

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

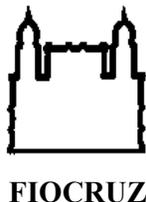
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**INIBIÇÃO DA ARGINASE DE *Leishmania* POR FRAÇÕES DO  
EXTRATO ETANÓLICO DE *Cecropia pachystachya***

**EBENÉZER DE MELLO CRUZ**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**Inibição da arginase de *Leishmania* por frações do extrato  
etanólico de *Cecropia pachystachya***

Ebenézer de Mello Cruz

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de mestre em ciências.

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**

Ao meu pai, *in memoriam*, que não pôde contemplar o resultado de “largar o gado” para ver seus filhos viverem oportunidades diferentes.

À minha mãe, que tanto sonhou com o retorno do seu filho ao lar, independente dos méritos alcançados.

## **Agradecimentos**

A Deus, meu eterno Criador e Redentor, que por meio do seu filho Jesus Cristo me salvou do pecado e deu-me uma nova vida em abundância. Anseio pelo dia que o verei voltar nas nuvens dos céus em poder e glória para agradecer-lo pessoalmente.

À minha família, que me apóiam em todas as minhas decisões, mesmo quando a dor da saudade nos fez chorar por causa da distância. Só é possível fazer ciência quando temos o maior alicerce da sociedade fortalecido, a família.

Ao meu orientador Dr. Marcos André Vannier dos Santos, que meu deu a oportunidade de desenvolver este trabalho. Oportunidade a um aluno vindo do Tocantins, com quem não possuía relações pessoais nem profissionais. Apenas acreditar em minha capacidade já me torna imensamente grato.

Ao Dr. Edson Roberto da Silva, pela orientação na Iniciação Científica, o qual me apresentou a enzima arginase e alguns extratos vegetais para tentarmos explorar o potencial das plantas medicinais.

Ao Dr. Frederico Guaré Cruz, pela imensa ajuda no fracionamento do extrato de *Cecropia*, onde sempre me alertou que seria uma caminhada difícil ao trabalharmos com essa planta, mas que tentou ao máximo encontrar métodos mais eficazes.

À equipe do LBP, Ana Lúcia, Daniel, Danielle, Diego, Eliomara, Eliete, Gustavo, Karla, Rafael Gomes, Thiara, Tayane, Vanessa e todos os demais, pela ajuda na resolução de problemas, padronização de protocolos e discussão de resultados.

À Dr<sup>a</sup>. Adriana Lanfredi Rangel, Cláudio Figueira e José Maurício pela ajuda no processamento e aquisição de imagens no microscópio eletrônico, na escrita da dissertação e das várias dúvidas tiradas no decorrer do mestrado.

À equipe GESNAT/Instituto de Química/UFBA, Isley, Tâmara, Miquéias, Mayara e Caline, que me ajudaram a realizar o fracionamento dos extratos e a entender os espectros de RMN.

Ao meu grande e melhor amigo, **Ciro Ribeiro Filadelfo**, enviado por Deus para me ajudar a continuar a caminhada do Mestrado longe de minha família e dos amigos. Momentos difíceis onde somente um irmão poderia estar ao meu lado, ouvindo meus sorrisos e enxugando minhas lágrimas.

A **Rafael Costa**, pelas horas de discussão científica e filosófica, com um olhar diferenciado sobre a vida e sobre a ciência. Amigos são a família que escolhermos.

Aos meus irmãos de fé, **Ana Maysa, Miriam, Ítalo, Saliza, Itamar, Vilândia** e todos os demais que fizeram minha estadia em Salvador se tornar mais agradável e saudosa, sempre ouvindo minhas frustrações e se alegrando com minhas vitórias.

Aos colegas das aulas de Pós-graduação, que compartilharam suas idéias e sempre nos ajudaram quando nós precisávamos de algum reagente ou material.

Aos professores do curso de Pós-graduação, pela atuação como facilitadores na aquisição do conhecimento científico.

Ao Centro de Pesquisas **Gonçalo Moniz, CAPES, CNPq, UFBA**, que nos auxiliaram com a infra-estrutura e recursos financeiros.

*“O temor do Senhor é o princípio de toda a sabedoria”*

(Salmos 111:10)

*“Senhor dê-me serenidade para aceitar as coisas que eu não possa mudar, coragem para mudar as coisas que eu possa e sabedoria para saber a diferença.”*

(Reinhold Niebuhr)

*“Vivendo um dia por vez, cada momento em sua hora.*

*Fazendo como Ele fez nesse mundo pecador, não como eu teria feito.*

*Acreditando que Ele tornará tudo certo se eu me submeter à vontade dEle,*

*assim serei extremamente feliz nessa vida e na próxima.*

*Amém.”*

(Mr. Brooks)

## RESUMO

A leishmaniose atinge cerca de 12 milhões de pessoas no mundo com aproximadamente 60 mil mortes por ano. Os fármacos utilizados são ineficazes e apresentam graves efeitos colaterais, tornando necessária a busca por novos fármacos. A busca por princípios bioativos torna-se mais eficaz quando direcionada pelo fracionamento guiado por bioensaios específicos. Um alvo promissor para busca por novos fármacos é a enzima arginase, pois a *Leishmania* deficiente em arginase é incapaz de produzir poliaminas, que são essenciais para a proliferação, diferenciação e síntese de macromoléculas, sendo assim o alvo selecionado para direcionar o fracionamento do extrato etanólico de *Cecropia pachystachya*, visto que já foi relatada a inibição da arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* por extratos desta espécie vegetal. Neste trabalho foi demonstrado que o extrato acetato de etila apresentou uma forte inibição da arginase de *L. (L.) amazonensis*, uma leve inibição da arginase de *Rattus norvegicus* e não apresentou toxicidade em esplenócitos. Com a análise ultraestrutural foi possível inferir que a inibição da arginase poderia estar provocando estresse oxidativo, visível com a formação de concreção eletrondensa na matriz mitocondrial e desorganização do k-DNA, possivelmente devido à inibição da arginase e conseqüente diminuição da biossíntese de poliaminas e tripanotona. Em análise computacional, as prováveis substâncias presentes no extrato acetato de etila (catequina, ácido clorogênico, epicatequina, isoorientina, isoquercetrina, isovitexina, orientina e procianidina B<sub>2</sub>) interagem com os aminoácidos ao redor do sítio ativo da arginase de *L. (L.) amazonensis* impedindo a entrada do substrato ou a saída dos produtos resultantes da reação o que acarretaria diminuição na velocidade máxima da reação. As frações da CLC03 parecem interferir em um outro mecanismo que promova a morte do parasito além da inibição da arginase. Após os fracionamentos realizados, as amostras analisadas ainda se mostravam como misturas quando analisadas por CLAE e RMN de <sup>1</sup>H. A diminuição do crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pode também promover a diminuição da infecção em macrófagos, mediado pela produção de NO.

Palavras-chaves: *Leishmania*, arginase, *Cecropia pachystachya*.

## ABSTRACT

Leishmaniasis affects approximately 12 million people worldwide with approximately 60,000 deaths per year. The drugs used are ineffective and have severe side effects, creating to need of the search for new drugs. The search for bioactive principles becomes more effective when directed by fractionation guided by specific bioassays. A promising target to search for new drugs is the enzyme arginase, because a arginase deficient *Leishmania* is unable to produce polyamines, which are essential for the proliferation, differentiation and synthesis of macromolecules, thus becoming the target used to direct fractionation of the extract of *Cecropia pachystachya*, as it has been reported on the inhibition of arginase *L. (L.) amazonensis*. The ethyl acetate extract showed a strong inhibition of arginase *L. (L.) amazonensis*, a low inhibition of arginase *Rattus norvegicus* and didn't show toxicity to splenocytes. By ultrastructural analysis was possible to infer that the inhibition of arginase could be causing an oxidative stress, visible with the formation of electrondense deposits in the mitochondrial matrix and disorganization of k-DNA, possibly due to inhibition of arginase and consequent decrease of polyamines and trypanothione biosynthesis. In computer analysis, the possible compounds present in the ethyl acetate extract (catechin, chlorogenic acid, epicatechin, isoorientin, isoquercetrin, isovitexin, orientin and procyanidin B<sub>2</sub>) interact with the amino acids surrounding the active site of *L. (L.) amazonensis* arginase preventing the entry of the substrate or the release of the reaction products which would result in a decrease in of velocity reaction. The fractions of CLC03 seem to interfere with another mechanism that promotes the death of the parasite besides the arginase inhibition. After the fractionations performed, the samples were still mixtures when as determined by HPLC and <sup>1</sup>H NMR. The reduced growth of promastigotes of *L. (L.) amazonensis* may be associated to the reduction of infection in macrophages, mediated by NO production.

Key-words: *Leishmania*, arginase, *Cecropia pachystachya*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AI – arginase tipo I	NANC – não-adrenérgico não-colinérgico
AII – arginase tipo II	NO – óxido nítrico
ATP – adenosina trifosfato	NOS – óxido nítrico sintetase
CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa	PBS – tampão fosfato de sódio
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência	PMSF – fenilmetilsulfonilfluoreto
CLC – cromatografia líquida em coluna	RMN – ressonância magnética nuclear
DFMO – difluorometilornitina	Sb <sup>V</sup> – antimoniais pentavalentes
DMSO – dimetilsulfóxido	TE – tampão TRIS - EDTA
DMSO-d <sub>6</sub> – dimetilsulfóxido deuterado	TGF-β – fator de crescimento tumoral-beta
DNA – ácido desoxiribonucléico	Th – T helper
ECA – enzima conversora de angiotensina	TMS – tetrametilsilano
EDTA – ácido etileno diamino tetra-acético	TNF-α – fator de necrose tumoral-alfa
EEB – Extrato etanólico bruto	Tris - tris(hidróximetil)aminometano
FAD – flavina adenina dinucleotídeo	VC – volume de coluna
FMN – flavina mononucleotídeo	VHS – velocidade de hemossedimentação
HIV – vírus da imunodeficiência humana	Vmax – velocidade máxima
IC <sub>50</sub> – concentração inibitória de 50%	
IL – interleucina	
INF-γ – interferon gama	
IPTG – isopropiltiogalactopiranosídeo	
LC – leishmaniose cutânea	
LCD – leishmaniose cutânea difusa	
LMC – leishmaniose mucocutânea	
LPDC - leishmaniose dérmica pós-calazar	
LTA – leishmaniose tegumentar americana	
LV – leishmaniose visceral ou calazar	
MOPS – 3-[N-morfolino]ácido propanosulfônico	
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol	

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
1.1 Leishmaniose.....	11
1.1.1 Epidemiologia .....	11
1.1.2 Aspectos biológicos.....	12
1.1.3 Formas clínicas.....	14
1.1.4 Terapia da leishmaniose.....	16
1.2 Arginase e óxido nítrico sintetase em mamíferos .....	18
1.3 Arginase na família Trypanosomatidae .....	21
1.4 Fitoativos .....	24
1.5 Cecropia .....	26
2 OBJETIVO .....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 METODOLOGIA .....	32
3.1 Material vegetal.....	32
3.2 Preparação do extrato .....	32
3.3 Partição líquido-líquido .....	32
3.4 Cromatografia líquida em camada delgada .....	32
3.5 Cromatografia líquida em coluna aberta.....	33
3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
3.7 Ressonância magnética nuclear.....	33
3.8 Cultivo de Escherichia coli .....	34
3.9 Extração e purificação da arginase recombinante.....	35
3.10 Extração e purificação da arginase hepática .....	35
3.11 Inibição da atividade da arginase .....	36
3.12 Cinética enzimática.....	36
3.13 Parasitos .....	36
3.14 Avaliação da toxicidade em esplenócitos .....	37
3.15 Microscopia eletrônica de transmissão.....	37
3.16 Análise computacional da interação substâncias - arginase .....	38
3.17 Análise estatística .....	38
4 RESULTADOS.....	39

4.1 Extrato etanólico bruto .....	39
4.2 Extratos hexânico, diclorometânico, acetato de etila e butanólico .....	42
4.3 Extrato acetato de etila.....	42
4.4 Fração F01 .....	45
4.5 Frações B1 – B5 .....	46
4.6 Frações da CLC 03 .....	47
4.7 RMN de <sup>1</sup> H e CLAE.....	51
4.8 Cinética enzimática .....	54
4.9 Toxicidade em esplenócitos .....	54
4.10 Microscopia eletrônica de transmissão .....	56
5 DISCUSSÃO .....	57
6 CONCLUSÃO .....	64
7 BIBLIOGRAFIA.....	65

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. É uma doença de caráter zoonótico com diversas manifestações clínicas que dependem tanto da espécie do parasito quanto da resposta imune do hospedeiro (NEVES et al., 2000).

São transmitidos por dípteros da subfamília Phlebotominae dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, encontrados no Novo e Velho Mundo, respectivamente. Algumas destas espécies são peridomiciliares e vivem no lixo próximo a residências ou construções; outras vivem em vegetações espessas em áreas florestais. O mosquito-pólvora (*Lutzomyia* sp.) é capaz de realizar a hematofagia em diversos hospedeiros. Roedores, cães e/ou ocasionalmente outros animais servem como reservatórios para algumas espécies de *Leishmania* e os seres humanos para outras (REY, 2001).

A leishmaniose era uma doença que acometia principalmente animais silvestres, mas com o crescimento desordenado da população humana e a invasão de ecossistemas com grande número de vetores, o homem passou a integrar o ciclo do parasito. Com o crescimento acelerado da urbanização e formação de grandes centros urbanos, em detrimento do habitat natural do transmissor da doença, já é possível encontrar casos de leishmaniose em grandes cidades, onde tem se tornado um grande problema de saúde pública.

### 1.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose está entre as seis doenças infecto-parasitárias mais relevantes do mundo, sendo endêmica em 88 países (Figura 1). Estima-se que 12 milhões de pessoas sejam portadores de leishmaniose, com cerca de 2 milhões de novos casos a cada ano, acarretando uma mortalidade anual de 60.000 pessoas e com mais de 350 milhões de pessoas sob risco de contaminação (DAVIES et al., 2003; OMS, 2005).

A leishmaniose visceral (LV) ocorre em 65 países, com 90% dos casos ocorrendo em 5 países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. Quanto à leishmaniose tegumentar americana (LTA), 90% dos casos ocorrem em 7 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. A doença atinge principalmente as populações pobres desses países.

Embora existam métodos de diagnóstico e tratamento específico, grande parte da população não tem acesso a estes procedimentos, elevando os índices de mortalidade (OMS, 2005).

