 9,6 casos por 100.000 habitantes (Figura 8). A curva mostra um comportamento cíclico. Esse comportamento está associado a fatores relativos ao processo migratório, urbanização crescente, esvaziamento rural e secas periódicas, que levam à redução do espaço ecológico da doença, propiciando a ocorrência de picos epidêmicos (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2007).

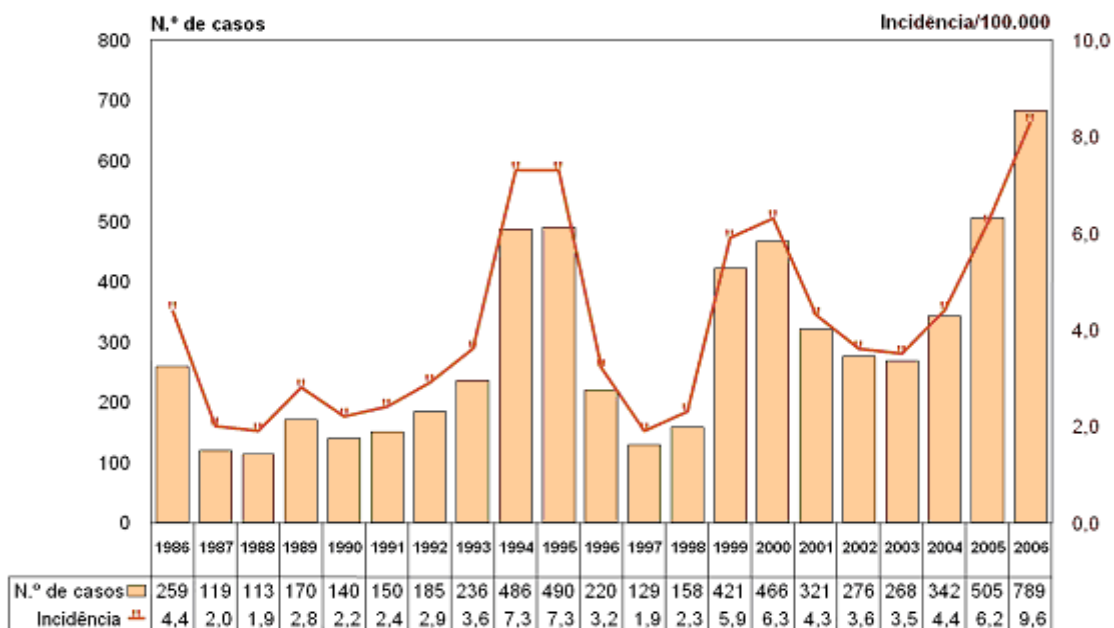


Figura 8. Casos de incidência de leishmaniose visceral no estado do Ceará entre os anos de 1986 a 2006

Fonte: Secretaria da Saúde do Estado Do Ceará, 2007

No período de 2001 a 2006 foram registrados 2.499 casos e 137 óbitos de LV no Ceará. A letalidade, no período, foi de 5,5%, com uma taxa mínima de 3,2% (2005) e máxima

de 9,0% (2002). Em 2006, houve expansão da doença, atingindo 99 (53,8%) municípios (Tabela 1). Em 2007 foram confirmados casos em 54 (29,3%) dos municípios (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2007).

2.1.4 Controle

As estratégias de controle, até agora utilizadas, estão centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia em cães soro reagentes), bem como na aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos em humanos registrados. Entretanto, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentam efetividade para redução da incidência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O emprego de inseticidas contra os flebótomos é factível em situações de transmissão peridomiciliar e domiciliar. Ressalta-se que a investigação epidemiológica do caso é quem indicará o seu uso. Nas áreas florestais este método é impraticável. A aplicação de inseticidas deve ser realizada, preferencialmente, com ação residual, sobre a superfície de paredes do domicílio e anexos domiciliares (abrigo de animais domésticos, paióis etc). O uso de colares contendo inseticidas, especialmente em lugares com alta prevalência da enfermidade, tem sido utilizado em diversos países com resultados promissores (KILLICK-KENDRICK et al., 1997).

Programas de controle se baseiam na eliminação dos cães soropositivos. No entanto, dados do Ministério da Saúde, mostram que esta medida não vem reduzindo o número de casos em humanos (MOREIRA Jr et al, 2004). Recentemente uma vacina vem sendo produzida e comercializada no Brasil, e esta foi capaz de proteger 95% dos animais vacinados e com uma eficácia de 76 a 80% (NOGUEIRA et al, 2005).

Em condições experimentais, diversos trabalhos demonstraram a eficácia na utilização de coleiras impregnadas com deltametrina 4% como medida preventiva de proteção individual para os cães contra picada de flebotomíneos (GONTIJO & MELO, 2004).

2.1.5 Tratamento

Por mais de sessenta anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®), que são os medicamentos de primeira escolha para o

tratamento da LV. Estas drogas são tóxicas, nem sempre efetivas, são usadas em esquemas prolongados (GONTIJO & MELO, 2004). Há drogas alternativas como estibogluconato de pentamidina e anfotericina B, utilizadas nas formas resistentes e no tratamento convencional. Vale enfatizar que, mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas é freqüente, sendo de 2% nos casos tratados e ao redor de 10% nos casos não tratados (BASANO & CAMARGO, 2004). Croft et al (2003) afirma que a resistência aos antimoniais em pacientes no Sudão e na Índia tem se tornado um problema.

O tratamento tradicional apresenta vários inconveniente, tais como as vias de aplicação, que são intramuscular ou endovenosa, onde podem ser dolorosas e desconfortáveis. Além disso estas drogas precisam ser administradas diariamente por longos períodos, o que muitas vezes requer hospitalização acarretando em desconforto ao paciente e alto custo aos cofres públicos (BRAGA et al, 2007). As drogas tradicionais também apresentam alta toxicidade e resistência (TEMPONE et al, 2005). Alguns efeitos colaterais do Glucantime® é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização durante os dois primeiros trimestres de gravidez (GONTIJO & MELO, 2004). Outros efeitos colaterais causados por outros medicamentos são trombocitopenia, alteração das enzimas hepáticas, mialgias, náuseas e vômitos (BERGAMAN, 1997).

O emprego de medidas terapêuticas teria como finalidade a recuperação dos cães infectados e isto acarretaria o controle profilático da infecção humana. Entretanto, as tentativas de tratamentos com drogas comercialmente utilizadas com eficácia em humanos (antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol), não têm obtido êxito na terapêutica em cães (ALENCAR, 1959). Segundo MARZOCHI *et al.* (1985), o insucesso da antimonioterapia em cães poderia ser explicado em parte por uma alta excreção renal do antimônio, por um diferente metabolismo desta droga no fígado ou também por uma resposta imune não usual nos animais infectados. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e leva ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (SESSA et al, 1994; ALVES & BEVILACQUA, 2004). Sendo assim, o tratamento da LVC ainda constitui um desafio para a ciência, estimulando diversos grupos de pesquisa nesta área de estudo (VOULDOUKIS et al, 2006).

No caso da leishmaniose visceral, estudos químicos e imunofarmacológicos têm sido realizados com o intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos,

economicamente mais viáveis de efeito específico e que reverta a resistência do parasita às drogas (BERGAMAN et al, 1997).

2.2 Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose

2.2.1 Compostos Antimoniais

Em 1912, Gaspar Vianna empregou no Brasil o uso do tártaro amético (tartarato duplo de potássio e antimonila) no tratamento da leishmaniose. A droga revelou-se ativa sobre lesões cutâneas e mucosas mas com inconvenientes decorrentes da toxicidade da mesma (CASTRO, 1980).

Acredita-se que o mecanismo de ação dos antimoniais é baseado na interferência do processo bioenergético das formas amastigotas de leishmânia. Os produtos desta interferência bloqueiam e inibem diferentes proteínas do parasita, particularmente enzimas envolvidas na glicólise e oxidação de ácidos graxos, resultando numa redução na produção de ATP e GTP (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Os antimonias causam sérios efeitos colaterais que incluem dor no local da aplicação e nas articulações, problemas gastrointestinais, cardiotoxicidade e em alguns casos insuficiência renal e hepática. A eficiência de antimoniais no tratamento de leishmaniose está relado em cerca de 85% (ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ et al, 2007).

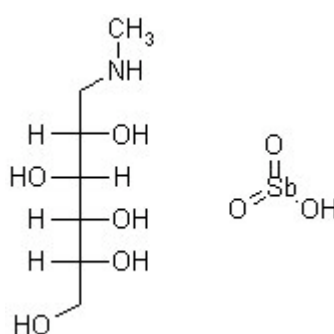


Figura 9. Antimoniato de N-metilglucamina

No Brasil, o medicamento à base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoniato de N-metil-glucamina, Glucantime® (Figura 9). O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina,

sendo a última obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina (RATH et al, 2003).

2.2.2 Pentamidina

A pentamidina (Figura 10) é um aromático derivado de diamidina, na qual se apresenta tóxica para vários protozoários e vem se mostrando útil no tratamento de casos leishmaniose onde o paciente não respondeu ao tratamento com antimoniais (RATH et al, 2003).

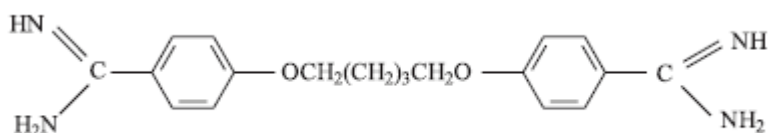


Figura 10. Isotionato de Pentamidina

Quanto ao seu mecanismo de ação, sabe-se que interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucléicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto. Há dois sais de pentamidina, o isotionato de pentamidina (Pentamidina®), disponível nos EUA e Europa, e o mesilato de pentamidina, disponível apenas na Europa (Lomidine®). Diferem entre si quanto à dose e efeito diabetogênico (PAULA et al, 2003).

Têm sido implicados à pentamidina efeitos colaterais que são divididos em imediatos e tardios. Os efeitos imediatos incluem hipotensão, náuseas, vômitos e síncope. Já são bem conhecidos os efeitos sistêmicos no metabolismo da glicose, tais como hipoglicemia, que chega a 8% dos casos, e o efeito diabetogênico, em fase mais tardia, atingindo 5% dos casos, sendo testado inclusive no tratamento do insulínoma maligno. A alteração mais freqüente, entretanto, é a renal, chegando a 23% (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

2.2.3 Anfotericina B

Antibiótico poliênico anfotericina B (Figura 11) é uma droga padrão usada no tratamento de infecções fúngicas e altamente eficaz, no entanto apresenta elevada toxicidade. Seu mecanismo de ação está relacionado com a sua ligação aos esteróides da membrana

fungica. Como a membrana da leishmânia contém ergosterol, a droga reduz a permeabilidade da célula do parasita, com a perda de pequenos cátions, particularmente K^+ , causando a morte da célula.(ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ et al, 2007). A forma lipossomal age especificamente sobre as células alvo (macrófagos), sendo incorporada ao meio intracelular e, assim reduzindo os efeitos colaterais com maior índice de eficácia terapêutica (PAULA et al, 2003).