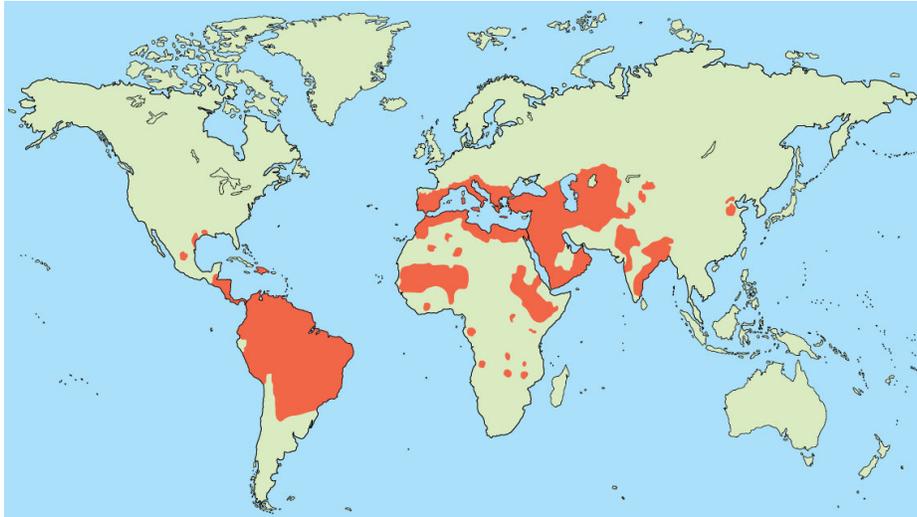


Figura 1. Distribuição global da leishmaniose (DAVIES et al., 2003).

O Brasil vem apresentando uma crescente taxa de incidência com aumento de regiões endêmicas nos últimos 25 anos. Em 2005, foram relatados 3.481 novos casos de LV e 26.014 de LTA (BRASIL, 2005).

A Bahia é o quinto estado brasileiro em número de casos de leishmaniose perdendo para o Pará, Maranhão, Ceará e Mato Grosso. Em 2005 foram registrados 449 casos de LV e 2011 casos de LTA (BRASIL, 2005).

### **1.1.2 Aspectos biológicos**

A transmissão da leishmaniose ocorre com a infecção do hospedeiro vertebrado quando a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo. Durante o hematofagismo, a fêmea corta com suas mandíbulas o tecido subcutâneo logo abaixo da epiderme, formando sob esta micro-hematomas, nos quais são inoculadas as formas promastigotas metacíclicas provenientes das regiões anteriores do trato digestivo. As formas metacíclicas são, então, fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, que entram em apoptose. Os corpos apoptóticos são fagocitados por monócitos/macrófagos, que após sofrerem modificações morfológicas e bioquímicas no fagolisossoma, se diferenciam em amastigotas. Nos macrófagos, as formas amastigotas se dividem até o rompimento da célula, e quando

livres podem parasitar novas células. Quando novamente o flebotomíneo realiza hematofagia no animal infectado adquire as formas amastigotas nos macrófagos e/ou parasitos livres, onde sofrem diferenciação para promastigotas no intestino do inseto, fechando o ciclo (Figura 2) (CHANG, 1983; DESJARDINS, 1995; NEVES et al., 2000; PETERS et al., 2008).

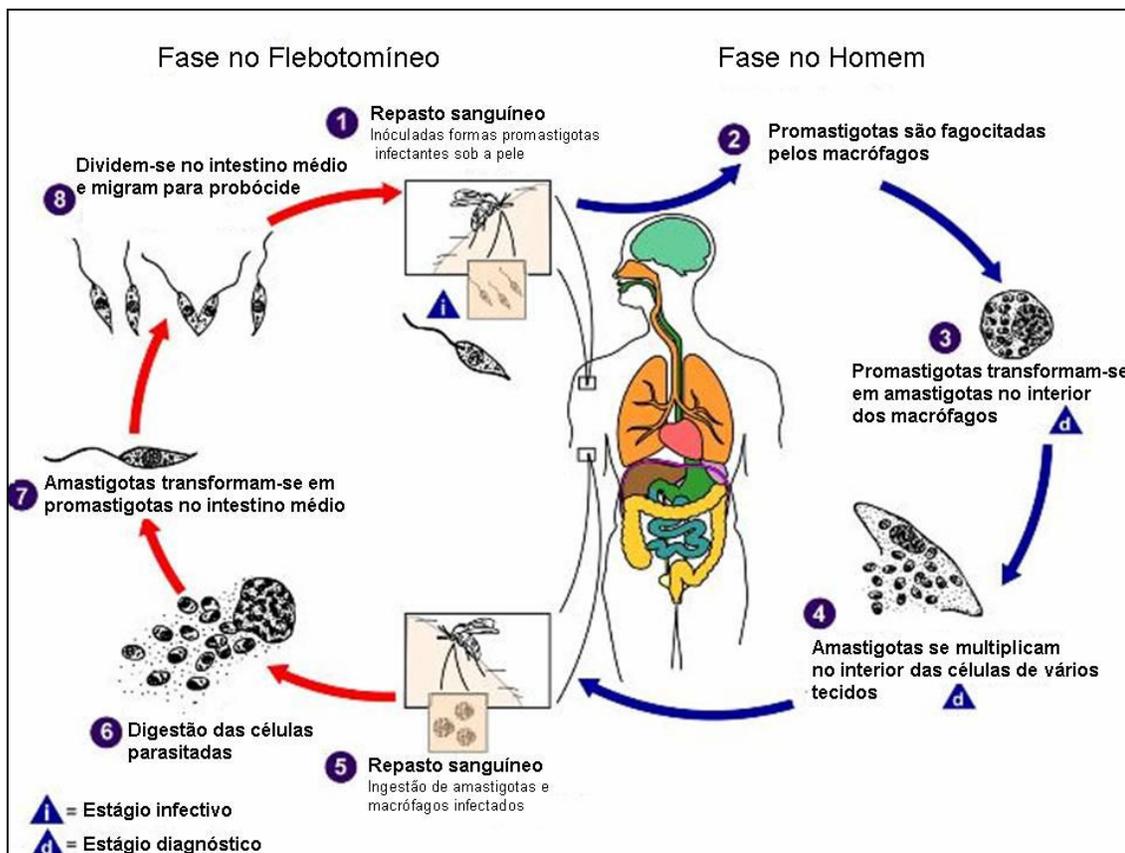


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Modificado de EICHNER, 2007).

No hospedeiro vertebrado, todas as espécies de *Leishmania* habitam células do sistema retículo endotelial (medula óssea, baço, fígado e linfonodos), enquanto que no hospedeiro invertebrado os parasitos habitam o intestino do inseto. A forma amastigota é intracelular obrigatória, com morfologia arredondada ou fusiforme de, no máximo, 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresenta um cinetoplasto e um flagelo rudimentar visto apenas em microscopia eletrônica. A forma promastigota é alongada, de 16-40  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  de largura, com um núcleo central, um cinetoplasto e com um flagelo bem desenvolvido. Ambas as formas, dividem-se longitudinalmente por fissão binária (NEVES et al., 2000). A forma promastigota pode se diferenciar em forma metacíclica, com alto grau de infectividade, rápido movimento, corpo pequeno e flagelo longo (SACKS & PERKINS, 1984).

Outra forma de transmissão possível é através de material infectado transmitido diretamente de uma pessoa para outra. Mais recentemente ficou evidente que a transmissão da leishmaniose visceral em pacientes com HIV no sul da Europa se deu em grande parte pelo compartilhamento de seringas contaminadas em usuários de drogas injetáveis (OMS, 2000).

A infecção experimental com *Leishmania (L.) major* em camundongos determinou claramente que a resistência e a susceptibilidade do hospedeiro à infecção são relacionadas, respectivamente, ao desenvolvimento das respostas de células Th1 e Th2. A maioria das leishmanioses provocadas em camundongos ocasiona pequenas lesões de cura espontânea; este fenômeno se dá pela expansão de células CD4 Th1, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ . Por outro lado alguns camundongos desenvolvem a doença na sua forma progressiva, sem cura espontânea, atribuída à expansão de células CD4 Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-10 e IL-13, resultando no desenvolvimento da doença sistêmica (RUSSEL, 1995; MOSSER & KARP, 1999).

Quando há uma predominância da resposta Th1, induzida por IL-12, ocorre um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que são indutores da óxido nítrico sintetase II (NOS II), que causa a morte do parasito mediada pela ação citotóxica do óxido nítrico (NO). Por outro lado, quando ocorre uma resposta mediada por Th2, induzida por IL-4, esta favorece a sobrevivência e multiplicação do parasito. A sobrevivência do parasito ocorre pela inibição da síntese de IL-12 e indução de IL-10 e TGF- $\beta$  nas células infectadas, que inibem a resposta Th1 (RUSSEL, 1995; MOSSER & KARP, 1999; BOGDAN, 2000).

### **1.1.3 Formas clínicas**

O gênero *Leishmania* compreende mais de 30 espécies, das quais cerca de 20 causam doenças em seres humanos. Segundo Ashford (2000), são cinco as principais doenças conhecidas coletivamente como leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose visceral ou calazar (LV) e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas englobando as formas cutânea, mucocutânea e cutânea difusa.

A LC aparece primeiramente como uma lesão persistente após a hematofagia e, gradualmente as lesões aumentam, ocorrendo formação de um granuloma no fundo da lesão, envolvendo a migração de leucócitos que isolam a área infectada, levando à necrose do

tecido. Usualmente é causada por *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) braziliensis*. O processo de necrose pode ser rápido, causando uma abertura larga e dolorida (especialmente em *L. (L.) major*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis*) ou pode ser indolor (*L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (V.) peruviana*). Em infecções com *L. (L.) major* podem ocorrer inúmeras lesões levando à desfiguração do local infectado. No Brasil, a LC é causada por *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (HEPBURN, 2000; NEVES et al., 2000; REY, 2001).

A LMC começa com uma lesão geralmente próxima à superfície da mucosa. A leishmaniose mucocutânea clássica é restrita às infecções por *L. (V.) braziliensis*. Caracteriza-se pelo aparecimento de lesões metastáticas nas mucosas, podendo causar desfiguração por ulceração progressiva, especialmente na região naso-buco-faríngea (GRIMALDI et al., 1989).

Um tipo de leishmaniose geralmente restrita à Venezuela, República Dominicana, Etiópia, Quênia e Brasil é a LCD, causada por *L. (L.) pifanoi*, na Venezuela e *L. (L.) amazonensis* no Brasil. Geralmente é uma manifestação da infecção com parasitos que causam LC simples. A doença é caracterizada por lesões disseminadas não ulceradas por toda a pele, com um curso crônico e progressivo por toda a vida do paciente, não respondendo aos tratamentos convencionais (REY, 2001; NEVES et al., 2000).

Na LV, causada por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* na Europa e Ásia, e *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* (relatada uma única vez por BARRAL et al., 1991) no Brasil, a doença é precedida por uma lesão na forma de uma ulceração no local da picada. Vários sinais clínicos da doença podem ser identificados, como: anemia, hepatoesplenomegalia, caquexia progressiva, febre irregular, leucopenia, plaquetopenia, hipergamaglobulinemia e aumento da velocidade de hemossedimentação (VHS). A leishmaniose visceral pode ser fatal e está associada a uma forte resposta imunológica, com uma taxa de mortalidade de 8-10% em pessoas tratadas adequadamente (GRIMALDI et al., 1989; NEVES et al., 2000).

Uma das seqüelas da leishmaniose visceral é a LDPC, onde 75% dos casos são em crianças menores que 5 anos, que pode aparecer no período de até dois anos após a cura completa da leishmaniose visceral. Aparece como nódulos ou pápulas hipopigmentados na pele e, usualmente, apresenta uma boa resposta à terapêutica. No Brasil, foi relatada apenas na década de 60 (GRIMALDI et al., 1991; NEVES et al., 2000).

### 1.1.4 Terapia da leishmaniose

Embora cerca de 90% de todas as doenças existentes sejam prevalentes em países tropicais, apenas 5% da pesquisa e desenvolvimento são dedicados à resolução destas infecções, visto que a maior parte da população destes países tem baixo poder aquisitivo e não haveria um retorno financeiro para as indústrias farmacêuticas (GODAL, 1994).

Diversas drogas têm sido reportadas como úteis no tratamento da leishmaniose (Figura 3), porém nenhuma delas apresentou plena eficácia e menor toxicidade a fim de destituir os antimoniais pentavalentes ( $Sb^V$ ) da posição de primeira escolha terapêutica desde a década de 50 (RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002; DAVIES et al., 2003).

Na Europa, o tratamento ocorre com a injeção de antimoniais como estibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup>) que contém antimônio pentavalente, atuando nas formas amastigotas, inibindo a síntese de ATP através da inibição da glicólise e da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (VAN-VOOHIS, 1990). Para ser efetivo deve ser administrado no mínimo por 20 dias, intravenoso, tanto para a leishmaniose visceral quanto para a cutânea. No Brasil, a droga de primeira escolha é o antimoniato de N-meglumina (Glucantime<sup>®</sup>), que possui uma janela terapêutica muito estreita e também pode apresentar uma fármaco-resistência. Os fracassos terapêuticos são cada vez mais reconhecidos e associados a efeitos indesejados. A alta toxicidade dos antimoniais pode levar pacientes à morte devido aos sérios efeitos adversos provocados (AHASAN et al., 1996; BRASIL, 2000).

O antimoniato de N-meglumina é indicado para o tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo  $Sb^V$ , as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina (BRASIL, 2000).

Podem ocorrer um ou mais efeitos colaterais, na seguinte ordem de frequência: artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastria, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Essas manifestações são geralmente discretas ou moderadas e raramente exigem a suspensão do tratamento (BRASIL, 2000).

Porém, na dose de 20 mg  $Sb^V$ /kg/dia, o antimonial pode atingir o limiar de toxicidade, podendo levar a alterações cardíacas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento. Por isso deve-se proceder ao acompanhamento eletrocardiográfico semanal e avaliação da função

renal, especialmente em pacientes acima de 50 anos (BRASIL, 2000).

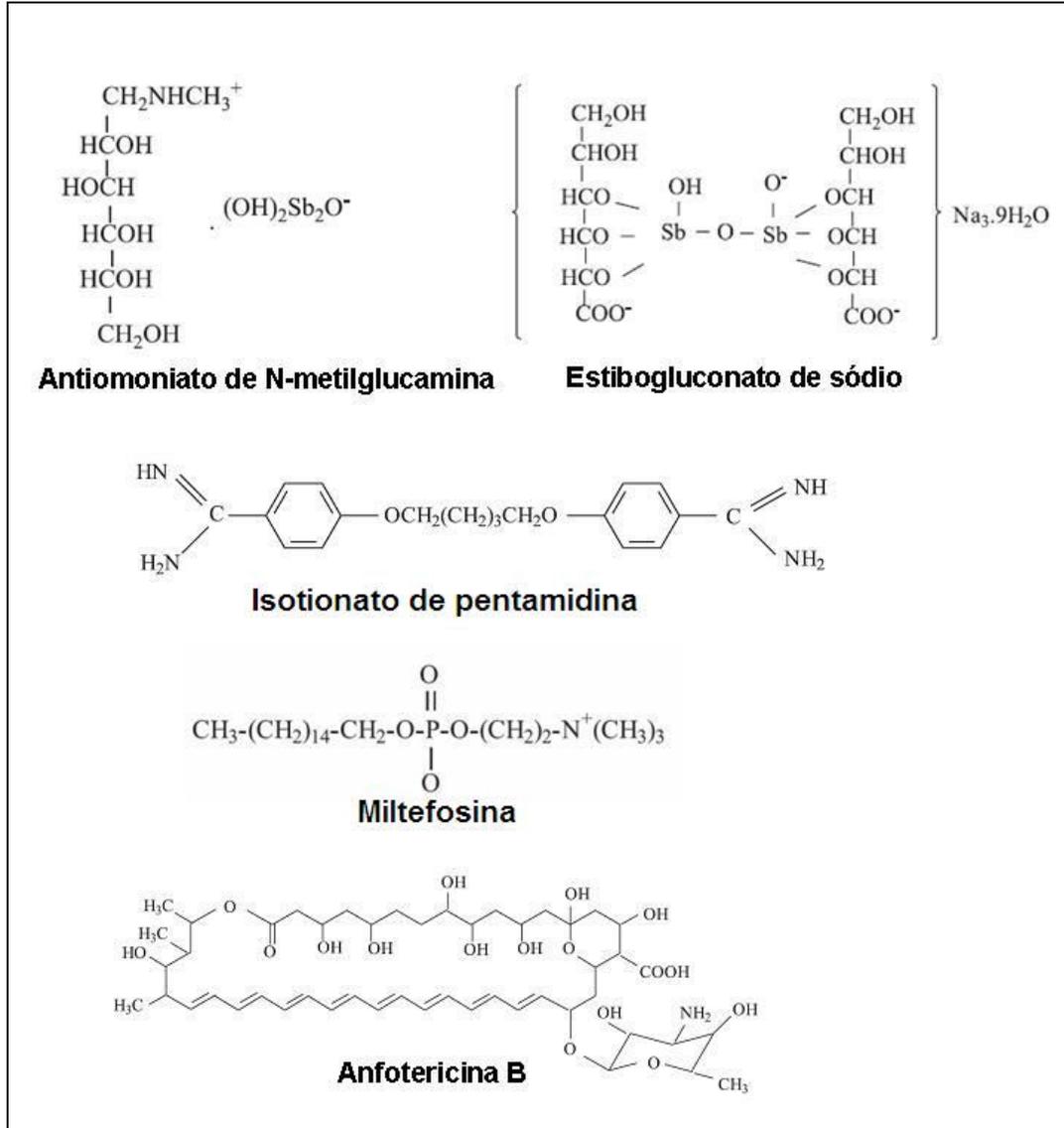


Figura 3. Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose (RATH, 2003).

A anfotericina B e a pentamidina são efetivas, mas constituem alternativas tóxicas. Contudo, o uso da anfotericina B lipossômica (AmBisome<sup>®</sup>), tornou-se uma alternativa bastante eficaz. A anfotericina B age se ligando ao ergosterol, principal esteroide de membrana de tripanossomatídeos, ocasionando assim, a permeabilização da membrana e morte do parasito (GRIMALDI & TESH, 1993).

A pentamidina atua como um análogo da espermidina, uma poliamina essencial em vários processos biológicos como diferenciação, divisão celular e síntese de tripanotona. A inibição da biossíntese e do transporte desta poliamina pode resultar em desequilíbrio

oxidativo e peroxidação de lipídeos (OUELLETTE et al., 2004). Na região amazônica a pentamidina é usada nos casos de LTA com ótima eficácia clínica (BRASIL, 2000).

Estas drogas apresentam consideráveis efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas, e em função dos quadros de toxicidade apresentados pelos pacientes, requerem acompanhamento médico rigoroso, impedindo assim, o uso fora de ambiente hospitalar (HERWALDT, 1999; HEPBURN, 2001).

A miltefosina, primeira droga oral para a terapêutica da leishmaniose é eficaz tanto na forma cutânea quanto visceral. Contudo, já foi relatada a existência de parasitos resistentes a este composto, além de alta toxicidade e efeitos adversos, tais como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas, dificultando assim, a adesão ao tratamento. No Brasil, a miltefosina não foi efetiva contra a LV, mas apresentou eficácia clínica em casos de LTA (CROFT et al., 2006; PEREZ-VICTORIA et al., 2006).

## **1.2 Arginase e óxido nítrico sintetase em mamíferos**

A arginase (L-arginina aminohidrolase) é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de L-arginina em L-ornitina e uréia (KREBS & HENSELEIT, 1932). A arginase está presente em grandes quantidades no fígado de mamíferos e também é encontrada em pequenas concentrações em animais uricotélicos (aves e répteis), plantas, protozoários e bactérias (HELLERMAN & PERKINS, 1935; HIRSCH-KOLB et al., 1971).

A arginase hepática é a enzima-chave do ciclo da uréia, uma via metabólica essencial para a remoção de amônia, uma base altamente tóxica resultante da degradação de proteínas (HERZFIELD & RAPER, 1976). Nos tecidos onde o ciclo da uréia é incompleto, a arginase regula a concentração de L-arginina e L-ornitina disponível para reações de biossíntese, entre elas a biossíntese de poliaminas, que são utilizadas como fatores de crescimento celular (YIP & KNOX, 1972).

A arginase requer um conjunto binuclear intacto de manganês para a hidrólise da L-arginina em L-ornitina e uréia. Embora as isoenzimas da arginase difiram nos termos de sua distribuição tecidual, localização celular e função metabólica, cada uma emprega um mecanismo metal-ativador do hidróxido para catálise (CHRISTIANSON, 2005).

Entre os mais importantes fatores que influenciam a atividade catalítica da arginase estão o pH e a natureza do metal bivalente de ativação. A curva de pH da enzima é uma

função particular do metal ativador. Diferentes curvas de pH são obtidas com  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$  como ativadores (MOHAMED, 1950). A dependência do pH no equilíbrio entre as formas binuclear e mononuclear de  $Mn^{2+}$ , na arginase de rato, pode refletir em um novo mecanismo de regulação metabólica (KUHN et al., 1991).

A arginase tipo I ou arginase hepática (AI) é uma enzima citossólica encontrada predominantemente no hepatócito, atuando preferencialmente no ciclo da uréia. A arginase tipo II (AII) de mamíferos é extra-hepática e localizada subcelularmente na matriz mitocondrial de outras células, incluindo macrófagos (JENKINSON et al., 1996; GOTOH et al., 1996; COLLELUORI et al., 2001).

A arginase AII tem ampla distribuição tecidual e desempenha um significativo papel no metabolismo de L-arginina. Diferentemente da arginase AI, a função primária da arginase AII é pertencer à rede de produção de L-ornitina, um precursor de poliaminas (LI et al., 2001; WU & MORRIS, 1998). Em pacientes com deficiência de arginase hepática, a atividade da arginase renal é aumentada de 7 a 40 vezes acima do normal (GRODY et al., 1993; IYER et al., 1998). Esta regulação da arginase AII aparentemente compensa a deficiência da arginase AI no ciclo da uréia, prevenindo uma severa hiperamonemia neonatal, característica da deficiência de outras enzimas do ciclo da uréia.

A óxido nítrico sintetase (NOS) é uma hemoproteína do tipo P-450, que contém flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo ( $FAD^+$ ) e é estabilizada por tetraidrobiopterina. O principal produto gerado pela NOS é o óxido nítrico, que tem produção endógena a partir da L-arginina. O óxido nítrico é gerado por várias células, incluindo as do endotélio, músculo liso e cardíaco e do sistema nervoso central (STRYER, 1996; ROSKOSKI, 1997).

O óxido nítrico endógeno exerce ações em diferentes sistemas, como: vasodilatação, ativando a guanil-ciclase e, assim, influenciando indiretamente na concentração de cálcio; inibição da aderência e agregação plaquetárias; efeitos no sistema não-adrenérgico não colinérgico (NANC), incluindo ereção peniana, controle nervoso da função do estômago e colo intestinal; defesa do hospedeiro incluindo a morte de patógenos; e efeitos citotóxicos como danos neuronais em acidentes vasculares cerebrais e em doenças neurodegenerativas (RANG et al., 2004).

Abd-El-Aleem e colaboradores (2000) sugeriram que a arginase e a NOS II estão ligadas a angiogênese em tecidos com úlceras crônicas venosas. A inibição da NOS II pode reverter os efeitos da destruição de tecidos pelo NO. A arginase expressada em níveis normais

promove a cicatrização de tecidos pela deposição da matriz (STUEHR et al., 1989).

Análises realizadas no citosol de células derivadas de insulinooma de rato e tratadas com IL-1 $\beta$  demonstraram um aumento da atividade de NOS II e diminuição da expressão de arginase, havendo aumento de L-arginina para a produção de NO, resultando em um duradouro efeito citotóxico (CUNNINGHAM et al., 1997). Boucher e colaboradores (1999) demonstraram que a formação de NO é modulada pela quantidade de L-arginina, o que está diretamente ligada à atividade da arginase.

A inibição de AII leva ao aumento de NO e relaxamento do tecido dos corpos cavernosos do pênis de rato, sugerindo que a inibição de AII leva ao aumento de concentrações de L-arginina no local para a produção de NO, sendo, portanto, um alvo potencial para o tratamento de distúrbios de musculatura, incluindo disfunção erétil (COX et al., 1999; COLLEUORI et al., 2001).

A biossíntese do óxido nítrico em macrófagos murinos também é regulada pela atividade da arginase I que é coordenada com a atividade da NOS, modulando a citotoxicidade dependente de NO (DAGHIGH et al., 1994; CORRALIZA et al., 1995; ALBINA et al., 1995). Em macrófagos, a ativação da NOS II gera NO suficiente para promover a morte celular por apoptose (ALBINA et al., 1993).

As arginases AI e AII podem estar envolvidas na regulação de várias ações citostáticas e citotóxicas em macrófagos ativados, mediadas pela síntese de NO (FELDMAN et al., 1993; KERWIN et al., 1995; CHANG et al., 1998).

Arginases AI e AII aparentemente são expressas constitutivamente em macrófagos murinos, entretanto diferentes estímulos podem modular os níveis de expressão para essas isoformas (BOUCHER et al., 1999). A arginase contribui para o funcionamento do sistema imune, uma vez que a L-ornitina é um precursor chave para poliaminas envolvidas na replicação celular (BOUCHER et al., 1999). A produção de ornitina/uréia aumenta durante o crescimento de tumores enquanto a atividade da arginase diminui durante a rejeição do tumor (MILLS et al., 1992).

Muitos resultados consistentes levaram à conclusão de que a via usada por macrófagos para metabolizar a L-arginina pode influenciar o tipo de resposta imune contra patógenos, parasitas e tumores (BOUCHER et al., 1999). A co-indução de arginase extra-hepática e NOS pelo mesmo estímulo (SONOKI et al., 1997), a identificação da arginase por supressores de NOS, e os componentes de co-regulação da expressão de ambos, NOS e arginases (CORRALIZA et al., 1995), suportam a hipótese de que a arginase pode ser essencial na

regulação da atividade da NOS pela modulação de concentrações de L-arginina local (MILLS et al., 1992; WANG et al., 1995).

Porém, estudos realizados por Kepka-Lenhart e colaboradores (2000) demonstraram que é possível alterar os níveis de arginase AI suficientemente para afetar a síntese de poliaminas sem afetar a síntese de NO induzido. Em macrófagos murinos ativados, a expressão da arginase AI não foi um fator determinante para indução de síntese de NO, porém foi um fator limitante para síntese de putrescina e espermidina.

As patologias geradas pelo mau funcionamento desse sistema enzimático e também o mecanismo da resposta final do sistema imunológico celular fazem desse sistema um interessante e fértil terreno no estudo da fisiologia de mamíferos.

### **1.3 Arginase na família Trypanosomatidae**

A degradação de aminoácidos em organismos terrestres, unicelulares ou pluricelulares, gera a amônia na forma de ácido úrico e uréia, compostos não tóxicos. Sendo que para excreção destes derivados é necessária uma menor quantidade de água comparada à eliminação direta da amônia, portanto a excreção de amônia na forma de uréia seria uma possível adaptação à escassez de água.

A arginase é uma das quatro enzimas que, por sua participação no chamado ciclo da uréia, é responsável pela eliminação de uréia a partir da ornitina em animais ureotélicos (KREBS & HENSELEIT, 1932).

Para os protozoários, organismos unicelulares geralmente encontrados em ambientes bem hidratados, a eliminação da uréia não deveria constituir um problema. De fato, na maioria dos protozoários estudados até o presente não se encontrou uréia ou ácido úrico em meios de cultivo. Dessa forma a ocorrência do ciclo da uréia nestes organismos poderia ser explicada pela atuação na síntese de L-arginina/L-ornitina.

Os estudos de caracterização das enzimas do ciclo da uréia ou ciclo L-arginina-ornitina em tripanosomatídeos revelaram diferentes constituições enzimáticas nesses organismos e este conjunto de enzimas integra um sistema multienzimático que atua na interconversão L-arginina-citrulina-ornitina. A atividade desse conjunto de enzimas, a necessidade de L-arginina, citrulina ou ornitina exógenas, a análise dos produtos de excreção e a ausência de enzimas mediadoras de síntese de ornitina a partir de ácido glutâmico, permitem sugerir que as funções primárias do ciclo nos tripanosomatídeos seja a síntese de L-

arginina e principalmente a produção de L-ornitina (CAMARGO et al., 1978; 1987; YOSHIDA & CAMARGO, 1978).

O fato surpreendente fica por conta da diferente expressão das enzimas do ciclo da uréia nos membros da família Trypanosomatidae, dependente do gênero a que pertencem. Assim, *Crithidia* possui arginase, citrulinase e arginino-succinato liase; *Leptomonas* possui apenas as duas primeiras; *Leishmania* possui apenas arginase; *Herpetomonas* possui ornitina-carbamiltransferase e citrulinase; *Trypanosoma* não possui nenhuma das enzimas citadas. A ornitina pode ser sintetizada a partir de L-arginina em reações mediadas pela arginase ou pelo sistema L-arginina-deiminase/citrulina hidrolase. Esse composto pode também ser produzido diretamente a partir de citrulina pela ação da citrulina hidrolase. A L-arginina por sua vez, pode ser sintetizada a partir de ornitina ou citrulina via ornitina-carbamiltransferase e arginino-succinato sintetase/liase. Assim, esses organismos possuem vias metabólicas distintas para a síntese de L-arginina e ornitina (CAMARGO et al., 1979; HEBY et al., 2007).

Em *Leishmania*, a síntese de poliaminas é essencial para o crescimento do parasito e infecção do hospedeiro. Promastigotas de *L. (L.) donovani* 'knockout' do gene da ornitina descarboxilase, uma enzima que atua na síntese de poliaminas, foi incapaz de crescer em meio deficiente de poliaminas. A transferência destas células para um meio deficiente de poliaminas causou uma rápida depleção de putrescina e tripanotiona, enquanto que a espermidina intracelular não foi afetada, o que pode indicar que a rota da tripanotiona restabeleceu os níveis de espermidina. A auxotrofia para poliaminas foi conseguida pela adição de putrescina ou espermidina, mas não pela adição de espermina. A adição de putrescina restaurou os níveis intracelulares de putrescina, espermidina e tripanotiona. Sendo que em *L. (L.) donovani* há uma menor quantidade de vias para conversão de poliaminas, que é presente em células humanas, ressalta-se o interesse no estudo da via das poliaminas (Figura 4) (JIANG et al., 1999; HEBY et al., 2007). Assim, a arginase também exerceria um papel no controle do crescimento do parasito.