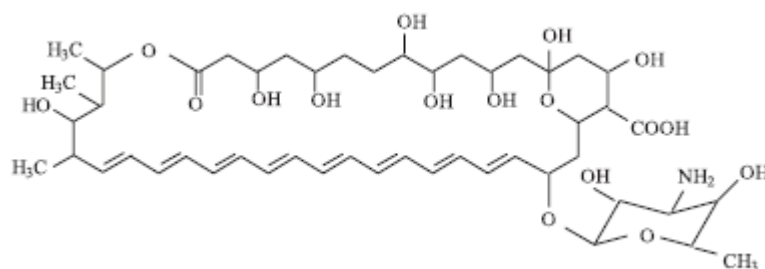


Figura 11. Anfotericina B

Este medicamento também possui diversos efeitos colaterais onde o principal efeito são alterações renais em aproximadamente 80% dos indivíduos tratados (CHAN-BACAB E PENA-RODRIGUEZ, 2001).

2.2.4 Miltefosina

A miltefosina (figura 12) (hexadecilfosfocolina), medicamento originalmente desenvolvido como antineoplásico, na década de 80, durante a sua avaliação para esta finalidade terapêutica, descobriu-se a sua potente ação contra leishmânias. Esta droga age interferindo na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, depois modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolípidos, induzindo morte celular por apoptose (COSTA FILHO et al, 2008).

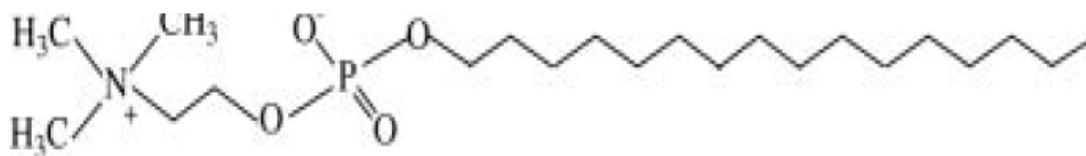


Figura 12. Estrutura molecular da Miltefosina

2.3 Plantas Medicinais

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidade é tão antigo quanto a espécie humana e muitas vezes o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al, 2001).

Muitas sociedades tradicionais e autóctones possuem uma vasta farmacopéia natural, em boa parte proveniente dos recursos vegetais encontrados nos ambientes naturais ocupados por estas populações, ou cultivados em ambientes antropicamente alterados. O interesse acadêmico a respeito do conhecimento que estas populações detêm sobre plantas e seu uso tem crescido, após a constatação de que a base empírica desenvolvida por elas ao longo de séculos pode, em muitos casos, ter uma comprovação científica, que habilitaria a extensão destes usos à sociedade industrializada (AMOROZO, 2002).

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica de enfermidades. Como exemplo, podemos citar a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, etc. Cabe mencionar que dados da literatura indicaram que, em 1980, os consumidores dos Estados Unidos pagaram mais de 8 bilhões de dólares em prescrições com produtos naturais ativos. Em relação ao mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas para curar suas enfermidades (CECHIEL FILHO & YUNES, 1997).

Ultimamente as plantas vêm se tornando uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos; 25% dos medicamentos do mercado farmacêutico possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de drogas semi-sintéticas (BERGMANN ET AL., 1997). Assim, as plantas medicinais, usadas na preparação de remédios tradicionais, trouxeram para a medicina moderna drogas de comprovada eficácia para o tratamento de algumas doenças parasitárias (MACIEL et al, 2001).

O Brasil é reconhecido pela exuberância e variedade de plantas tropicais, sendo algumas amplamente utilizadas na medicina popular. Extratos de plantas ou derivados de partes de plantas são apropriados para o desenvolvimento de novos agentes medicinais, o que

estimula uma busca por tratamentos alternativos derivados de produtos naturais com potencial na terapia das leishmanioses (SUFREDINI et al, 2004).

Como parte da pesquisa por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade, o Programa de Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde (OMS) vem considerando a investigação sobre o uso plantas no tratamento de leishmaniose essencial e de alta prioridade (WHO, 2008).

Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas. Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida (BEZERRA et al, 2006).

O efeito leishmanicida dos compostos isolados de espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania*. (BARATA et al, 2000). Plantas produtoras de alcalóides e acetogeninas vêm mostrando estudos promissores com resultados contra protozoários; entre estas destacam-se as da famílias Annonaceae (ROCHA et al, 2005). Esta família possui boas possibilidades na procura de novos agentes com potencial para o tratamento da Leishmaniose Visceral Canina.

2.3.1 Família Annonaceae

A família das anonáceas engloba uma grande variedade de espécies frutíferas. As plantas desta família caracterizam-se por apresentarem folhas simples, dispostas alternadamente em um mesmo plano, ao longo dos ramos e pela semelhança entre seus frutos (ALMEIDA, et al., 1998). As anonáceas são largamente empregadas na etnofarmacologia devido às suas diferentes propriedades farmacológicas atribuídas principalmente as acetogeninas e alcalóides, dois dos principais constituintes bioativos encontrados em gêneros específicos das anonáceas (FAGUNDES et al, 2005).

2.3.1.1 *Annona muricata* L.

A *Annona muricata*, tem como nome popular graviola, na língua espanhola é conhecida como guanábano, soursop na língua inglesa e corossolier no francês. É uma planta originária das Antilhas, onde se encontra em estado silvestre (Figura 13). No Brasil, tornou-se subespontânea na Amazônia, sendo cultivada principalmente nos Estados do Nordeste. Prefere climas úmidos, baixa altitude, e não exige muito em relação a terrenos. A sua importância comercial no Brasil é pequena apesar da demanda crescente pela polpa do fruto no país, no Oriente Médio e na Europa (Alemanha e Espanha). No Nordeste brasileiro o município cearense de Trairi mantém plantios organizados dessa fruteira (LIMA et al, 2007).

A gravioleira tem hábito de crescimento ereto, pode alcançar 4 a 8 m de altura quando adulta, abundante sistema radicular, caule único com ramificação assimétrica. As flores são perfeitas, hermafroditas, verde-escuras a verde-claras. O fruto - graviola - também conhecido como jaca-de-pobre, jaca-do-pará, coração-de-rainha, araticum manso, é uma baga composta (sincapo) com peso oscilando entre 0,4 kg a 10 kg, comprimento médio em 30 cm e formato de coração; a casca tem espículas carnosas moles e é verde-clara na colheita. A polpa é branca sucosa. A semente com 1 a 2 cm de comprimento, peso 0,59 g (170 sementes/100 g) é preta na sua retirada do fruto passando a marrom dias após; de ordinário encontra-se 100 sementes por fruto (MAAS et al, 2001).



Figura 13. *Annona muricata*

Fonte: www.nybg.org

Todas as partes deste vegetal são utilizadas na medicina natural, muitos compostos bioativos e fitoquímicos são encontrados na *A. muricata* (tabela 1). Vários estudos têm

mostrado ação hipotensiva, antiespasmódica, vasodilatadora, relaxante do músculo estomacal e atividade citotóxica contra células cancerígenas a partir dos extratos das folhas e troncos (ALALI et al., 1999) e até efeito contra Herpes simplex (PADMA et al, 1998).

Tabela 1. Classificação e caracterização dos vegetais

Família Vegetal	Nome Científico	Nome Popular	Parte Utilizada/ Produto extrativo	Compostos químicos presentes	Uso Popular	Referência
<i>Annonaceae</i>	<i>Annona muricata</i> L.	Graviola	Fruto e Folhas	Acetogeninas Alcalóides Esteróides Triterpenos Taninos	Câncer Hipotensivo Anti-espasmótico Vasodilatador Herpes simplex	Alvarez-Gonzalez, 2008 Padma et al, 1998 Alali et al, 1999
<i>Annonaceae</i>	<i>Annona squamosa</i> L.	Ata, Pinha, Fruta do Conde	Folhas	Acetogeninas Alcalóides Flavonóides Esteróides Taninos	Anti-diarrêico Antiespasmódico Antiinflamatório Hiperparatireoidismo Hipoglicêmico	Panda et al, 2007 Gupta et al, 2005 Amador et al, 2006

Considerado um importante aliado no combate de mais de doze tipos de câncer, como do pulmão, seios, próstata, entre outros. Estudos feitos em mais de vinte laboratórios mostraram que o tratamento com a fruta preveniu e melhorou casos, com resultados mais promissores que o tratamento com quimioterapia (BERMEJO et al, 2005). Desde 1996, o Instituto de Ciências de Saúde dos Estados Unidos, coleciona e estuda a *A. muricata* para o tratamento de câncer e os cientistas estão provando sua real eficiência no combate de células cancerígenas. Além de melhorar a perspectiva de vida da pessoa doente, os tratamentos naturais, na maioria de casos, dão a sensação de força e vitalidade necessária para a recuperação. Uma terapia natural completa é possível com extratos desta árvore poderosa, sem que cause qualquer efeito colateral severo como náusea e perda de cabelo, comparado ao provocado pela quimioterapia (ALVAREZ-GONZALEZ et al, 2008).

2.3.1.2 *Annona squamosa* L.

A espécie *Annona squamosa* (Figura 14) é conhecida como pinha, ata e fruta-do-conde no Brasil, *anona blanca*, *sweetsop*, *anon*, *anona*, *rinon*, *atta del Brasil*, *srikaya*, *atis*, etc.. É uma árvore pequena originária das Antilhas, com muitos galhos, que atinge 5 metros de altura. Produz frutos delicados que possuem de 7 a 10 centímetros de diâmetro. É redondo e

muitas vezes coberto de saliências arredondadas. À medida que amadurece as saliências passam do verde-claro ao verde-pardo-acinzentado. Boa fonte de vitaminas C e do complexo B, importantes no metabolismo das proteínas, carboidratos e gorduras, é aconselhável para incrementar o cardápio com vitaminas e sais minerais, sendo ruim para pessoas que fazem regime de emagrecimento, por ser rica em açúcares, conseqüentemente, muito mais calórica do que a maioria das frutas (ALVES et al, 2000).

O cultivo da *A. squamosa* vem experimentando um considerável crescimento no Sudeste e Nordeste brasileiro, notadamente nos perímetros irrigados, pela possibilidade de obtenção de mais de uma safra por ano e devido aos bons preços obtidos para a fruta nos principais mercados consumidores do país. No Brasil, são cultivados 6,625 ha com pinha, sendo que a região do nordeste brasileiro é responsável por 93,23% deste total. O principal produtor nacional é o Estado da Bahia, seguido de Pernambuco e Alagoas. No estado de Minas Gerais, a cultura tem crescido consideravelmente nos últimos anos, principalmente nos perímetros irrigados da região Norte do estado, (NIETSCHKE et al, 2003).

Testes fitoquímicos revelam a presença de alcalóides, acetogeninas, taninos, esteróides e flavonóides em *A. squamosa* (AMADOR et al, 2006).

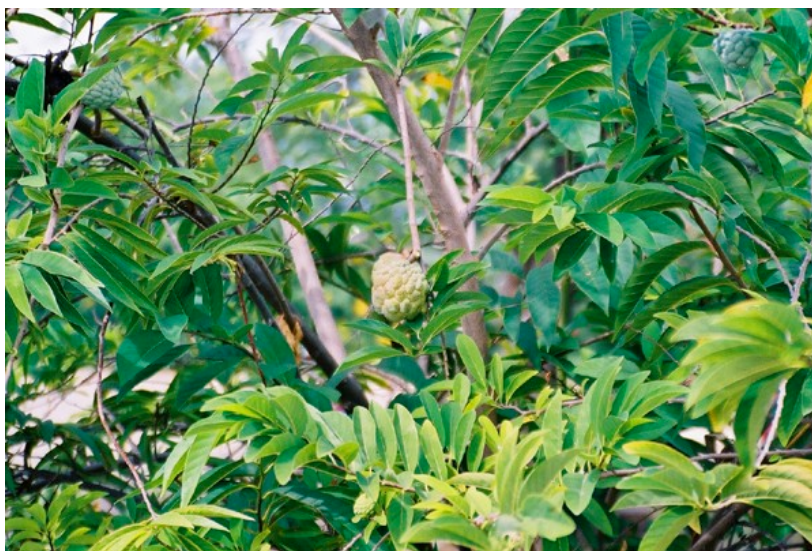


Figura14. *Annona squamosa*
Fonte: www.jardimdaceleste.com

Annona squamosa é usada na medicina popular como: anti-diarrêico, antiespasmótico, antiinflamatório e analgésico, na forma de chá das folhas frescas. A decocção das folhas é empregada para aliviar dores no corpo (AMADOR et al, 2006). Além destes podemos também

citar seus efeitos hipoglicêmicos, podendo ser usada no combate da diabetes mellitus (GUPTA et al, 2005) e na regulação do hiperparatireoidismo (PANDA et al, 2007).

2.4 Acetogeninas

As acetogeninas possuem diversas atividades biológicas relatadas na literatura como, por exemplo, antitumoral, imunossupressor, pesticida, antiprotozoário, anti-helmíntico e antimicrobiano, o que fez deste constituinte bioativo objeto de inúmeras pesquisas (ALALI et al, 1999). Sobre as acetogeninas, foi relatado que podem inibir seletivamente o crescimento de células cancerosas e também de inibir o crescimento de células tumorais resistentes a adriamicina, demonstrando extraordinária seletividade entre certas linhagens celulares, especificamente, contra câncer prostático (FAGUNDES et al, 2005).

São compostos que apresentam várias propriedades biológicas, incluindo citotoxicidade. Estudo *in vitro* mostraram um efeito citotóxico preferencial sobre células neoplásicas em comparação com as células saudáveis, sugerindo um potencial antitumoral destes agentes (ALVAREZ-GONZALEZ, 2008).

Das sementes de *A. squamosa* foi isolada uma acetogenina triidroxilada com dois anéis tetraidrofurânicos e anel lactônico α,β -insaturada de 37 átomos de carbono (figura 15), dotada de propriedades anti-helmínticas contra *Haemonchus contortus*, principal nematódeo de ovinos e caprinos do Nordeste brasileiro (SOUZA et al, 2008).

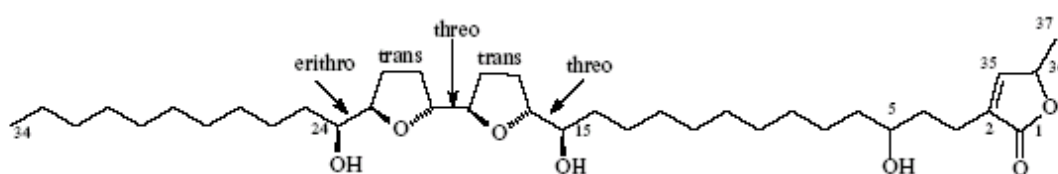


Figura 15. Acetogenina anti-helmíntica isolada das sementes de *A. squamosa*.

Mais de 160 tipos diferentes de acetogeninas são encontradas na família das anonáceas, a maioria deles possuem um anel mono-tetrahydrofurano (THF), os tipos diferem de acordo com a posição das hidroxilas no THF e ao longo da cadeia de ácidos graxos (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Grandic et al (2004) isolaram de diversas espécies de anonáceas 12 acetogeninas diferentes, e testou-as contra as formas promastigota e amastigota de *L. donovani*. As acetogeninas isoladas neste estudo foram Annonacina, Isoannonacina, 2,33-diidroannonacina,

Rolliniastatina-1, Rolliniastatina-2, Isorolliniastatina-1, 2,35-dihydrorolliniastatina-1, Panalicina, Narumicina-1, Narumicina-2, Squamocina e Cherimolina. Os resultados nos testes utilizando a forma promastigota mostraram uma variação em sua EC_{50} de 4.7–47.3 μM , onde a acetogenina mais efetiva foi rolliniastatina-1 obtendo uma EC_{50} 4.7 μM e a menos efetiva diidrorolliniastatina-1 com a EC_{50} 47.3 μM . Com relação as amastigotas, o rolliniastatina-1 foi o composto mais efetivo mostrando uma EC_{50} 2,5 μM .

Algumas acetogeninas como senegalene, squamocine, asimicine e molvizarina, isoladas das sementes de *Annona senegalensis* (Annonaceae), mostraram uma atividade contra promastigotas de *L. major* e *L. donovani* em várias concentrações variando de 25 a 100 $\mu g/mL$. Outra acetogenina que apresentou ação contra promastigotas de *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. amazonensis* foi a Rolliniastatina-1 obtida da casca do tronco de *Rollinia emarginata* (Annonaceae), annonacina A e goniotalmicina obtidos das sementes de *Annona glauca* (Annonaceae) também mostraram efeitos semelhantes (WAECHTER et al, 1998; CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Waechter et al (1998) isolaram das sementes de *Annona glauca* nove acetogeninas: Glaucasina, Rolliniastatina-2, Squamocina, Glaucifilina, Molvizarina, Parviflorina, Annonacin A, Annonacina e Goniotalmicina. Foi avaliada a atividade destas *in vitro* contra *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* além do *T. cruzi*. Annonacina A e Goniotalmicina mostraram efeito contra promastigotas com uma CE_{100} de 10 e 5 $\mu g/mL$ respectivamente. Glaucasina, Squamocina, Annonacina A e Annonacina mostraram atividade contra *T. cruzi* com redução de 78%, 67%, 71% e 85% deste parasita.

Hopp et al (1997) isolaram três acetogeninas da casca do tronco da *A. squamosa*: 4-deoxyannoreticuim, *cis*-4-deoxyannoreticuim e (2,4-*cis* e *trans*)-squamoxinone (Figura 16).

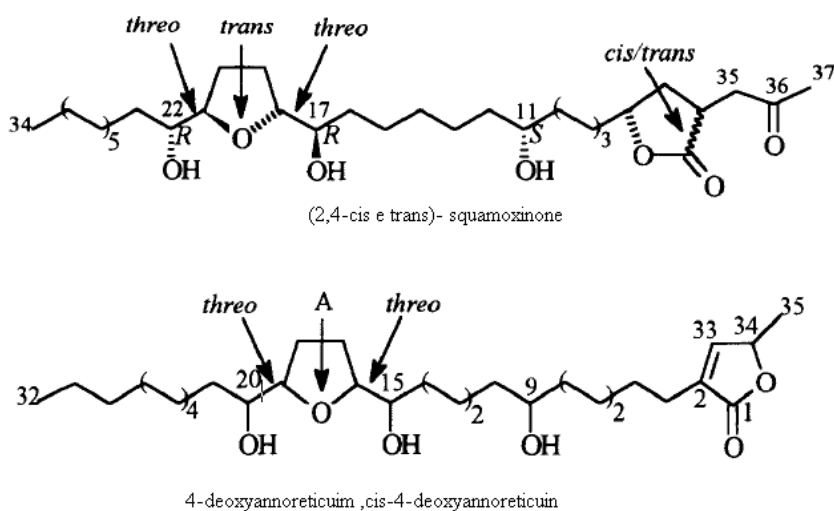
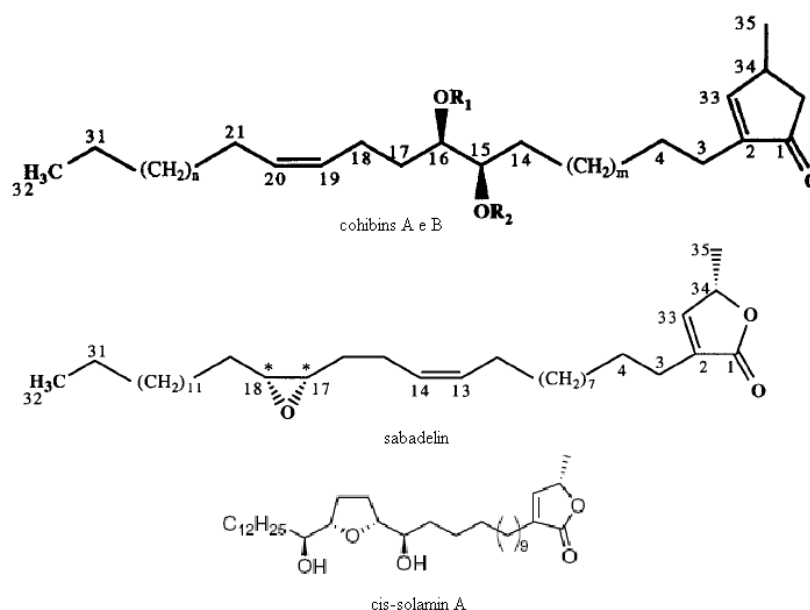


Figura 16. Acetogeninas isoladas da *A. squamosa*

Zeng et al (1995) isolou uma Annohexocin, acetogenina encontrada nas folhas da *A. muricata* o mesmo encontrado na casca do tronco de *R. emarginata*. Konno et al (2007) isolou das raízes da *A. muricata* uma acetogenina mono-tetrahidrofurano a cis-solamina A, onde esta mostrou um efeito promissor na inibição do complexo mitocondrial I das *Leishmanias*. Também com atividade leishmanicida duas acetogeninas isoméricas foram isoladas das raízes deste mesmo vegetal cohibins A e B e sabadelin (Figura17) (Gleye et al, 1997; Gleye et al, 1999). Yu et al (1998) isolou das sementes de *A. muricata*, Murihexol, donhexocina, annonacina A e annonacina. Das folhas deste espécie, Kim et al (1998) isolou e identificou duas monotetrahidrofurano acetogeninas, Moricoreacin e Murihexocin.