Um mecanismo de defesa contra *Leishmania* é mediado por N<sup>0</sup>-hidroxi-L-arginina (LOHA), um inibidor fisiológico de arginase, gerado pela NOS II, que pode controlar a infecção celular de *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* (INIESTA, 2001).

Diferente de células humanas, promastigotas de *L. mexicana* expressam somente a enzima arginase, que exerce uma função vital no fornecimento de ornitina (precursor de poliaminas). *Leishmania* 'knockout' do gene da enzima arginase não produz ornitina e mostrou ser auxotrófica para ornitina ou poliaminas. A capacidade de proliferação foi

restaurada pela adição de baixas concentrações de putrescina, altas concentrações de ornitina ou pela complementação com arginase episomal. Assim, a arginase é essencial para viabilidade do parasito, sendo um alvo potencial para novas drogas (ROBERTS et al., 2004).

A seqüência completa do gene da arginase de *L. (L.) amazonensis* foi elucidada. Algumas diferenças foram encontradas entre o sítio ativo da arginase do parasito e de mamíferos, assim, essa diferença pode ser explorada para quimioterapia da leishmaniose (SILVA et al., 2002). Com a expressão do gene da arginase de *L. (L.) amazonensis* em *Escherichia coli*, e com os parâmetros bioquímicos estabelecidos, é possível buscar inibidores seletivos para arginase do parasito, o qual poderá ser útil para terapia da leishmaniose (SILVA et al., 2008).

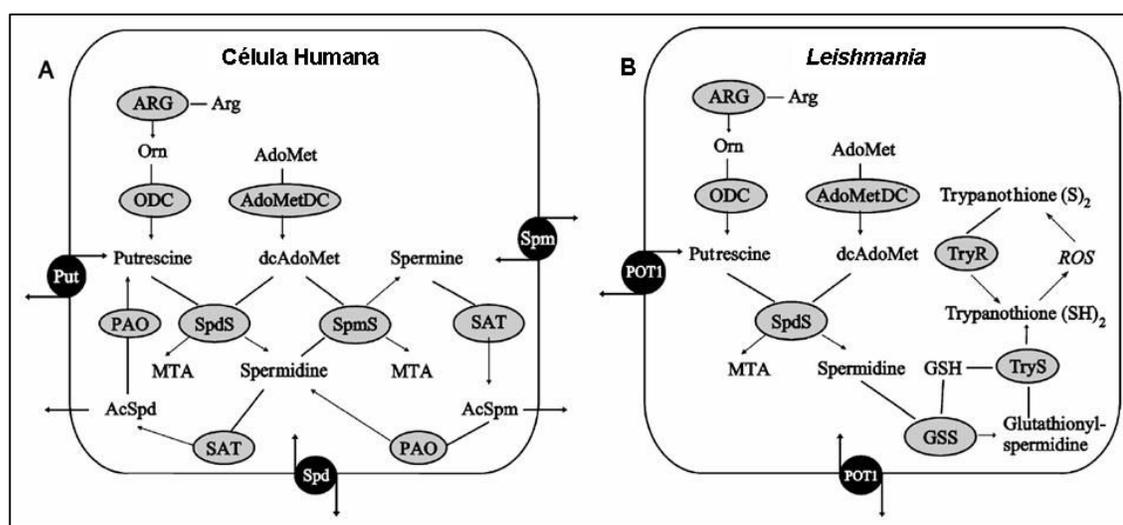


Figura 4. Transporte, biosíntese, interconversão e utilização de poliaminas em células humanas e *Leishmania*. **A** Em células humanas, as descarboxilases (ODC e AdoMetDC) são altamente reguladas e possui tempo de meia-vida bastante curtos, enquanto que as sintetases (SpdS e SpmS) são constitutivamente expressas. SAT e PAO fazem parte de uma via de retro-conversão de espermina para espermidina e para putrescina via intermediários acetilados (AcSpm e AcSpd). Transportadores de poliaminas (círculos pretos) podem regular o nível intracelular de poliaminas. **B** Em *L. (L.) donovani*, a ODC e AdoMetDC possuem longos tempos de meia-vida e não possui SpmS. A conjugação espermina e glutaciona (GSH) é realizada usando duas enzimas (GSS e TryS) para formar tripanotiona, a qual está envolvida na defesa contra o estresse oxidativo. *Leishmania* possui um eficiente transportador de poliaminas (POT1). *AcSpd* espermidina acetilada; *AcSpm* espermina acetilada; *AdoMet* S-adenosilmetionina; *AdoMetDC* S-adenosilmetionina descarboxilase; *ARG* arginase; *dcAdoMet* S-adenosilmetionina descarboxilada; *GSH* glutaciona; *GSS* glutacionilespermidina sintetase; *MTA* 5-desoxi-5-metiladenosina; *ODC* ornitina descarboxilase; *PAO* poliamina oxidase; *Put* putrescina; *ROS* espécies reativas de oxigênio; *SAT* espermidina/espermina N<sup>1</sup>-acetiltransferase; *Spd* espermidina; *Spm* espermina; *TryR* tripanotiona retutase; *TryS* tripanotiona sintetase (HEBBY et al., 2007).

## 1.4 Fitoativos

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças humanas tem raízes em tempos pré-históricos e ainda hoje a maioria das drogas utilizadas são de origem vegetal (CARVALHO & FERREIRA, 2001). As espécies vegetais ainda são as maiores fontes de fármacos para humanidade. Segundo Newman & Grag (2007), no arsenal farmacoterapêutico utilizado nos últimos 25 anos, as fontes para os novos fármacos foram: 30% sintéticos, 23% derivados de produtos naturais com alguma modificação sintética, 14% de origem biológica (proteínas ou peptídeos com mais de 45 resíduos extraídas de organismos e/ou linhagem de células produzidos por biotecnologia), 14% sintéticos com o grupo farmacofórico derivado de um produto natural, 10% sintéticos miméticos de produto natural, 5% produtos naturais e 4% vacinas. Assim, 52% dos novos fármacos possuem alguma relação direta ou indireta com os produtos naturais.

O mercado mundial de fitoterápicos vem crescendo em proporções consideráveis, em 2002, e economia mundial movimentou cerca de US\$ 22 bilhões nesse ramo da farmácia, sendo consumidos por 2/3 da população mundial. O Brasil exporta uma quantidade muito pequena de produtos naturais em comparação com a grande diversidade de plantas na biota brasileira (PINTO et al., 2002).

Com a criação da Política Nacional de Medicamentos Fitoterápicos, o Brasil está iniciando a padronização da matéria prima e emergindo no mercado mundial, mas ainda é preciso incentivar as indústrias farmacêuticas brasileiras para produção destes produtos em larga escala.

O Brasil é um dos países com maior patrimônio em biodiversidade do planeta, correspondendo a cerca de 20% do total mundial. Sendo ainda um país de caráter tropical, onde as plantas produzem de três a quatro vezes mais constituintes químicos ativos quando comparadas às plantas de áreas onde o clima é temperado, torna o Brasil uma potência mundial com inestimável valor econômico (DI STASI et al., 2002; CALIXTO, 2003).

Quando as indústrias farmacêuticas compreenderam que a biotecnologia ainda não está em condições de concorrer com a natureza na formulação de moléculas com atividade farmacológica começaram a retomar o método de 'screening' em busca de modelos para ponto de partida para o desenho de novas drogas, facilitando a descoberta de novos princípios ativos (SANT'ANA, 2002).

Estudos etnofarmacológicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento

das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (MATHIAS & EMILY, 1993; IWU et al., 1994; SILVA et al., 1995; FRANÇA et al., 1996; MOREIRA et al., 2002). Muitos dos vegetais utilizados 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 (IWU et al., 1994; QUEIROZ et al., 1996; TORRES-SANTOS et al., 1999; KAM et al., 1999; ROCHA et al., 2005).

Estudos têm demonstrado várias plantas com atividade contra *Leishmania* (TORRES-SANTOS et al., 1999; BEZERRA et al., 2006, MOREIRA et al., 2007). O uso de plantas no tratamento da LTA é uma prática antiga entre as populações de áreas endêmicas (FOURNET et al., 1992; MOREIRA et al., 2002). Porém, esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na LC pode ocorrer a cura espontânea das lesões.

Dentre as numerosas plantas com potencial na modulação da resposta imune na leishmaniose, a *Kalanchoe pinata* tem demonstrado efeito sobre a redução das lesões em camundongos de linhagem susceptível pelo aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (BERGMANN et al., 1997).

A espécie *Solanum lyratum*, utilizada na medicina coreana, também aumenta a produção de óxido nítrico produzido por células da cavidade peritoneal de camundongos, o que sugere uma possível atividade terapêutica no tratamento da leishmaniose, pois o NO é um dos principais agentes contra patógenos intracelulares (KIM et al., 1999).

Vários compostos têm demonstrado atividade contra *Leishmania*, como: terpenóides de *Artemisia annua* (YANG et al., 1992), de *Peperomia galioides* (MAHAIO et al., 1995) e de *Guarea rhopalocarpa* (CAMACHO et al., 2000); aminoglicosteróides e aminosteróides de *Holarrhena curtisii* (KAM et al., 1997), naftoquinonas de *Pera benensis* (FOURNET et al., 1992; KAYSER et al., 2000), iridóides glicosídicos de *Picrorhiza kurroa* (MITTAL et al., 1998); flavonóides de *Centrolobium sclerophyllum* (ARAÚJO et al., 1998) e neolignanas de *Virola surinamensis* (BARATA et al., 2000).

Além destes compostos, alguns alcalóides do tipo isoquinolínico de *Cardiopetalum calophyllum*, *Abuta rufescens* e *Abuta pahni* também têm demonstrado atividade leishmanicida (FOURNET et al., 1992).

Devido às inúmeras técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas. Entretanto, para otimizar a busca por princípios bioativos de maneira racional, a indústria farmacêutica

redirecionou todo o processo de seleção de produtos naturais, no que se denominou de “busca racional de drogas” pelo fracionamento guiado por bioensaios específicos para enzimas, receptores, DNA etc e também motivado pelo conhecimento do mecanismo de ação de novas substâncias químicas bioativas (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Para obtenção de fitoativos é necessária uma coleta racional, tendo como observações os fatores ambientais como clima, tipo de solo e época da coleta, que influenciam a produção de determinados metabólitos secundários. De acordo com a substância ativa da planta, existem horários da manhã em que é recomendada a coleta de plantas com óleos essenciais e alcalóides e no período da tarde plantas com glicosídeos cardiotônicos. Este critério é importante no que diz respeito à qualidade química do produto, pois uma baixa concentração de substância ativa no material pode dificultar a purificação do produto (ALVES & PAVANI, 1991).

Após a coleta do material, a secagem da planta deve ser feita em local seco e arejado ou em estufa com temperatura controlada, preferencialmente abaixo de 45°C, para evitar degradação de substâncias. Depois deve ser realizada a moagem, pois pequenas dimensões aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, otimizando o processo de extração. O solvente escolhido deverá ser analisado em conjunto com o tipo de vegetal a ser extraído e o tipo de método extrator utilizado. Na escolha do método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias a serem extraídas e as finalidades do extrato que se quer preparar (SIMÕES et al., 2000).

## **1.5 Cecropia**

A família Cecropiaceae contém mais de 70 espécies encontradas em toda a América. A *Cecropia pachystachya* é uma árvore de crescimento rápido, nativa das Américas Central e do Sul, podendo atingir de 4 a 7 metros de altura. Tem relação simbiótica com formigas, que protegem a árvore contra os insetos destruidores de suas folhas. Outras espécies podem ser encontradas em localizações geográficas diferentes, e são similares na aparência, na composição química, bem como em usos medicinais. As folhas desta árvore são muito apreciadas pelo bicho preguiça e os frutos produzidos anualmente em grande quantidade são avidamente procurados por muitas espécies de pássaros. Floresce durante longo período do

ano, predominando em agosto-novembro (Figura 5) (LORENZI, 2002).

Extratos de espécies de *Cecropia* têm sido usados na fitoterapia brasileira e em outros países latino americanos. Estudos químicos do gênero *Cecropia* tem revelado a presença de flavonóides como isovitexina, catequina e proantocianidinas (Figura 6) (DELLA MONACHE et al., 1988; LACAILLE-DUBOIS et al., 2001).

Tanae e colaboradores (2007) identificaram catequinas, procianidinas, flavonóides e ácido clorogênico na fração butanólica e ácido clorogênico e isovitexina na fração butanólica do extrato aquoso de *C. glaziovii*, podendo estas substâncias estar diretamente envolvidas com os efeitos provocados pelo extrato (Figura 7).



Figura 5. Espécimes de *Cecropia* sp.

O estudo de *C. pachystachya* realizado por Camargo e colaboradores (2004) revelou a presença de alcalóides, flavonóides, cardenólídeos, saponinas, glicosídeos cardiotônicos e taninos. No entanto, ainda não há uma correlação destes constituintes químicos e seus efeitos farmacológicos.

Pesquisas realizadas em animais com extratos de *Cecropia* mostraram atividade analgésica, antiinflamatória, antiespasmódica, hipoglicemiante, anti-hipertensiva, antitussígena e cardiotônica. Por exemplo, extrato bruto *C. adenopus* produz bradicardia em cães (SIVORI, 1933 *apud* LIMA-LANDMAN, 2007). Extrato de *C. carbonara* produz relaxamento intestinal *in vitro* (VIEIRA et al., 1968 *apud* LIMA-LANDMAN, 2007). Extrato aquoso de *C. obtusifolia* induz hipotensão em ratos (VIDRIO et al., 1982 *apud* LIMA-

LANDMAN, 2007), provoca diurese após administração oral (VARGAS HOWELL & ULATE MONTERO, 1996) e inibe a ligação da angiotensina ao receptor endotelial (CABALLERO-GEORGE et al., 2001). Extrato metanólico das folhas de *C. lyratiloba* estimula a liberação de NO endotelial (ALMEIDA et al., 2006). Extrato metanólico das folhas de *C. glaziovii* inibe a enzima conversora de angiotensina (LACAILLE-DUBOIS et al., 2001) e a bomba de K-ATPase na gastrite ácida (SOUCCAR et al., 2008). Extrato metanólico das folhas de *C. pachystachya* produz hipotensão em ratos (CONSOLINI & MIGLIORI, 2005) e seus efeitos cardiotônicos foram descritos *in vitro* (CONSOLINI et al., 2006).

Na farmacoterapia da leishmaniose, frações do extrato hidroalcoólico de *C. pachystachya* inibiram o crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis* em 55,7% e inibiram a arginase de *Leishmania in vitro* em 54,8% (CRUZ et al., 2007). Desta maneira, a descoberta de substâncias ou frações mais purificadas desta espécie com atividade leishmanicida seletiva pode contribuir com a quimioterapia atual.

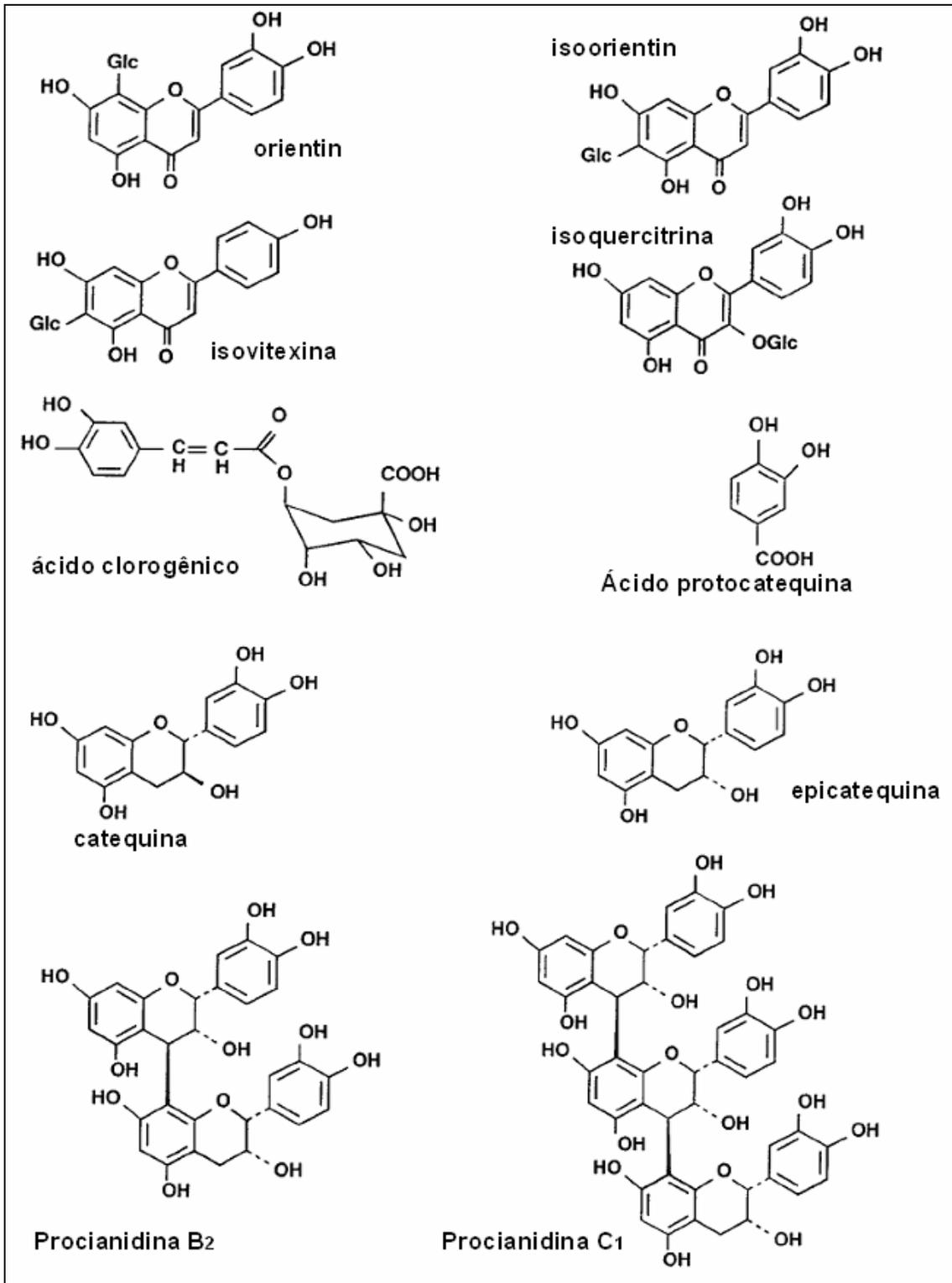


Figura 6. Substâncias obtidas a partir de extratos de *Cecropia* spp. (LACAILE-DUBOIS et al., 2001).

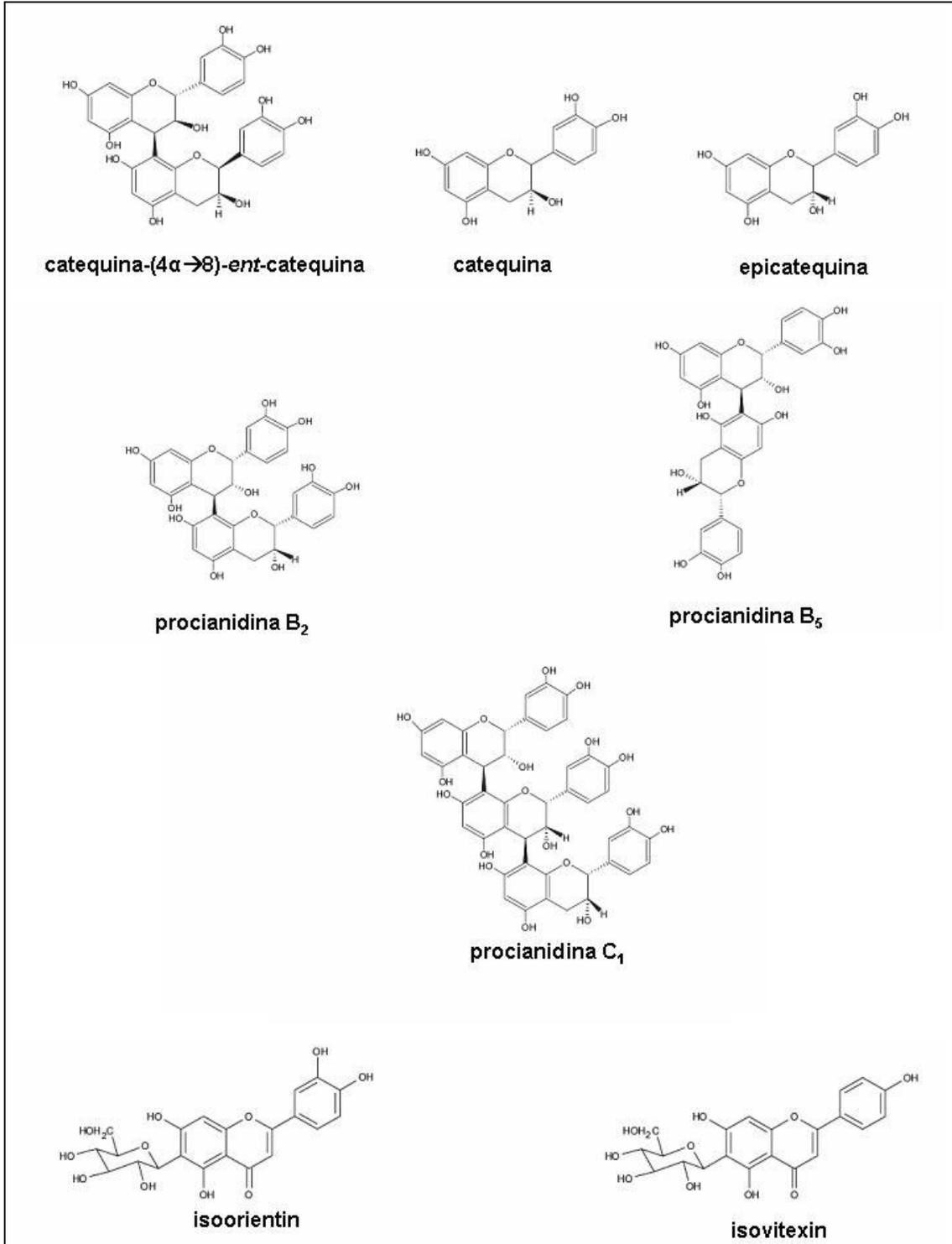


Figura 7. Substâncias isoladas de *C. glaziovii* por HPLC da fração butanólica obtida do extrato aquoso das folhas (TANAE et al., 2007).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a inibição da enzima arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* por frações do extrato etanólico de *Cecropia pachystachya*, buscando uma atividade leishmanicida.

### 2.2 Objetivos específicos

- a. Fracionar extrato etanólico de *Cecropia pachystachya* guiado pela inibição *in vitro* da enzima arginase de *L. (L.) amazonensis*.
- b. Verificar os efeitos do extrato acetato de etila sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por microscopia eletrônica de transmissão.
- c. Comparar a inibição da enzima arginase de *Rattus norvegicus* com a de *L. (L.) amazonensis*, permitindo selecionar substâncias que possuem maior afinidade pela enzima do parasito.
- d. Testar as frações obtidas em culturas das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.
- e. Determinar a IC<sub>50</sub> das frações sobre a arginase de *L. (L.) amazonensis*.
- f. Determinar a IC<sub>50</sub> das frações sobre o crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.
- g. Determinar a cinética enzimática dos inibidores da arginase.
- h. Avaliar a toxicidade dos extratos/frações em cultura de esplenócitos.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Material vegetal**

As folhas de *Cecropia pachystachya* foram coletadas em 25 de fevereiro 2008 no *campus* Ondina da Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, Bahia, Brasil. A identificação foi realizada pela Dr<sup>a</sup>. Maria L. S. Guedes, Instituto de Biologia – UFBA. A excisata encontra-se depositada no Herbário Alexandre Leal Costa – Instituto de Biologia – UFBA sob o n<sup>o</sup> 82550.

#### **3.2 Preparação do extrato**

As folhas foram lavadas em água corrente, secas superficialmente com papel e secas à sombra por três semanas à temperatura ambiente e trituradas em moinho (Thomas Wiley Laboratory Mill – Modelo 4). O processo de extração foi realizado por maceração exaustiva em etanol com troca de solvente a cada 48 h por três vezes.

O filtrado da maceração foi concentrado em rotaevaporador (BUCHI modelo R-3000) à pressão reduzida a 45°C, obtendo-se o extrato etanólico bruto seco (EEB).

#### **3.3 Partição líquido-líquido**

Alíquotas do EEB foram ressolubilizadas em etanol com adição posterior de 20% de água para realização da partição. Os solventes utilizados foram hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente. Foram realizados três partições com cada solvente utilizando em cada etapa um terço do volume da fase hidroalcoólica.

#### **3.4 Cromatografia líquida em camada delgada**

As análises de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram realizadas utilizando como adsorvente sílica gel 60 GF<sub>254 + 365</sub> (Merk<sup>®</sup>) sobre placas de vidro de tamanho 2,5 x 7,0 cm e 5,0 x 20,0 cm. A suspensão de sílica em água destilada foi

distribuída sobre placas de vidro com espalhador manual do tipo Heidelberg a uma espessura de 0,5 mm. Além destas, foram utilizadas placas comerciais de cromatografia (20 x 20 cm) recobertas com poliamida 6 - F (Baker-flex<sup>®</sup>).

Os cromatogramas em camada delgada foram obtidos após revelação com irradiações de luz UV de 254 e 365 nm, bem como vapores de iodo.

### **3.5 Cromatografia líquida em coluna aberta**

Foram realizados três procedimentos de cromatografia em coluna aberta como descritos a seguir: a) fase estacionária com sílica gel 60 (60 - 200 mesh/Merck<sup>®</sup>) empacotada com clorofórmio e fase móvel com clorofórmio/metanol em gradiente crescente de polaridade, que foi designada neste estudo como CLC 1. b) fase estacionária com sílica gel 60 (400 - 200 mesh/Merck<sup>®</sup>) empacotada com diclorometano e fase móvel diclorometano/acetato de etila/metanol em gradiente crescente de polaridade, sendo descrito como CLC 2. c) fase estacionária com Sephadex<sup>®</sup> LH-20 empacotada com metanol e fase estacionária com metanol/água em gradiente crescente de polaridade, que foi descrita como CLC 3. Os volumes e proporções utilizadas nas cromatografias estão representados na Tabela 1.

### **3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência**

Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizou-se o sistema constituído de coluna C-18 (LiChroCart<sup>®</sup>), bomba injetora HP à velocidade de 1 mL/min, espectrômetro com detector UV (Jasco Model UV-970) operando em 210 nm e integrador (Jasco 807-IT). Utilizou-se 20 µL de amostra diluída em água ou metanol e a fase móvel foi constituída de acetonitrila/água (1:1)

### **3.7 Ressonância magnética nuclear**

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidos em espectrômetro Varian Gemini 2000 operando a 300 MHz. Utilizou-se como solvente o DMSO deuterado e os deslocamentos químicos foram medidos em  $\delta$  (ppm) utilizando como referência interna o tetrametilsilano

(TMS) com  $\delta = 0,0$ .

Tabela 1. Volumes e proporções de solventes utilizados na cromatografia líquida em coluna.

CLC 1		CLC 2		CLC 3	
Vol.(mL)	Clorofórmio/Metanol (v/v)	Vol.(mL)	Diclorometano/Acetato de etila/ Metanol (v/v/v)	Vol.(mL)	Metanol/Água (v/v)
200	1:0	200	9 : 0,5 : 0,5	200	1:0
600	9:1	200	8 : 1,5 : 0,5	60	1:1
600	8:2	100	7,5 : 2 : 0,5	50	4:6
600	7:3	100	7 : 2,5 : 0,5	40	3:7
600	6:4	100	6 : 3,5 : 0,5	40	2:8
600	1:1	100	5,5 : 4 : 0,5	50	0:1
600	4:6	200	5 : 4 : 1		
500	3:7	100	4 : 5 : 1		
250	2:8	100	3,5 : 5 : 1,5		
350	0:1	200	3 : 5 : 2		
		200	2 : 5,5 : 2,5		
		100	1,5 : 6 : 2,5		
		100	0 : 7,5 : 2,5		
		100	7 : 3		
		100	6 : 4		
		100	1 : 1		
		100	4 : 6		
		100	3 : 7		
		100	1 : 9		

### 3.8 Cultivo de *Escherichia coli*

O gene da enzima arginase de *Leishmania (L.) amazonensis* foi clonado em vetor para expressão no organismo heterólogo *Escherichia coli* [BL21(DE3)pLysS] possibilitando a produção e purificação da enzima em larga escala (SILVA et al., 2008).

As bactérias foram cultivadas a 37°C em meio SOB com ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 35 µg/mL até densidade óptica a 600 nm de 0,6. A expressão de pRSET-Arg foi induzida pela adição de IPTG e MnSO<sub>4</sub> nas concentrações finais de 1 mM e 10 mM, respectivamente. Após 3 horas de indução as células foram centrifugadas e o sedimento armazenado a -70°C (SILVA et al., 2008).

### 3.9 Extração e purificação da arginase recombinante

Para extração da arginase o ‘pellet’ de 1 L de cultura de *E. coli* foi ressuspensionado em 50 mL de tampão de lise (MOPS-NaOH 100 mM, imidazol 5 mM, PMSF 1 mM e 200 U de DNase, pH 7,2). A lise foi realizada por três ciclos de choque térmico, congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 42°C. O lisado foi centrifugado a 12000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em Millipore® (0,22 µm) e usado para purificação da arginase (SILVA et al., 2008).