Figura 17. Acetogeninas isoladas da *A. muricata*

O mecanismo de ação das acetogeninas não está totalmente esclarecido. Acredita-se que são potentes inibidores do complexo mitocondrial I. As acetogeninas são potentes inibidoras da NADH ubiquinona oxidorreductase, que é uma enzima essencial no complexo I levando a uma fosforilação oxidativa na mitocôndria da célula. Estudo na literatura demonstrou que estas substâncias agem diretamente no sítio catalítico da ubiquinona, dentro do complexo I e na glicose desidrogenase microbiana. Elas inibem também a NADH oxidase

ligada a ubiquinona, peculiar às membranas plasmáticas das células cancerosas (BERMEJO et al., 2005;).

2.5 Alcalóides

O uso biológico dos alcalóides contra parasitas vem sendo mencionado por muitos autores que relataram este tipo de atividade (ANISZEWSKI, 2007; TEMPONE et al, 2005; CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001; KAPIL, 1993). Entre estas podemos citar malária (*Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*), leishmaniose (*Leishmania spp.*), Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), Doença do sono (*Tnome. rhodesiense* e *Tnome. gambiense*), helmintos (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*), trematóides, trematódeos entre outros (ANISZEWSKI, 2007).

Estudos com atividade anti-parasitária utilizando *Plasmodium falciparum*, *L. donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* mostrou evidências de uma relação entre alcalóides piridoacridone e atividade anti-parasitária. No entanto estes alcalóides possuem uma citotoxicidade elevada, o que limita o uso de sua bioatividade. Estudo da bioatividade de piperina (Figura 18) em promastigotas *in vitro* de *L. donovani* obteve resultado promissores (KAPIL, 1993).

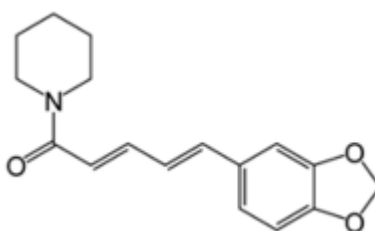


Figura 18. Estrutura química da piperina

Berberina (Figura 18) é um alcalóide isoquinolínico quaternário encontrado em diversas plantas da família Annonaceae, é um dos alcalóides com maior atividade leishmanicida. Este metabólido é o constituinte principal de vários medicamentos populares usado no tratamento de leishmaniose, malária e amebíase. Este é usado clinicamente contra leishmaniose a mais de 50 anos e tem demonstrado uma atividade significativa *in vitro* e *in vivo* contra diversas espécies de *Leishmania* (PHILLIPSON E WRIGHT, 1991)

Isoguattouregidine foi isolada das raízes da *Guatteria foliosa* (Annonaceae), quando testado contra *L. donovani* e *L. amazonensis* causou lise da parede do parasita. Anonaina e

liriodenina (Figura 19) obtidos das cascas do tronco e raízes da *Annona spinescens* (Annonaceae), mostraram uma EC_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$, o mesmo metabólito quando isolado da casca do tronco *Rolima emarginata* (Annonaceae) teve uma EC_{100} de 5 $\mu\text{g/mL}$ em promastigotas do mesmo parasito (MAHIOU et al, 1994; QUEIROZ et al, 1996).

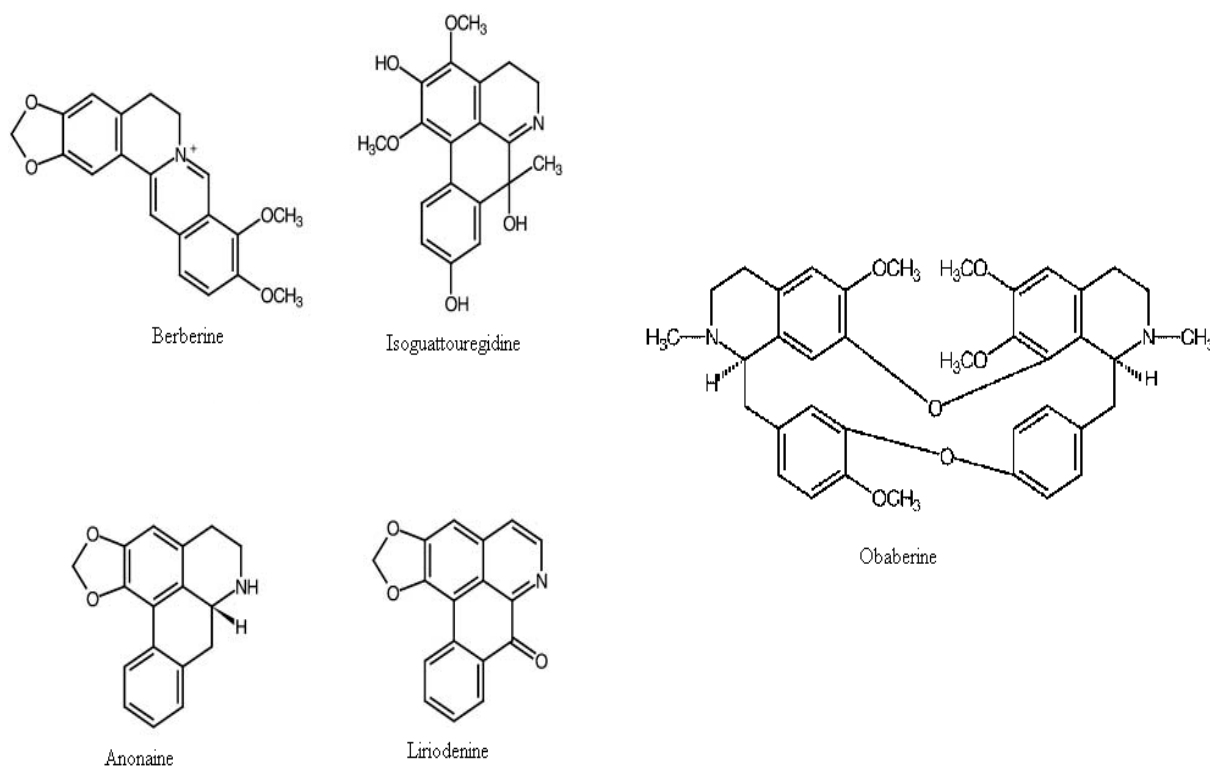


Figura 19. Estrutura química de alcalóides da família Annonaceae

Os alcalóides benzilisoquinolínicos são amplamente distribuídos na natureza e vem sendo isolados de diferentes plantas comumente usadas em medicina tradicional para o tratamento de doenças parasitárias. Uma avaliação de quatorze alcalóides bisbenzylisoquinolínicos mostrou atividade contra promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*. Obaberina isolado de *Pseudoxandra sclerocarpa* (Annonaceae) mostrou uma EC_{100} de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18). Também se pode observar um efeito moderado de alcalóides bisbenzylisoquinolínicos isolados da casca do tronco de *Guatteria boliviana* (Annonaceae) quando testados contra promastigotas de *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Figura 19) (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

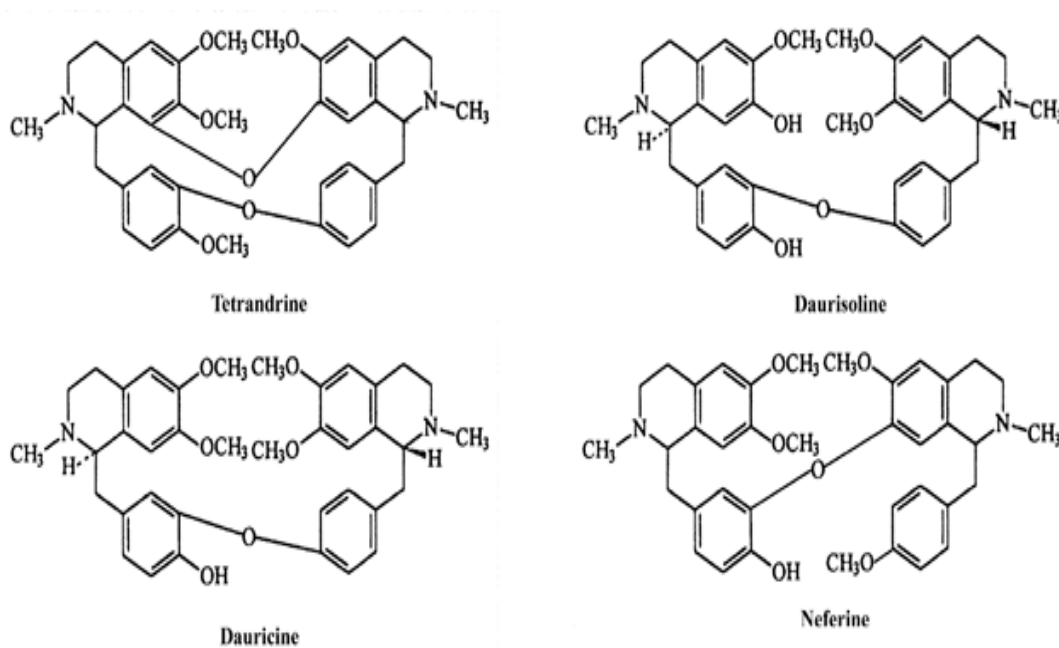


Figura 20. Estrutura química de alcalóides bisbenzisoquinolinos leismanicidas

Bhaukuni et al (1971) conseguiram isolar 6 alcalóides aporfinicos das folhas e casca do tronco da *A. squamosa* denominados anonaina, roemerina, norcoridina, norisocoridina, isocoridina e glaucina. Anonaina foi também isolado das sementes desta mesma planta. Em trabalho posterior estes mesmos autores observaram a presença de norlaurelina, aporfina e dienome neste mesmo vegetal. Bhaukuni et al (1979) isolaram três outros alcalóides xilopina, O-methylarmepavine e lanuginosena pela primeira vez em *A. squamosa* (Figura20).

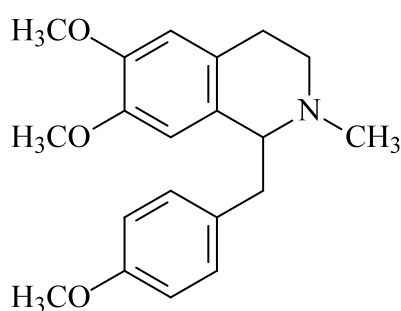


Figura 21. Estrutura química do O-methylarmepavina

Alcalóides do tipo xilopina, nornanteina, cryptodorina, nornuciferina, lusicamina e laudanosina foram isolados da *Guatteria amplifolia* (Annonaceae), destes mostraram atividade contra *L. Mexicana* e *L. panamensis* xilopina, criptodorina, nornanteina e nornuciferina (CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

O mecanismo de ação dos alcalóides não está totalmente esclarecido, porém Fournet et al (2000) observaram que alcalóides bisbenzilisquinolínicos inibem uma enzima antioxidante essencial na *Leishmania*, a Tripanotione redutase.

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é uma zoonose e um grave problema de saúde pública. O tratamento em humanos constitui-se de medicamentos altamente tóxicos e em animais o tratamento é ineficaz, com isso o Ministério da Saúde recomenda como método de controle a eutanásia para os animais soropositivos porque a medicação utilizada não é eficaz para o cão. Atualmente o MS proíbe tratamento de cães infectados com medicamentos utilizados em humanos. Assim se faz necessário uma alternativa na prevenção e controle da leishmaniose visceral. Diversos compostos do metabolismo secundário das plantas, entre eles alcalóides e acetogeninas, vêm se mostrando efetivos no combate a *Leishmania chagasi*. Portanto a avaliação do potencial leishmanicida de produtos naturais de plantas produtoras destes compostos como *Annona squamosa* e *Annona muricata* pode gerar produtos eficazes contra a leishmaniose visceral.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os extratos ricos em acetogeninas e alcalóides das folhas da *Annona squamosa* e das sementes da *Annona muricata*, possuem ação contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania chagasi*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento de fitoterápicos utilizadas no tratamento da Leishmaniose Visceral.

5.2 Objetivos Específicos

- Preparação dos extratos metanólicos das plantas em estudo.
- Separação dos alcalóides e acetogeninas presentes nos extratos.
- Avaliar a ação dos extratos ricos em alcalóides e acetogeninas contra as formas promastigota e amastigota da *Leishmania chagasi*
- Isolamento dos alcalóides e acetogeninas através do tratamento cromatográfico dos extratos e caracterização estrutural destes compostos através de técnicas espectroscópicas.

CAPÍTULO I

Atividade Leishmanicida de extratos de *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L.

Leishmanicidal activity of *Annona squamosa* L. and *Annona muricata* L.
extracts

Phytomedicine

Novembro, 2008

Leishmanicidal activity of *Annona squamosa* L. and *Annona muricata* L.
extracts

Nadja Soares Vila-Nova¹, Selene Maia de Morais^{1,2}, Lyeghyna Karla Andrade Machado²,
Cláudia Maria Leal Beviláqua¹, Heitor Franco de Andrade Júnior³, Nilce Viana Gramosa
Pompeu de Sousa Brasil⁴

¹Veterinary Faculty, Post-Graduation Program in Veterinary Sciences, State University of
Ceará

²Chemistry Department, State University of Ceará

³Medicine Tropical Institute, Protozoology Laboratory, University of São Paulo

⁴Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará

Corresponding author: Selene Maia de Morais, Rua Ana Bilhar N^o 601, Apto. 400 Fortaleza,
Ceará, Brazil, Phone: 55 (85) 32426811, Fax: 55 (85) 32429715, E-mail:
selene.maia@pq.cnpq.br

Abstract

Current visceral leishmaniasis (VL) control programs in Brazil include the infected dog euthanasia but, despite this strategy, the incidence of human VL is still increasing. In the search for new leishmanicidal agents, extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata*, were tested against *Leishmania chagasi* using the MTT assay. Aqueous methanol extracts were prepared and partitioned with 10% phosphoric acid and organic solvents to isolate alkaloids and acetogenins common in *Annona* species. *A. squamosa* methanol extract showed an EC₅₀ value of 26.43 µg/ml and *A. muricata* showed an EC₅₀ value of 54.93 µg/ml. *A. squamosa* alkaloid extract showed an EC₅₀ value of 73.31 µg/ml. Pentamidine was used as standard drug showing an EC₅₀ value of 1.63 µg/ml. Two compounds were isolated by silica gel column chromatography from active extracts and characterized by spectroscopic data as *O*-methyldarmepavine, a benzyloquinolinic alkaloid, and a C₃₇ trihydroxy adjacent bistetrahydrofuran acetogenin.

Key-words: Leishmaniasis; benzyloquinolinic alkaloids; acetogenins; *Annona squamosa*; *Annona muricata*.

Introduction

Leishmaniasis is a zoonotic tropical disease caused by at least 17 protozoa species of *Leishmania* genus (Croft & Coombs, 2003). The forms of the disease are related to the type of parasite, and differ in geographic distribution, host and vector involved, incidence rate and mortality (Ashford et al, 1992). Visceral leishmaniasis is endemic in 88 countries, with prevalence of 12 million people and a incidence of 500 million per year (WHO, 2008).

The chemotherapy of leishmaniasis is based on the use of toxic heavy metal based compounds, particularly pentavalent antimonials. However, these compounds must be

administered over prolonged periods and are often associated with serious side effects including cardiotoxicity, pancreatitis and musculoskeletal affections when used at the therapeutic doses. Other treatments for leishmaniasis such as Amphotericin-B and pentamidine are associated with multiple adverse side effects such as bone marrow suppression, renal toxicity and glucose metabolism disturbances. The only potential oral treatment, miltefosine, is still in clinical trials and is a potential teratogen (Croft & Coombs, 2003; Chan-Bacab & Pena-Rodriguez, 2001; Osorio et al, 2007). In Brazil an interministerial regulation (Nº 1.429/2008) prohibits the treatment of visceral leishmaniasis canine with products for human use or not registered with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Current visceral leishmaniasis (VL) control programs in Brazil include the infected dog euthanasia but, despite this strategy, the incidence of human VL is still increasing. Due to the shortcomings described above, there remains a pressing need for new anti-leishmanials (Lemos et al, 2008)

The use of medicinal plants for treatment, cure and prevention of diseases is one of the oldest form of medicinal practice. According to The World Health Organization (WHO), in the 1990s 65-80% of the population of developing countries depended on medicinal plants as the only way to treat health problems (WHO, 2008; Lemos et al, 2008). Plants that are traditionally used for several disease treatments caused by protozoa are attracting attention in tests against different *Leishmania* species (Tempone et al, 2005).

Leishmanicidal acetogenins and alkaloids from Annonaceae species have demonstrated the great potential of this plant family as a source of new leishmanicidal agents (Chan-Bacab & Pena-Rodriguez, 2001; Tempone et al, 2005), therefore the aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effectiveness of extracts and constituents from *A. squamosa* leaves and *A. muricata* seeds in the promastigote and amastigote forms of *Leishmania (L) chagasi*.

Material and Methods

Plant material

Leaves of *A. squamosa* were collected from the Ceará State University campus and seeds of *A. muricata* were collected from a private farm in Fortaleza, Ceará State, Brazil. Aerial parts of both plants were deposited in the Prisco Bezerra Herbarium under number 43604 and 43951 respectively.

Extraction procedure

The plant materials (2 Kg) were powdered, air-dried and immersed in methanol : H₂O (80:20, 1.5 l) and left for 7 days at room temperature. After this period the solvent was eliminated by rotative evaporator leaving the methanol extract (ME, 320 g). Part of ME (150 g) was dissolved with 10% phosphoric acid and then washed with n-hexane for extraction of fatty material. After being alkalinezed (pH 9) with ammonium hydroxide, the aqueous acid solution of ME was partitioned with dichloromethane, and tested with Dragendorff reagent until a negative reaction was seen. The dichloromethane phase was dried over sodium sulfate and concentrated under reduced pressure until completely dry to obtain the total alkaloids extract (AE, 0.58g). This extract was submitted to silica gel column chromatography eluted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol in mixtures of increasing polarity. Fractions were collected and compared by thin layer chromatography, using Dragendorff's reagent for spraying the plates. A second portion of methanol extract was submitted to silica gel column chromatography using the same above solvent elution sequence. The fractions were collected and t.l.c. plates were sprayed with reagents for alkaloids (Dragendorff's) and

acetogenins (Kedde's). Two main compounds were isolated and characterized by spectroscopic analysis and comparison with literature data.

Spectral analysis of isolated compounds

IR spectra were recorded on The Perkin Elmer FTIR spectrum 100 spectrophotometer and the values expressed in cm^{-1} . NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 spectrometer in CDCl_3 .

Parasites

Leishmania (L.) *chagasi* (M 6445 strain) promastigotes were cultured in M199 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 5% male human urine at 24 °C. The amastigotes were obtained from RAW cells infected with promastigote in the ratio of 1:10 (macrophage/promastigote) and kept in a CO_2 humidified incubator for 72 hours and then analyzed in light microscope to confirm infection.

Leishmanicidal activity

Test against promastigotes - In order to determine the 50% Effective Concentration (EC_{50} value) an adapted methodology from Tempone (2005) was used. The compounds were dissolved previously in ethanol at concentration of 0.2% and diluted with M199 medium in 96-well microplates. The assay was performed in the concentrations 100, 50, 25, 12.5 e 6.25 $\mu\text{g/ml}$. Each concentration was tested three times and repeated three times. Promastigotes were counted in a Neubauer haemocytometer and seeded at $1 \times 10^6/\text{well}$ with a final volume of

156 ml. Controls with ethanol and without drugs were performed. Pentamidine was used as a standard drug. The plates were incubated at 24 °C for 24h and the viability of the promastigotes was observed by morphology in a light microscope. MTT (5 mg/ml) was dissolved in PBS, sterilized through 0.22 mm membranes and then 20 µl were added in a 96 well plate and left at 37°C for 4 h. Promastigotes were incubated without compounds and used as control. Formazan extraction was performed using 10% SDS (100 ml/well) at 24°C for 18 h and the optical density (OD) was determined in a Multiskan MS (UNISCIENCE) at 570 nm.

Test against amastigotes - Concerning the amastigote in vitro model, the macrophages were infected after 24 hours incubation in a 96 well microplate, at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator with promastigote forms of *L. chagasi* in stationary phase at a ratio of 10 parasites per macrophage, to obtain 87% of infected macrophage. Eighteen hours after the promastigote had entered in the macrophage, the free promastigotes were eliminated and intramacrophagic amastigotes were treated with 100 µg/ml of the compounds. Macrophages incubated without drugs were used for control and glucantime was used as a standard drug at two concentrations, 25 and 300 µg/ml. After 24 hours, an in situ assay was performed to evaluate the compounds activity.