A purificação da enzima recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade a metais imobilizados em coluna “HiTrap Chelating Sepharose” (GE Healthcare) de 5 mL carregada com Ni<sup>2+</sup>. A amostra foi aplicada à coluna de Ni<sup>2+</sup> previamente equilibrada com tampão MOPS 100 mM e imidazol 5 mM, pH 7,2.

Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 3 volumes de coluna (VC) de tampão. Em seguida foi aplicado à coluna 3 VC de tampão contendo MnSO<sub>4</sub> 50 mM para ativação da arginase. Após a ativação da enzima, a arginase foi eluída com imidazol 50 mM (diluído em tampão MOPS), pH 7,2.

Para retirar o imidazol da amostra, foi realizada diálise por 24 horas a 4°C com três mudanças de 1 L de PBS 10 mM (pH 7,4), em membrana com poros de tamanho correspondente a 12,4 kDa.

### 3.10 Extração e purificação da arginase hepática

Para o preparo do extrato contendo a enzima arginase hepática, foram utilizados 2-5 g de fígado congelado de *R. norvegicus*, triturado com 10 mL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,2). O homogenato foi centrifugado a 2000 x g por 10 min e o sobrenadante utilizado na ativação da enzima arginase, através da incubação com 10 mM de MnSO<sub>4</sub> em tampão TE a 60°C durante 10 min. Centrifugou-se novamente por 10 min a 2000 x g para retirada das proteínas precipitadas.

Para purificação foi utilizada coluna de troca iônica “HiTrap SP FF” (GE Healthcare) de 1 mL. A coluna foi equilibrada com tampão TE, pH 7,2. Em seguida foi aplicado 5 VC com tampão TE, pH 5,0. A amostra foi injetada na coluna e então lavada com 5 VC do mesmo tampão. A eluição da arginase foi realizada com tampão TE, pH 7,2.

### 3.11 Inibição da atividade da arginase

As frações de *C. pachystachya* foram analisadas para observar quais apresentavam atividade inibidora da arginase de *Leishmania* e *Rattus*, para guiar o fracionamento.

Os testes foram realizados da seguinte forma: 10 µL de arginase de *Rattus* ou *Leishmania* (equivalente a 30 µg/mL de proteína) foi incubada a 37°C durante 15 min com 100 mM de L-arginina, pH 9,6 e 70 µL da fração obtida ou água. Foram realizados controles negativos com 10 µL de arginase e 90 µL de água, e 20 µL de L-arginina e 80 µL de água. Em seguida foi realizado o ensaio quantitativo da uréia produzida.

A concentração de uréia foi determinada pelo método colorimétrico, utilizando-se reagentes do kit 'Uréia CE' (Labtest®). A amostra contendo uréia (10 µL), provinda da hidrólise da L-arginina, foi incubada com 500 µL de urease em tampão fosfato por 5 min a 37°C. A amônia produzida pela hidrólise da uréia foi quantificada pela reação com mais 500 µL de salicilato de sódio, na presença de hipoclorito de sódio, sob ação catalisadora do nitropussiato de sódio, e incubados mais 10 min a 37°C, formando o azul de indofenol. A concentração do azul de indofenol foi determinada através da medida de absorbância a 600 nm e é proporcional à quantidade de uréia na amostra. Foram feitos controles utilizando 10 µL de uréia padrão a 70 mg/dL e controle negativo utilizando 10 µL de água para o branco.

### 3.12 Cinética enzimática

O extrato protéico com a arginase foi incubado em concentrações variáveis do substrato L-arginina na presença e ausência de inibidores. Para a medida da  $V_o$  (velocidade inicial de catálise da enzima) em várias concentrações de substrato, a enzima foi titulada para consumir menos que 10% do substrato colocado na reação.

### 3.13 Parasitos

A cepa MHOM/Br/75/Josefa de *Leishmania (L.) amazonensis*, isolada de um caso humano de LCD no Brasil pelo Dr. C.A. Cuba-Cuba (Universidade de Brasília, Brasil) tem sido mantida em cultura axênica na forma promastigota.

As promastigotas foram mantidas a 27°C em meio Warren (caldo de infusão cérebro e coração bovinos, ácido fólico 20 mg/L e hemina 20 mg/L) suplementado com 10% de soro

fetal bovino.

Para verificação da atividade leishmanicida das frações obtidas, 5 mL de cultura de promastigotas em fase estacionária foram centrifugados a 1000 x g por 10 min a 27°C. O 'pellet' foi ressuspenso em 1 mL de meio e utilizado para inóculo de  $5,0 \times 10^5$  parasitos/mL em tubos de 10 mL com volume de 3 mL de meio. O crescimento dos parasitos na ausência ou presença dos inibidores foi avaliado por contagem direta em câmara de Neubauer.

### **3.14 Avaliação da toxicidade em esplenócitos**

Para ensaios com esplenócitos, foi realizada extração do baço de camundongos BALB/c para avaliação da atividade mitocondrial, através da técnica do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol). Inóculos de  $1,0 \times 10^7$  esplenócitos foram incubados em placas de 96 poços com 200 µL de meio RPMI (suplementado com 10% de soro bovino fetal, 80 µg/mL de gentamicina, 10 UI/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina) e com os extratos/frações.

De acordo com Mosmann (1983), as culturas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação com os extratos/frações adicionou-se 20 µL de MTT a 5 mg/mL. Após 3 horas de incubação, foram adicionados em cada poço 100 µL de DMSO. As placas foram centrifugadas 10 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi lido em leitor de microplacas Versamax<sup>®</sup> em 570 nm.

### **3.15 Microscopia eletrônica de transmissão**

De acordo com VANNIER & LINS, 2003, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, durante uma hora em temperatura ambiente, pós-fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e CaCl<sub>2</sub> 5 mM, em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 40 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após lavagem com tampão cacodilato, a amostra foi desidratada em concentrações crescentes de acetona e embebida em resina epóxi (Epon polybed 820). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 7% em metanol e 1% de citrato de chumbo aquoso para visualização no microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM109).

### **3.16 Análise computacional da interação substâncias - arginase**

Para realização do “docking” o modelo tridimensional da enzima e as moléculas ligantes foram preparados utilizando o software Chimera (PETTERSEN et al., 2004). A superfície molecular do alvo foi gerada baseado no algoritmo desenvolvido por Richards (1977) e adaptado por Connolly (1981). A geração da esfera foi realizada usando o algoritmo *sphgen* distribuído com *dock6* e selecionadas por “*spheres\_selector*”. A geração do ‘grid’ foi obtida pelo programa Grid<sup>®</sup>, que é distribuído como acessório para DOCK (KUNTZ et al., 1982). Dock flexível (MOUSTAKAS et al., 2006) foi usado para verificar a interação arginase e substâncias naturais. Os resultados obtidos pelo “docking” foram visualizados no programa Chimera alpha 1.4.

### **3.17 Análise estatística**

Para todos os testes, diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas significantes. Foi realizada análise por ANOVA com pós-teste de Turkey no software GrafPad Prisma 5.0. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e com no mínimo duas repetições independentes.

## 4 RESULTADOS

Após a coleta e secagem das folhas obteve-se uma massa de 3,085 kg. Após preparação do EEB foi obtida uma massa de 264,69 g, resultando em um rendimento de 8,57%.

O processo de fracionamento do EEB foi seguido de acordo com a inibição da arginase de *L. (L.) amazonensis* para obtenção das substâncias com maior potencial inibitório.

Antes dos detalhes da razão dos passos que foram seguidos no fracionamento, segue-se uma visão geral do processo de fracionamento do extrato de *C. pachystachya*.

A fração solúvel em etanol do EEB foi submetida a partições líquido-líquido em hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol (Figura 8). O extrato acetato de etila foi fracionado por CLC 01, CLC 02 e CLC 03 e as frações obtidas foram analisadas por CLAE e RMN de <sup>1</sup>H (Figura 9).

### 4.1 Extrato etanólico bruto

O EEB foi utilizado para o ensaio de inibição da atividade da enzima arginase de *L. (L.) amazonensis*. Na concentração de 10 µg/mL obteve-se uma inibição de 90% da atividade enzimática. Para uma comparação com inibidores de outras enzimas da via das poliaminas, utilizou-se o DFMO, inibidor não seletivo da enzima ornitina descarboxilase, que causou uma inibição de 30% da atividade enzimática (Figura 10).

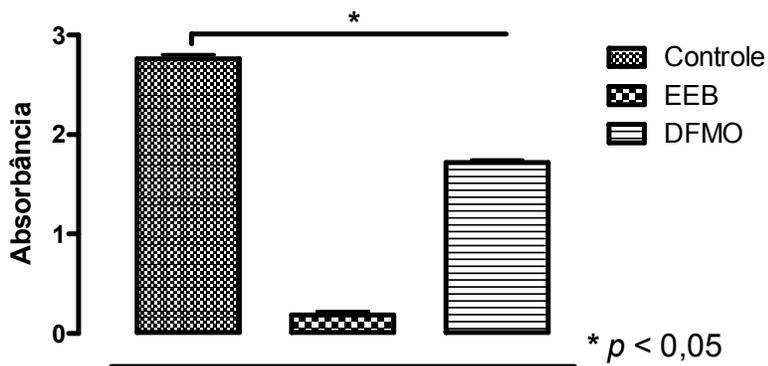


Figura 10. Atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* na presença do EEB 10 µg/mL e DFMO 1mM.

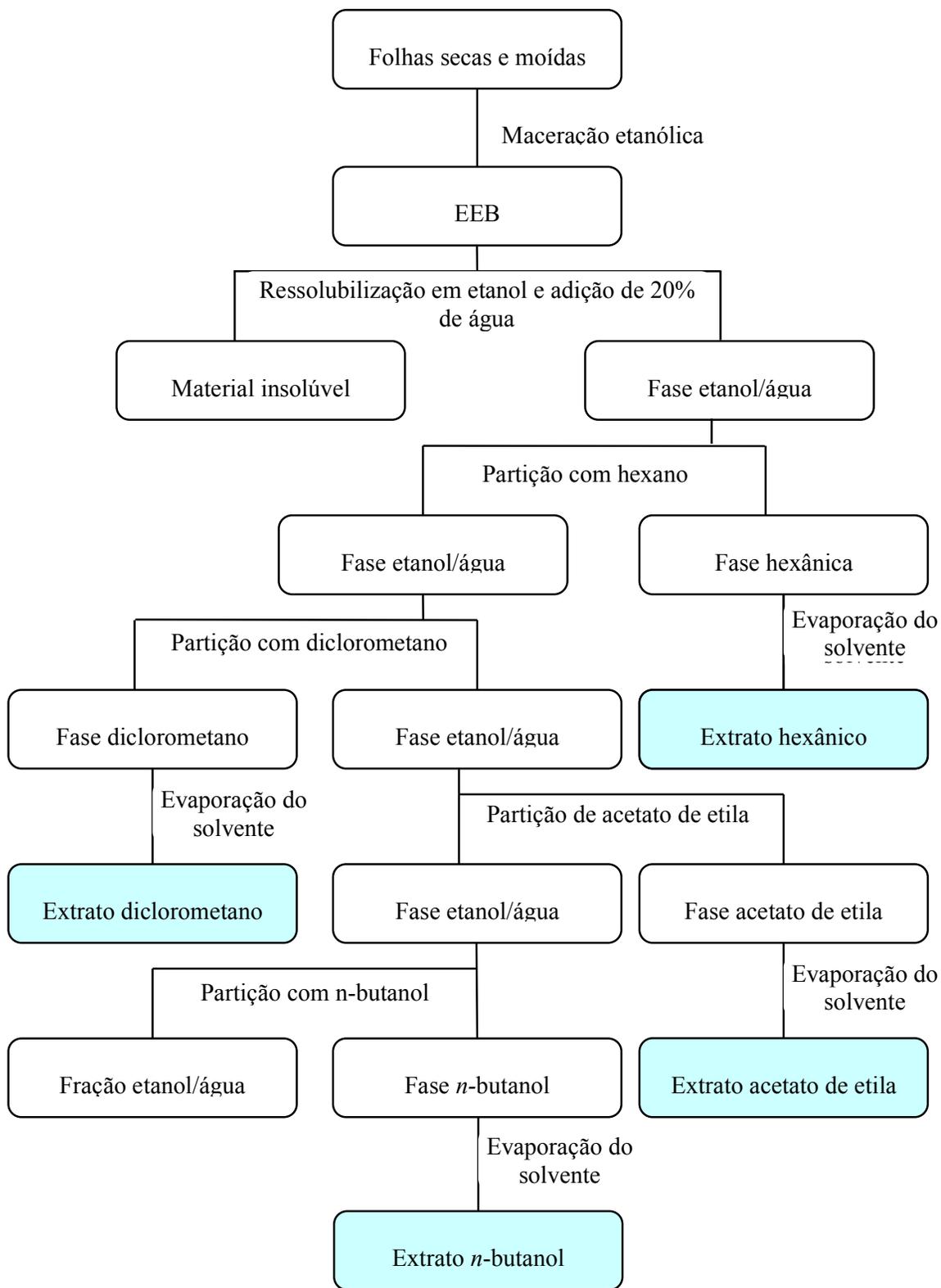


Figura 8. Fluxograma de obtenção dos extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *C. pachystachya*.

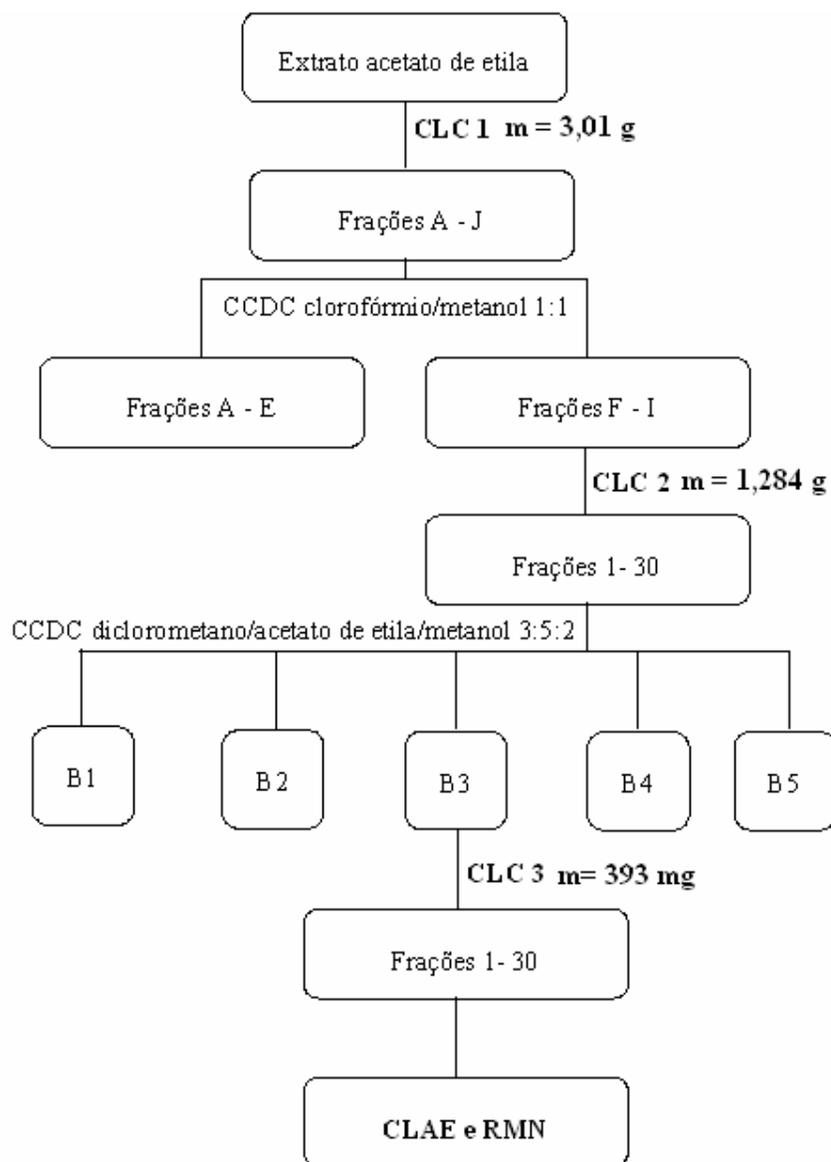


Figura 9. Fluxograma do fracionamento do extrato acetato de etila. O processo de fracionamento foi guiado pela inibição da arginase de *Leishmania*.