For the in situ assay an adapted methodology from Piazza (1994) was used. The cells were incubated with 0.01% saponin in PBSA, containing 1% bovine serum albumin for 30 min. After blocking the wells for 30 min with 5% defatted milk (Nestlé) in PBSA, the cells were incubated at 37°C for 1 h with serum from a rabbit immunized with saline extract of *L. chagasi* promastigotes, and collected 30 days after the infection. The serum employed was diluted at 1:500 and pre-absorbed with 10% fetal calf serum (FCS) at 22°C for 1 h. After washing the wells three times with 0.05% Tween 20 in PBSA, peroxidase-conjugated goat

anti-rabbit IgG (Sigma Chemical Co.), diluted 1:5000 in 5% defatted milk was added and left at 37°C for 1 h. The wells were washed three times, and then o-phenylenediamine (0.4mg/ml) and 0.05% H₂O₂ were added. The solution was then transferred to ELISA microplates. The reaction was then stopped by adding 1 M HCl and the plates read at 492 nm in a Titertek Multiskan ELISA reader.

Statistical analysis

The EC₅₀ values at 95% confidence interval were calculated using a non-linear regression curve using GraphPad Prism 4.0 statistical software. All data were tested three times and repeated three times.

3. Results and Discussion

Chromatography of *A. squamosa* extracts led to the isolation of *O*-methyarmepavine (**1**), a benzyliisoquinolinic alkaloid (Bhakuni et al, 1979; Bhakuni et al 1972) and a C₃₇ trihydroxy adjacent bistetrahydrofuran acetogenin (**2**) (Fig 1). This acetogenin was firstly isolated from *A. squamosa* seeds and showed anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*, the main nematode in small ruminants from Northeastern Brazil (Souza et al, 2007). The structure of compounds was established mainly by NMR spectral analysis and comparison with literature data and authentic sample.

Compound **1** was isolated as a brown solid: m.p.: 49.9 - 50.7 °C; IR (KBr) ν_{max} 3402, 2935, 1612, 1514, 1460, 1250, 1118, 1068, 1033, 833 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 5.83 (H1), 6.58 (H4, s), 2.2-2.4 (H5, m), 3.10 (H6a, d, 7.0 Hz), 3.39 (H6b, t, 7.15 Hz), 4.32 (H7a, m), 2.78 (H8, t, 6.4 Hz), 7.0 (H9/H13, d, 8.4), 6.79 (H10/H12, d, 8.4Hz), 3.48 (OCH₃), 3.82 (OCH₃), 3.77 (OCH₃), 2.64 (N-CH₃) and ¹³C NMR 65.05 (C1), 149.45 (C2), 147.49 (C3),

111.24 (C4), 22.02 (C5), 44.94 (C6), 65.45 (C7a), 40.25 (C8), 114.27 (C9/C13), 131.17 (C10/C12), 159.21 (C11), 122 (C14), 121 (C15), 122 (C16), 55.72 (OCH₃), 56.06 (OCH₃), 55.86 (OCH₃), 40.44 (N-CH₃).

Compound **2** was isolated as a viscous oil: IR (KBr) ν_{max} 3418, 2927, 2855, 1748, 1652, 1463, 1319, 1118, 1068, 1028, 953, 877, 756, 666 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) 2.32 (H3, t 8.1), 1.55 (H4, m), 4.91 (H5, m), 1.55 (H6, m), 1.25 (H7, m), 1.25 (H8-12, m), 1.25 (C13, m) 1.60 (H16, m), 4.91 (H15, m), 4.04 (H16, m), 1.99 (H17a, m), 1.60 (H17b, m), 1.98 (H18a, m), 1.65 (H18b, m), 3.93 (H19, m), 3.93 (H20, m), 1.98 (H21a, m), 1.65 (H21b, m), 1.98 (H22a, m), 1.65 (H22b, m), 4.04 (H23, m), 4.91 (H24, m), 1.60 (H25, m), 1.25 (H26-33, m), 0.87 (H34, t 6.6), 7.02 (H35, s), 5.05 (H36, m), 1.39 (H37, d, 6.8), 2.08, 2.05, 2.03 (CH₃C=O) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) 173.9 (C1), 134.2 (C2), 26.0 (C3), 33.0 (C4), 74.0 (C5), 33.8 (C6), 25.1 (C7), 29.5-29.1 (C8-12), 25.1 (C13), 30.8 (C14), 75.0 (C15), 80.0 (C16), 27.3 (C17), 28.0 (C18), 81.2 (C19), 81.6 (C20), 28.2 (C21), 27.3 (C22), 80.3 (C23), 75.2 (C24), 30.8 (C25), 25.2 (C26), 29.5-29.1 (27-31), 31.7 (C32), 22.5 (C33), 14.0 (C34), 148.8 (C35), 77.5 (C36), 19.1 (C37), 21.0, 21.1, 21.2 (CH₃C=O). EIMS 70 eV m/z : 481(3), 341 (5), 327 (7), 281 (45), 253 (12), 155 (5), 111 (8), 85 (32), 71 (57), 57 (72), 43 (43).

In the search for new drugs with leishmanicidal activity, *A. squamosa* extracts were tested against *L. chagasi*. In this study, pentamidine was used as standard drug and showed an EC₅₀ value of 1.63 µg/ml. In the promastigote assay, methanolic extract containing acetogenins and alkaloids from *A. squamosa* showed an EC₅₀ value of 26.43 µg/ml and alkaloid fraction from *A. squamosa* containing mainly *O*-methyarmepavine showed an EC₅₀ value of 73.31 µg/ml (Fig. 2). *A. muricata* metanolic extract showed an EC₅₀ value of 54.93 µg/ml (Fig 3) and reduced the parasite burden in 11,11% in 100 µg/ml dose. The standard

drug used was glucantime, which reduced the parasite burden by 12% at 30 µg/ml and 100% at 300 µg/ml.

Isoquinoline and benzyloisoquinoline analogues are the main leishmanicidal alkaloid types in Annonaceae family. The benzyloisoquinolinic alkaloids are widely distributed in nature and they have been isolated from different plants commonly used in traditional medicine for the treatment of parasitic diseases. Bisbenzyloisoquinolinic alkaloids isolated from the stem bark of *Guatteria boliviana* have also been reported to show moderate activity when tested against promastigotes of *L. donovani*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* (Chan-Bacab & Pena Rodriguez, 2001).

Berberine, a quaternary isoquinolinic alkaloid has been used in the clinical treatment of leishmaniasis, malaria and amebiasis for more than 50 years and has shown *in vitro* and *in vivo* response against many species of *Leishmania*. This alkaloid at concentration of 10 µg/ml, eliminates effectively *L. major* parasites in peritoneal mice macrophages (Aniszewski, 2007; Phillipson et al, 1991). Another isoquinolinic alkaloid, isoguattouregidine isolated from *Guatteria foliosa*, when tested against *L. donovani* and *L. amazonensis* caused lyses of the parasite cell membrane, being evaluated at a concentration of 100 µg/ml. Anonaine and liriodenine obtained from roots and trunk bark of *A. pinescens* showed an EC₅₀ value of 100 µg/mL against promastigotes of *L. brasiliensis*, *L. amazonensis* and *L. donovani* (Mahiou et al., 1994).

More than 160 different types of acetogenins are found in the Annonaceae family. Grandic et al (2004), using different species of Annonaceae, isolated 12 containing mono and bis-THF ring which were tested against promastigotes and amastigotes of *L. donovani*. The results of the study against promastigotes showed a range between 2.5 and 47.3 µM. Rollinistatin was the most effective against amastigote with an EC₅₀ 2.5 µM. Some acetogenins with one THF ring, such as senegalene or two THF rings, such as squamocine,

asimicine and molvizarine isolated from seeds of *A. senegalensis* showed an activity against promastigote of *L. major* and *L. donovani* at 25-100 µg/ml. Waechter et al (1998) isolated nine acetogenins with one and two THF rings from the seeds of *A. glauca*: The activity against *L. donovni*, *L. braziliensis* and *L. amazonensis* was evaluated. The mono-THF ring acetogenins annonacin A and goniothalamycin showed activity against promastigotes with EC₁₀₀ value of 10 and 5 µg/mL, respectively.

The mechanisms of acetogenins are not entirely clear nevertheless it was demonstrated their potent inhibition of mitochondrial complex I. Acetogenins are inhibitors of NADH ubiquinone oxidoreductase, which is an essential enzyme in complex I leading to the oxidative phosphorylation in the mitochondria cell (Bermejo et al, 2005; González-Coloma et al, 2002; Takada et al, 2000). Alkaloids are able to alternate with DNA (Braga et al, 2007), and Founet et al (2000) observed the inhibition of an essential antioxidant *Leishmania* enzyme, Trypanothione reductase by bisbenzylisoquinoline alkaloids.

In this study the extracts of *A. squamosa* leaves and *A. muricata* seeds showed a EC₅₀ ranging between 26.43 – 73.31 µg/ml that is relevant when compared with previous reported studies. However C₃₇ trihydroxy adjacent bistetrahydrofuran acetogenin and *O*-methyldarmepavine are promising target molecules for further *in vivo* studies.

Acknowledgments

The authors thank to CENAUREMN of Federal University of Ceará for NMR spectra of compounds. The authors also thank Dr. Selma M. B. Jerônimo, Dr. Daniella R. A. Martins and Dr. Gloria R. G. Monteiro from biochemistry laboratory of Federal University of Rio Grande do Norte for technical support in the development of this work.

References

- Croft, S.L., Coombs, G.H., 2003. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advancing the search for novel drugs. *Trends in Parasitol.* 19, 502-508.
- Ashford, D.A., Desjeux, P., Raadt, P., 1992. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol. Today* 8, 104-105.
- WHO; World Health Organization, [www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis /en/](http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/) (October 16th, 2008, date last accessed).
- Chan-Bacab, M.J., Pena-Rodríguez, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanial activity. *The Roy. Soc. of Chem.* 18, 674-688.
- Osorio, E., Arango, G.J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M.A., Giménez, A., Robledo, S., 2007. Antiprotozoal and citotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 111, 630-635.
- Lemos, E.M., Laurenti, M.D., Moreira, M.A.B., Reis, A.B., Giunchetti, R.C., Raychaudhuri, S., Dietze, R., 2008. Canine visceral leishmaniasis: Performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) in dogs with and without signs of the disease *Acta Trop.* 107, 205-207.
- Tempone, A.G., Borborema, S.E.T., Andrade, H.F., Gualda, N.C.A., Yogi, A., Cravalho, C.S., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Fischer, D.C.H., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids-producing families. *Phytomedicine* 12, 382-396.
- Piazza, R.M.F., Andrade, H.F., Umezawa, E.S., Katzin, M., Stolf, A.M.S., 1994. In situ immunoassay for the assessment of *Trypanosoma cruzi* interiorization and growth in cultured cells. *Acta Trop.* 57, 301-306.