## **4.2 Extratos hexânico, diclorometânico, acetato de etila e butanólico**

Após a realização da partição líquido-líquido, os extratos que apresentavam alguma solubilidade em água, excipiente para as reações de atividade enzimática, foram utilizados para análise da inibição da arginase.

O extrato hexânico não foi utilizado para análise da atividade enzimática, pois não apresentou nenhuma solubilidade em água.

O extrato acetato de etila apresentou uma fração solúvel e uma insolúvel em metanol, mas ambas apresentaram uma solubilidade em água. Na análise da atividade enzimática, a fração solúvel em metanol apresentou uma  $IC_{50}$  menor que 10  $\mu\text{g/mL}$  e a fração insolúvel uma  $IC_{50}$  de 64,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 11 A).

O extrato butanólico apresentou uma  $IC_{50}$  de 115,3  $\mu\text{g/mL}$  e o extrato diclorometânico mostrou uma  $IC_{50}$  maior que 300  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 11 B e C).

Desta forma, a busca pelos inibidores da arginase foi continuada com o extrato acetato de etila, pois apresentou a menor concentração inibitória de 50%, sendo bem menor que os demais extratos.

## **4.3 Extrato acetato de etila**

A fração solúvel em metanol do extrato acetato de etila foi analisada por CCDC para escolha dos melhores solventes para realização da CLC 01. Os solventes que apresentaram uma melhor resolução na CCDC foram clorofórmio/metanol (7:3).

Assim, a CLC 01 foi realizada conforme Tabela 1, a partir de 3,01 g de extrato, onde foram coletadas 18 frações com aproximadamente 250 mL cada.

As frações foram novamente submetidas à CCDC, onde a melhor resolução das frações foi obtida com clorofórmio/metanol (1:1). Após análise do perfil cromatográfico as frações foram agrupadas de acordo com a Tabela 2.

Para guiar a continuação do fracionamento, as frações E a I foram utilizadas para o ensaio de inibição da arginase. As frações A – D não apresentaram uma boa solubilidade em água e, portanto, não foram utilizadas para o ensaio enzimático.

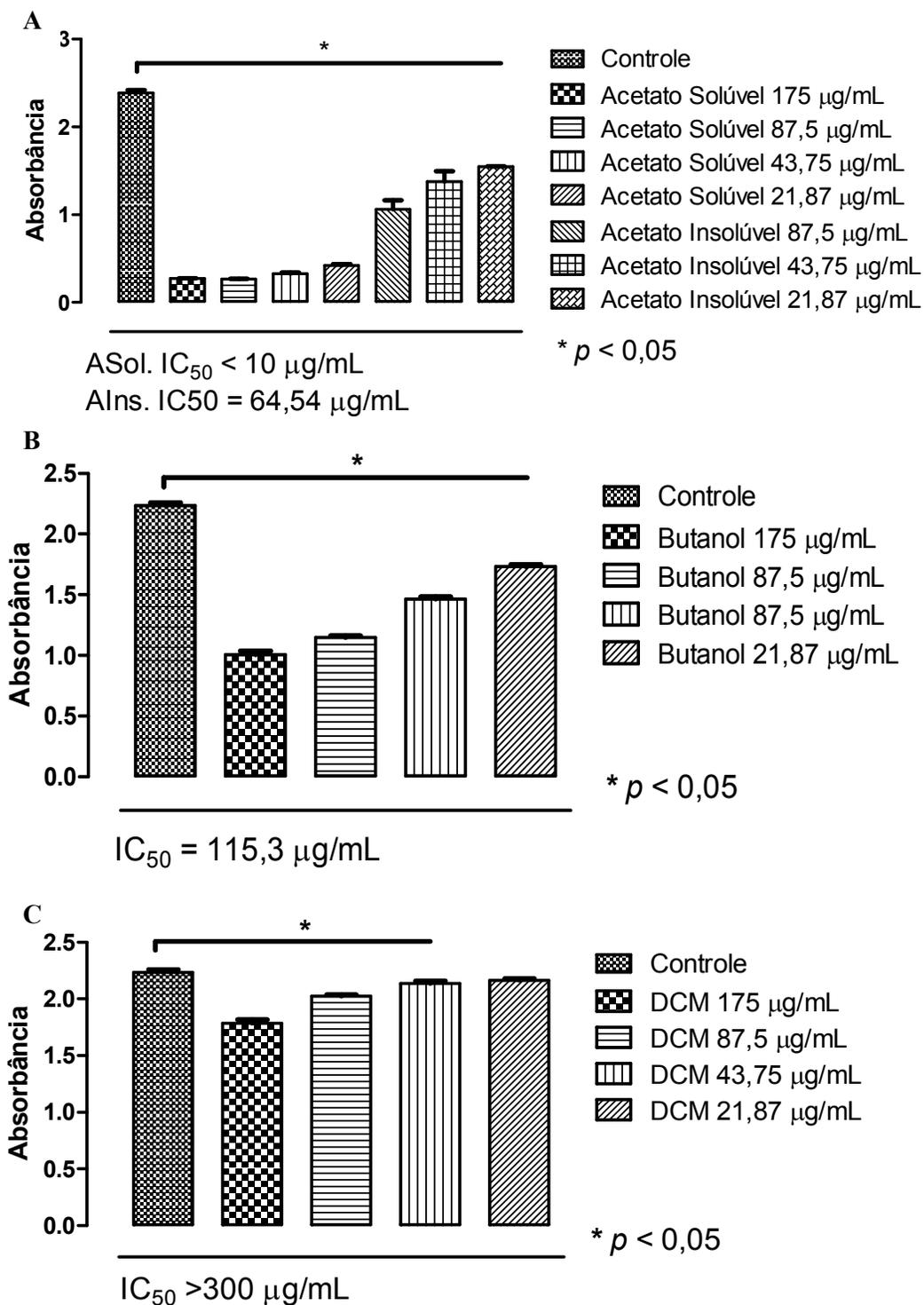


Figura 11. Atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* na presença de diferentes concentrações dos extratos obtidos após partições com acetato de etila (A), butanol (B) e diclorometano (C).

Tabela 2. Agrupamento das frações da CLC 01.

Grupo	Frações
A	1 e 2
B	3
C	4 – 7
D	8
E	9
F	10 – 14
G	15
H	16
I	17 e 18

A fração E não apresentou atividade inibitória da arginase e as frações F – I apresentaram um mesmo percentual de inibição (Figura 12).

Após o agrupamento das frações F - I, elas foram solubilizadas em metanol e filtradas, obtendo-se uma fração insolúvel em metanol, que foi denominada de fração J, mas não apresentou uma inibição enzimática.

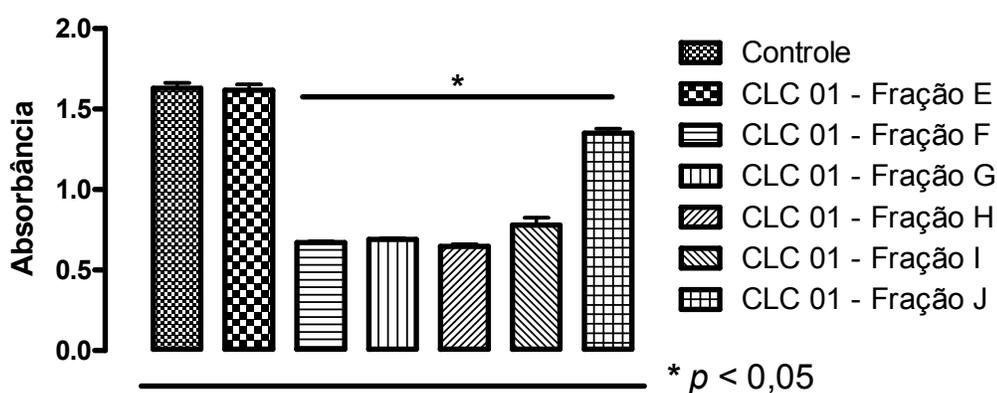


Figura 12. Atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* na presença de 87,5 µg/mL das frações solúveis em água, obtidas após CLC 01.

#### 4.4 Fração F01

Com base na semelhança do perfil cromatográfico e na atividade inibidora da arginase, as frações F – I foram agrupadas e denominadas de F01. A fração F01 foi avaliada para verificação da inibição da atividade enzimática, onde se obteve uma  $IC_{50}$  de 109,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 13).

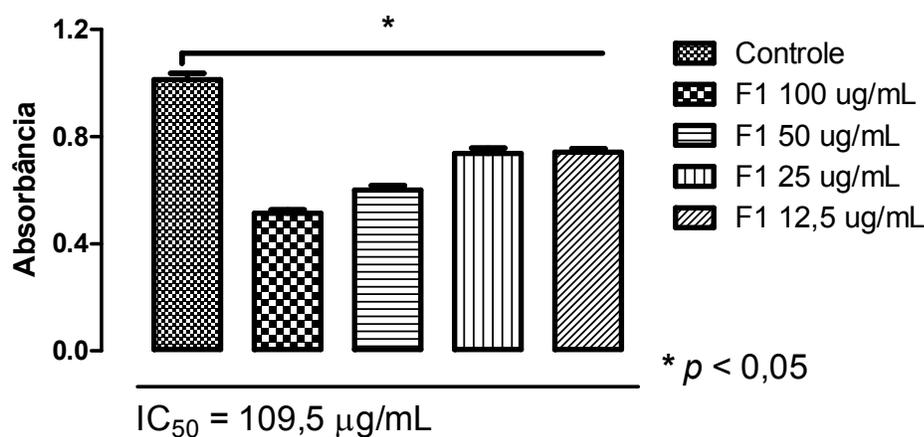


Figura 13. Atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* na presença de diferentes concentrações da fração F01.

A fração F01 foi analisada por CCDC para escolha do melhor perfil de solventes para realização da CLC 02. No entanto não foi encontrado nenhum sistema de solvente satisfatório devido à alta polaridade das amostras, sendo que o sistema diclorometano/acetato de etila/metanol (5:4:1) foi o que se mostrou mais eficiente.

Em seguida foi realizada a CLC 02 com uma massa de 1,284 g, resultando em 17 frações de cerca de 150 mL cada. As frações foram utilizadas para avaliação da inibição da atividade da arginase, onde todas apresentaram uma inibição bastante semelhante, sendo que as frações 1 – 6 não foram utilizadas, pois não apresentaram uma solubilidade em água (Figura 14).

Como no ensaio da arginase de *L. (L.) amazonensis* as frações não apresentaram uma diferença que pudesse direcionar o fracionamento, verificou-se então a inibição da arginase de *R. norvegicus* para excluir as frações que exercessem essa inibição, mas nenhuma das frações apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (Figura 15).

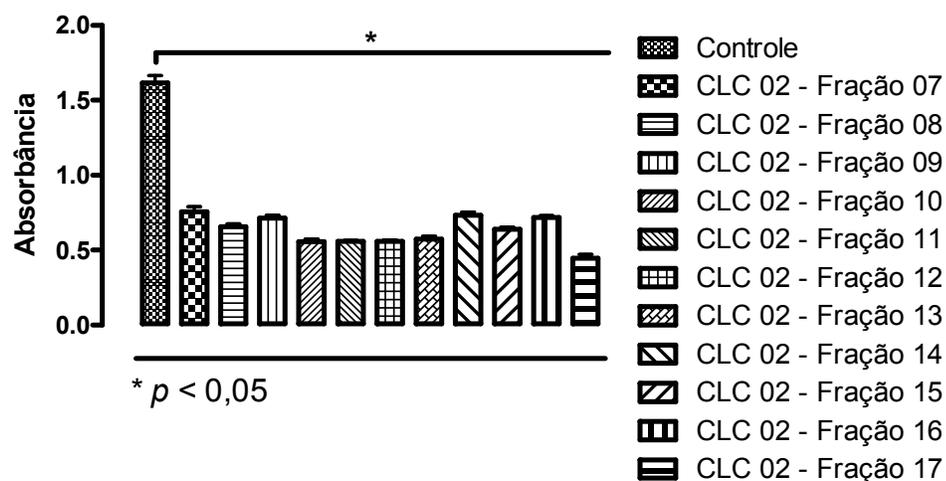


Figura 14. Atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* na presença de 87,5 µg/mL das frações resultantes da CLC 02.

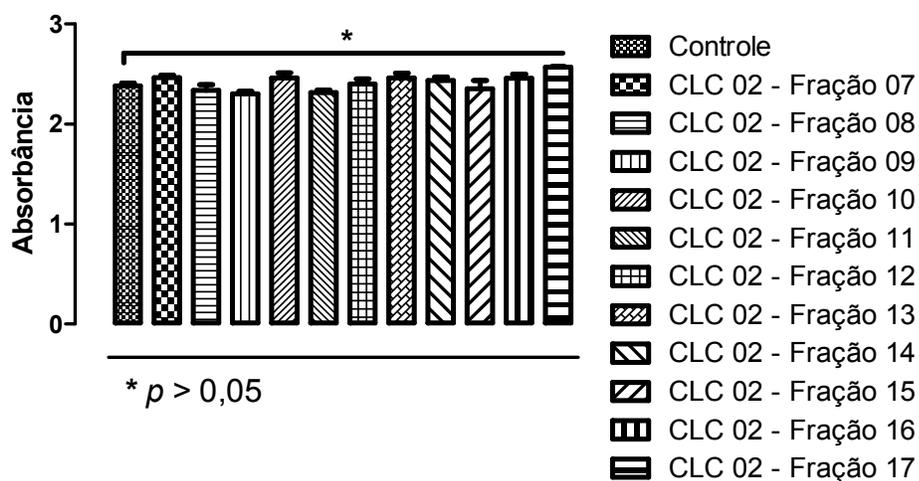


Figura 15. Atividade da arginase de *R. norvegicus* na presença de 87,5 µg/mL das frações resultantes da CLC 02.