- Bhakuni, D.S., Tewari, S., Dhar, M.M., Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. *Phytochemistry* 18 (9), 1584-1586.
- Bhakuni, D.S., Tewari, S., Dhar, M.M., 1972. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. *Phytochemistry* 11, 1819-1822.
- Souza, M.M.C., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Costa, C.T.C., Silva, A.R.A., Braz-Filho, R., 2007. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. seeds. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 80 (2), 271-277.
- Phillipson, J.D., Wright, C.W., 1991. Medicinal plants against protozoal diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 18–21.
- Queiroz, E.F., Roblot, F., Cave, A., Paulo, M.D., Fournet, A., 1996. Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *J Nat Prod* 59, 438-440.
- Aniszewski, T. (Ed), 2007. *Alkaloids – Secrets of Life*. Hardbound, Finland, 316 pp.
- Kapil, A., 1993. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Planta Medica* 59, 474.
- Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cave, A., Rojas de Arias, A., Inchausti, A., Yaluff, G., Fournet, A., 1994. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *J Nat Prod* 57, 890- 895
- Montenegro, H., Gutiérrez, M., Romero, L. I., Ortega-Barria, E., Capson, T.L., Cubillarios, L., 2003. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with Leishmanicidal activity. *Planta Medica* 69, 677–679.
- Alali, F.Q., Liu, X.X., McLaughlin, E.J.L., 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod* 62 (3), 504- 540.
- Grandic, S.R., Fourneau, C., Laurens, A., Bories, C., Hocquemiller, R., Loiseau, P.M., 2004. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomed. & Pharm.* 58, 388-392.

- Waechter, A., Yaluff, G., Inchausti, A., 1998. Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytothe. Research* 12, 541-544.
- Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E., Cortes, D., 2005. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep* 22, 269-313.
- González-Coloma, A., Guadano, A., Inês, C., Martínez-Díaz, R., Cortez, D., 2002. Selective Action of Acetogenin Mitochondrial Complex I Inhibitors. *Z Naturforsch* 57, 1028-1034.
- Takada, M., Kuwabara, K., Nakato, H., Tanaka, A., Iwamura, H., Miyoshi, H., 2000. Definon of crucial structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioch et Bioph acta* 1460, 302-210.
- Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., Matos, M. O., Moreira, F. O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in tradicional medicine in Brazil. *J of Ethnopharmacol.* 111, 396-402.
- Fournet, A., Rojas, A., Ferreira, M.E., Nakayama, H., Torres-de-Ortiz, S., Schinini, A., Samudio, M., Vera-de-Bilbao, N., Lavault, M., Bonte, F., 2000. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13 (3), 189–6.

Fig. 1 - Chemical structure of compounds from *A. squamosa* leaves present in leishmanicidal extracts, *O*-methyarmepavine (1) and bistetrahydrofuran acetogenin (2).

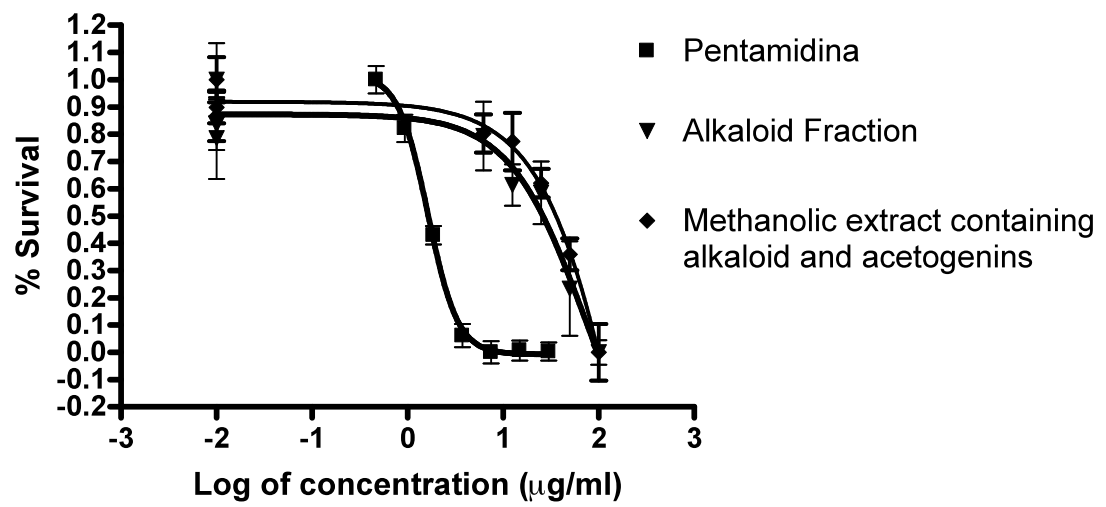


Fig 2 - Determination of the EC_{50} value of *A. squamosa* extracts against *L. chagasi* promastigote

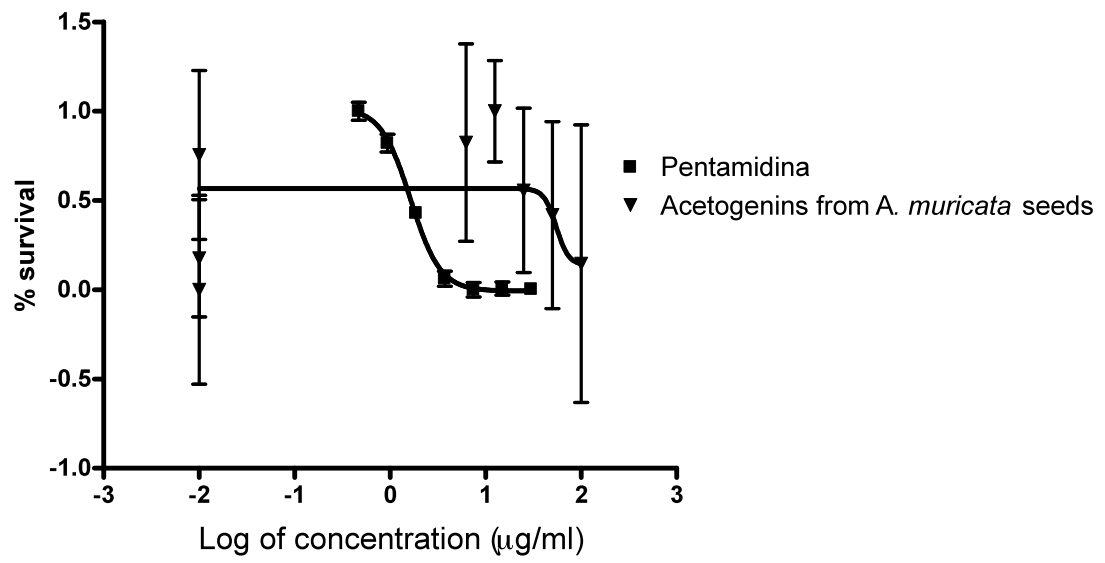


Fig 3- Determination of the EC_{50} value of *A. muricata* methanolic extracts against *L. chagasi* promastigote

CONCLUSÕES

Acetogeninas com anéis bis-THF e o alcalóide benzilisoquinolínico *O*-metilarmepavine foram extraídos das folhas de *A. squamosa* e suas estruturas químicas foram determinadas por análise espectroscópica. Estes compostos apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *L. chagasi*.

Acetogeninas extraídas das sementes da *A. muricata* apresentaram ação contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi*.

Acetogeninas com anéis bis-THF e alcalóides benzilisoquinolínicos são moléculas promissoras no estudo de plantas com potencial leishmanicida

PERSPECTIVAS

O estudo mais completo do potencial leishmanicida da *Annona squamosa* e *Annona muricata* através do isolamento dos diversos constituintes de todas as partes destas plantas para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo*.

Para futura aplicação destes materiais em cães faz-se necessário o estudo pré-clínico com animais de laboratório.

Uma completa elucidação da atividade leishmanicida dos compostos químicos será possível com a avaliação do seu mecanismo de ação

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALALI, F.Q., LIU; X.X., MCLAUGHLIN; E J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J Nat Prod.**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999
- ALVES, W.A; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004
- ALENCAR, J. E., Calazar Canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil, Fortaleza: {s. n.}, 1959
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. Cerrado espécies vegetais úteis. Planatina, Distrito Federal, **Editora da Embrapa**, 1998.
- ALVAREZ-GONZALEZ, I., GARCÍA-AGUIRRE, K.K, MARTINO-ROARO, M., ZEPEDA-VALLEJO, G., MADRIGAL-BUJAIDAR, E. Anticarcinogenic and genotoxic effects produced by acetogenins isolated from *Annona muricata*. **Toxicology Letters**, v. 118, p. S228, 2008
- ALVES, R. E.; FILGUIERAS, H. A.. C.; MOURA, C.F.H. Org. Caracterização de frutas nativas da América Latina. Jaboticabal: UNESP/SBF, 2000.
- AMADOR, M.C.V., RODRÍUEZ, F.M., RODRÍGUEZ, Z.M., GUERRA, M.J.M., BARREIRO, M.L. Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatória y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. **Rev. Cubana Plant Med.**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2006
- AMOROZO, M.C.M., Uso e Diversidade de Plantas Medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil, **Acta Botânica Brasileira**, v. 16, n. 2, p. 189-103, 2002
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids – Secrets of Life**. 1ed p. 334, 2007

ARAÚJO, M.S.S., Alterações imunológicas no sangue periférico de cães submetidos à imunoprofilaxia para Leishmaniose Visceral Canina. **Tese de Doutorado**, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG. Belo Horizonte. 2006.

ASHFORD, R.W; DESJEUX, P.; DE RAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8, p. 104-105, 1992.

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

BARATA, L.E.S., SANTOS, L.S., FERREIRA, P. H., PHILLIPSON, J.D., PAINE, A. & CROFT, S.L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p 589-595, 2000.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p. 328-337, 2004.

BERGMANN, B.R., COSTA, S.S, MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal Association for the Advancement of Science**, v. 49, p 395-402, 1997.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat Prod Rep.**, v. 22, p.269-303, 2005.

BEZERRA, J.L., COSTA, G.C., LOPES, T.C., CARVALHO I.C.D.S., PATRÍCIO F.J., SOUSA, S.M., AMARAL, F.M.M., REBELO, J.M., GUERRA, R.N.M., RIBEIRO, M.N.S., NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 631-637, 2006.

BHAKUNI, D.S., TEWARI, S., DHAR, M.M. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1819-1822, 1972.

BHAKUNI, D.S., TEWARI, S., DHAR, M.M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 9, p. 1584-1586, 1979.

BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A., Reactive oxygen and reactive nitrogen in innate and specific Immunity. **Current Option in Immunology**, v. 12, p. 64-76, 2000.

BRAGA F.G., BOUZADA, M. L. M., FABRI, R. L., MATOS, M. O., MOREIRA, F. O., SCIO, E., COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in tradicional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRAVO, C. Doença silvestre chaga aos grandes centros urbanos. **Rev. Pesquisa Médica: do laboratório à prática clínica**. n.2, p. 47-51, 2007

BRUNET, L. R., Nitric oxide in parasitic infections. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1457-1467, 2001.

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

CASTRO, R. M. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 55, n. 2, p. 87-89, 1980.

CECHIEL FILHO, V., YUNES, R. A., Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-106, 1998.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **The Royal Society of Chemistry**, v. 18, p. 674-688, 2001.

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

COSTA FILHO, A. V; LUCAS, I. C; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (leishmania) amazonensis*. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.**, v. 41, n. 4 p. 424-427, 2008

DEANE, L. M; DEANE, M.P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral-estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Tese (Livre Docência), **Serviço Nacional de Educação Sanitária**, Rio de Janeiro, 1956.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 4, p.149-212, 1962.

FAGUNDES; F.A; OLIVEIRA; L.B. de; CUNHA; L.C; VALADARES; M.C; *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.24-29, 2005.

FOURNET, A., ROJAS DE ARIAS, A., FERREIRA, M.E., NAKAYAMA, H., TORRES DE ORTIZ, S., SCHININI, A., SAMUDIO, M., VERA DE BILBAO, N., LAVAUULT, M., BONTE, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 13, n. 3, p. 189–195, 2000

GAMA, M.E.A., BARBOSA, J.S., PIRES, B., CUNHA, A.K.B., FREITAS, A.R., RIBEIRO, I.R., COSTA, J.M.L. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Publica**, v. 14 n. 2 p. 381-390, 1998.

GIL, L.H.S.; BASANO, S.A.; SOUZA, A.A.; SILVA, M.G.S.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E.A.; CAMARGO, L.M.A.; Recent observations on the sandfly (Díptera: Psychodidae) fauna of the state of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisi* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p. 751-75, 2003.

GILLESPIE, S., PEARSON R. D., **Principles and practice of clinical parasitology**. 1^o Edição, Copyright 2001.

GLEYE, C., RAYNAUD, S., HOCQUEMILLER, R., LAURENS, A., FOURNEAU, C., SERANI, L., LEPRÉVOTE, O., ROBLOT, F., LEBOEUF, M., FOURNET, A., ARIAS, A.R., FIGADÈRE, B., CAVÉ, A. Muricadienin, muridienins and chatenaytrienins, the early precursors of annonaceous acetogenins. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 749-754, 1998.

GLEYE, C., LAURENS, A., HOCQUEILLER, R., LEPRÉVOTE, O., SERANI, L., CAVÉ, A., Cohibins A and B, acetogenins from roots of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8 p. 1541-1545, 1997.

GRAMICCIA M., GRADONI L., The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169-1180, 2005

GRANDIC, S.R., FOURNEAU, C., LAURENS, A., BORIES, C., HOCQUEMILLER, R., LOISEAU, P.M. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine & Pharmacology**, v. 58, p. 388-392, 2004.

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

GUPTA; R.K; KESARI; A.N; MURTHY; P.S; CHANDRA; R; TANDON; V; WATAL;G; Hypoclycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animal. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v.99, p. 75-81, 2005.

HOPP, D.C., ALALI, F.Q., GU, Z., McLAUGHLIN, J.L. Mono-THF ring annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 803-809, 1998.

JAFFE, C.L. & GREENBLAT. Vaccine development against the intracellular parasite *Leishmania*. In: Cryz, S.J. **Vaccines and Immunotherapy**. Pergamon Press, 1991.

KAPIL, A. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. **Planta Medica**, v. 59, n. 5, p. 474, 1993.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIE`RGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 11, p. 15–21, 1997

KIM, G., ZENG, L., ALALI, F., ROGERS L.L., WU, F., SASTRODIHARDJO, S., McLAUGHLIN, J.L. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 565-571, 1998.

KONNO, H., OKUNO, Y., MAKABE, H., NOSAKA, K., ONISHI, A., ABE, Y., SUGIMOTO, A., AKAJI, K. Total synthesis of *cis*-solamin A, a mono-tetrahydrofuran acetogenin isolated from *Annona muricata*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 5, p. 782-785, 2008

LAISON, R.; SHAW, J.J.; LINS, Z.C. Leishmaniasis in Brazil. Iv. The fox, *Cerdocyon thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. **Trans. R. Trop. Med. Hyg.**, 63: 741-745, 1969.

LIMA, R.L.S., FERREIRA, G.B., WEBER, O.B., CAZETTA, J.O., Diagnose foliar da graviroleira (*Annona Muricata* L.): efeito da posição de ramos e folhas. **Ciência Agrotec.**, v. 31, n. 5, p. 1320-1325, 2007

MAAS, P.J.M., KAMER, H.M.V., JUNIKKA, L., SILVA, R.M., REINER, H. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80 p. 65-98, 2001.

MACIEL; M.A.M; PINTO; A.C; VEIGA Jr; V.F; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, nº3, p. 429-438, 2002.

MAHIOU V, ROBLOT F, HOCQUEMILLER R, CAVE A, ROJAS DE ARIAS A, INCHAUSTI A, YALUFF G, FOURNET A. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **J Nat Prod**, v. 57, p. 890- 895, 1994

MARZOCHI, M. C. A., Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.1, p.432-446, 1985

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, suppl. 1, 2004.

MESQUITA, Mariana Laundry de et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** , vol. 100, no. 7, p. 783-787, 2005

McDOWELL, M.J., SACKS, D.L., Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2 p. 438-443, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. 6º ed. Brasília,DF, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília,DF, 2003.

MOREIRA Jr; E.D; SOUZA; V.M.M de; SREENIVASAN; M; NASCIMENTO; E.G; CARVALHO; L.P de, Assessment of na optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v.122, p. 245-252, 2004.

NIETSCHKE, S., PEREIRA, M.C.T., ROCHA, M.V., DURÃES, M.N., MOTA, W.F., GONÇALVES, V.D., BRAZ, L.C., ABREU, S.C., LIMA, C. Diferentes horários de

polinização artificial no pegamento e qualidade de frutos de pinheira (*Annona squamosa* L.) no norte de Minas Gerais. **Unimontes Científica**, v. 5, n. 1, p. , 2003

NOGUEIRA; F.S; MOREIRA; M.A.B; BORJA-CABRERA; G.P; SANTOS; F.N; MENZ; I; PARRA; L.E; XU; Z; CHU; H.J; PALATNIK-DE-SOUSA; C.B; LUVIZOTTO; M.C.R. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v. 23, p. 4805-4819, 2005.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L., ESPADA-FERNÁNDEZ, R., DEA-AYUELA, M.A., TORRADO, J.J., BOLÁS-FERNANDEZ, F., ALUNDA, J. In vitro effect of new formulation of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Int. J. of Antimicrobial Agents**, v. 30, n 4, p. 325-329, 2007.

OSORIO, E.; ARANGO, G.J; JIMÉNEZ, N; ALZATE, F; RUIZ, G; GUTIÉRREZ, D; PACO, M.A; GIMÉNEZ, A; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and citotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **J. of Ethnopharmacology**, v.111, pp.630-635, 2007.

PADMA; P; PRAMOD; N.P; THYAGARAJAN; S.P; KHOSA; R.L; Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **J. of Ethno-Pharmacology**, v.61, p. 81-83, 1998.

PANDA, S; KAR; A; *Annona squomosa* seed extract in the regulation of hyperthyroidism and lipid-peroxidation in mice: Possible involvement of quercetin. **Phytomedicine**, v. 14, n 12, p. 799-805, 2007

PAULA, C.D.R., SAMPAIO, J.H.D., CARDOSO, D.R., SAMPAIO, R.N.R., Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Ver. da Soc. Bras. de Med. Trop.**, v. 36, n. 3, p. 365-371, 2003.

PHILLIPSON, J.D., WRIGHT, C.W. Medicinal plants against protozoal diseases. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 18–21, 1991.

QUEIROZ EF, ROBLLOT F, CAVE A, PAULO MD, FOURNET A . Pessoaine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. **J Nat Prod**, v.59, p.438-440, 1996

RATH, S., TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., JESÚS, M.N., MARZAL, P.C. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003

REIS, A. B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* portadores de diferentes formas clínicas de infecção. **Tese de Doutorado**, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG. Belo Horizonte. 2001.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S; MACÊDO, R.O; BARBOSA-FILHO, J.M; A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p. 514-535, 2005.

SESSA, P. A., FALQUETO, A., VAREJÃO, J.B.M., Tentativa de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana por meio do tratamento dos cães doentes. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, n. 4, p. 457-463, 1994.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. Boletim Epidemiológico, Leishmaniose Visceral, 2007.

SILVA, A.V.M., PAULA, A.A DE, CABRERA, M.A.A., CARREIRA, J.C.A., Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n.1, p. 324-328, 2005.

SOUZA, M.M.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M., COSTA C.T.C., SILVA A.R.A., BRAZ-FILHO R. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.80, n.2, p.271-277, 2008

SUFFREDINI, I. B., SADER, H.S., GONCALVES, A. G., REIS, A. O., GALES, A. C., VARELLA, A. D., YOUNES, R. N.. Screening of antibacterial extracts from plants native to

the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 379-84, 2004.

TEMPONE, A.G; BORBOREMA, S.E.T; ANDRADE Jr, H.F.de; GUALDA; N.C.de A; YOGI; A; CRAVALHO; 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. **Phytomedicine**, v.12, p. 382-390, 2005.

VEIGA JÚNIOR, V. F; PINTO A.C; MACIEL. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005

VOULDOUKIS, I., ROUGIER, S., DUGAS, B., PINO, P., MAZIER, D., WOEHLÉ, F. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 137-146, 2006

WAECHTER, A., YALUFF, G., INCHAUSTI, A., ARIAS, A.R., HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A., FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activities of acetogenins isolated from *Annona glauca*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 541-544, 1998.

WORLD HEALTH ORGANITATION (WHO), Weekly epidemiological record. n. 44 and 77, p. 365-372. Genebra, 2002.

WORLD HEALTH ORGANITATION (WHO).

<http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>, acesso agosto de 2008

YU, J., GUI, H., LUO, X., SUN, L. Murihexol, a linear acetogenin from *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1689-1692, 1998

ZENG, L., WU, F., GU, Z., McLAUGHLIN, J.L. Murihexocins A and B, two novel mono-THF acetogenins with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron letters**, v. 36, n. 30, p. 5291-5294, 1995