#### 4.5 Frações B1 – B5

Desta forma, as frações da CLC 02 foram analisadas por CCDC, utilizando o sistema diclorometano/acetato de etila/metanol (3:5:2). Após uma análise do perfil cromatográfico, as frações foram agrupadas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Agrupamento das frações da CLC 02.

Grupo	Frações
<b>B1</b>	1 – 6
<b>B2</b>	7 – 11
<b>B3</b>	12
<b>B4</b>	13 e 14
<b>B5</b>	15 – 18

Após a formação das frações B1 - B5 foram realizados experimentos para verificação da atividade leishmanicida, onde a fração B03 apresentou o maior percentual de inibição (60%) de crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Figura 16).

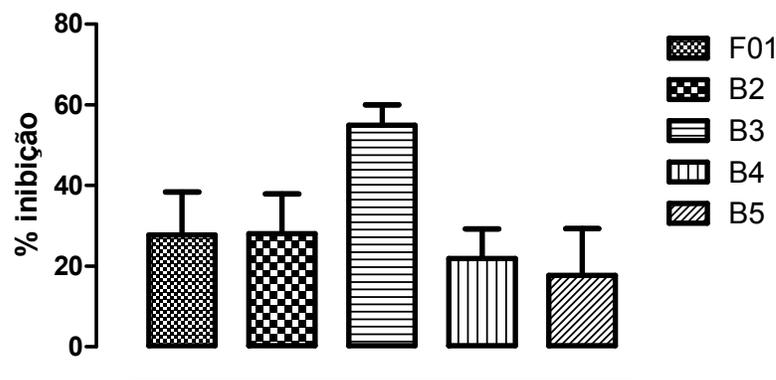


Figura 16. Percentual de inibição do crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na presença de 100 µg/mL das frações F01, B2 – B5.

#### 4.6 Frações da CLC 03

De acordo com os resultados anteriores, a fração B03 foi escolhida para continuar o fracionamento. Após realização da CLC 03 a partir de 393 mg da fração B03, foram obtidas 30 frações com aproximadamente 15 mL cada. A Tabela 4 mostra a massa das frações após o fracionamento. As frações foram utilizadas para análise da atividade inibitória da arginase (Figura 17).

Tabela 4. Massa das frações obtidas após CLC 03.

Fração CLC 03	Massa (mg)	Fração CLC 03	Massa (mg)
1	4,8	16	13,0
2	32,0	17	8,0
3	35,5	18	8,5
4	25,0	19	8,0
5	26,2	20	7,5
6	17,0	21	6,0
7	12,8	22	5,0
8	13,0	23	2,0
9	14,0	24	1,8
10	16,0	25	< 1,0
11	12,6	26	< 1,0
12	15,0	27	< 1,0
13	12,5	28	< 1,0
14	8,2	29	< 1,0
15	13,0	30	< 1,0

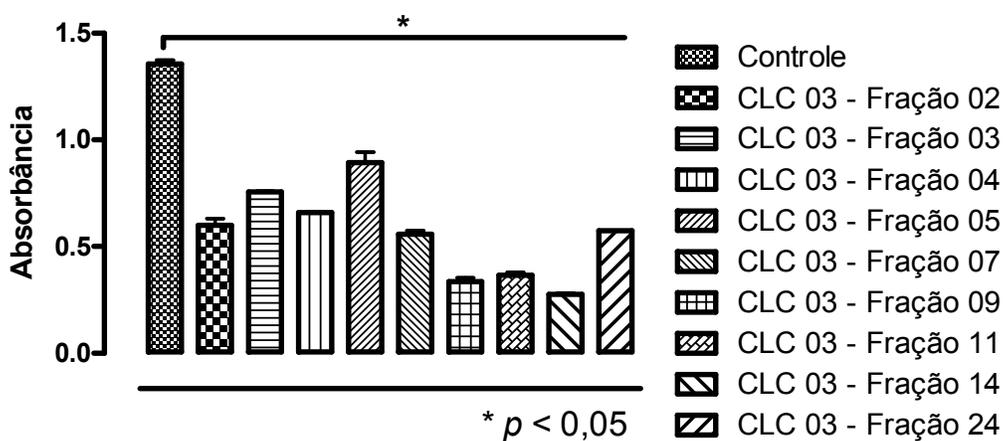
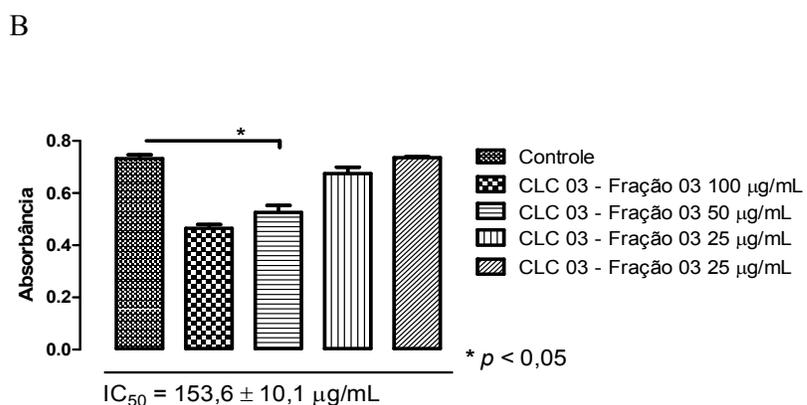
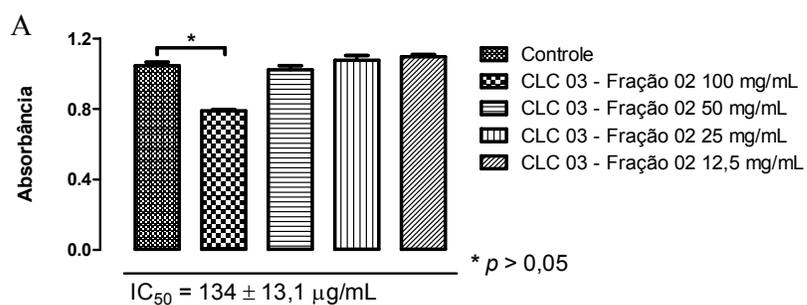


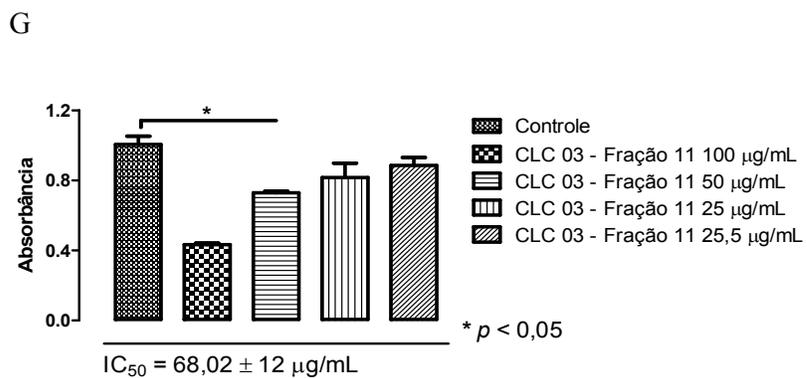
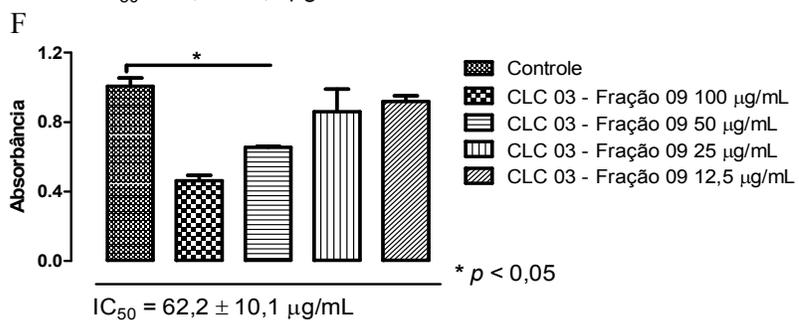
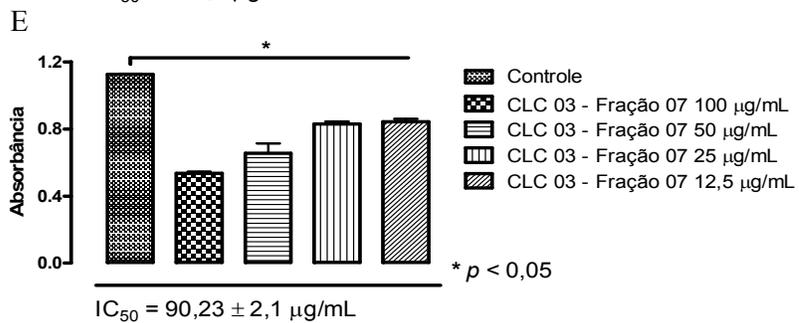
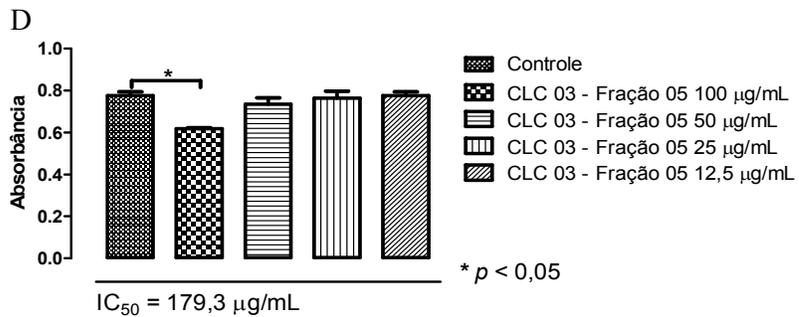
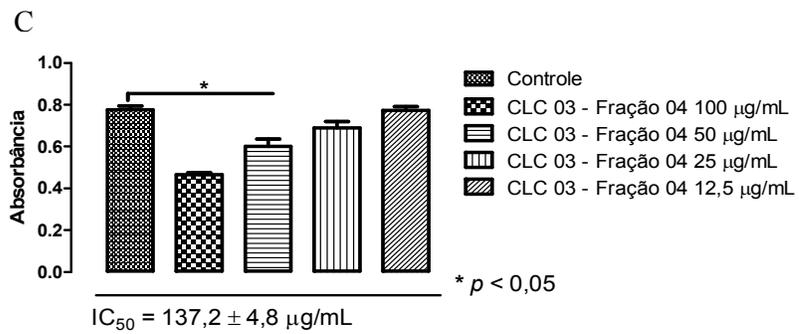
Figura 17. Atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* na presença de 87,5 µg/mL das frações resultantes da CLC 03.

Após análise dos resultados anteriores, as frações com massa significativa (maior que 1,5 mg) foram utilizadas para determinação da IC<sub>50</sub> da atividade enzimática (Figura 18 e 19, Tabela 5).

Tabela 5. Concentração inibitória de 50% da atividade da enzima arginase de *L. (L.) amazonensis* por frações da CLC 03.

Fração	IC <sub>50</sub>
02	134 ± 13,4 µg/mL
03	153,6 ± 10,1 µg/mL
04	137,2 ± 4,8 µg/mL
05	179,3 µg/mL
07	90,23 ± 2,1 µg/mL
09	62,2 ± 10,1 µg/mL
11	68,02 ± 12 µg/mL
14	54,67 µg/mL





H

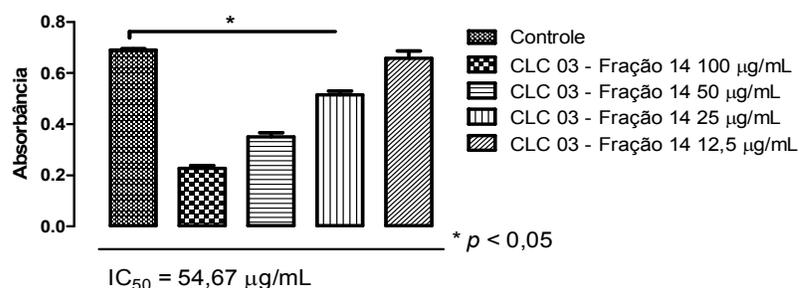


Figura 18. Atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* na presença de diferentes concentrações das frações resultantes da CLC 03.

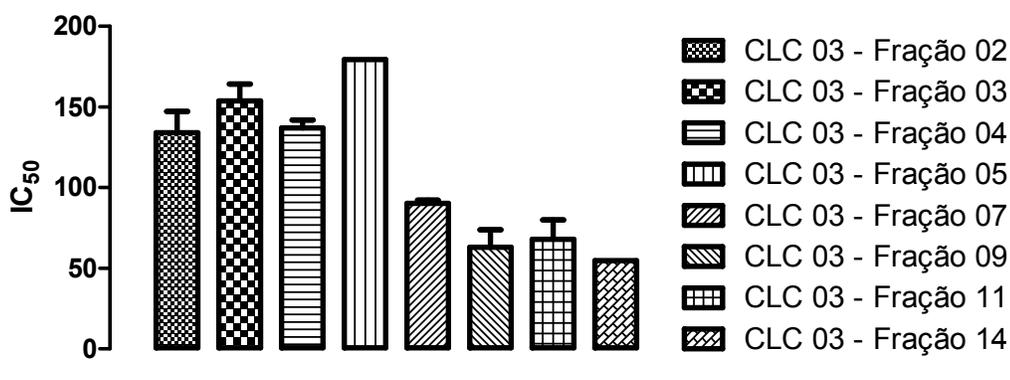


Figura 19. Concentração inibitória de 50% da atividade da arginase de *L. (L.) amazonensis* das frações resultantes da CLC 03.

Após a realização dos testes para avaliação da atividade enzimática, as frações foram utilizadas para verificação do potencial leishmanicida. Devido à pouca massa das frações, não foi possível realizar experimentos com todas as amostras, visto que as frações foram diluídas em DMSO, e assim é necessária uma solução estoque em concentrações acima de 12 mg/mL.

As frações analisadas apresentaram inibições do crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* variando de 20 a 50% na concentração de 100 µg/mL (Figura 20).

#### 4.7 RMN de <sup>1</sup>H e CLAE

Após exaustivas análises de sistemas de solventes para CCDC das frações da CLC 03, buscando sistemas que revelassem uma maior resolução, não foi encontrado um sistema que apresentasse uma boa resolução, possivelmente devido à alta polaridade das frações.

Neste contexto de dificuldade de isolamento das substâncias, a fração 07 da CLC 03,

escolhida aleatoriamente, foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$ , contudo não foi possível determinar a natureza química das substâncias por esta metodologia.

Com intuito de verificar quantas substâncias estavam presentes nas frações da CLC 03, foi utilizada a CLAE com as frações 04, 07 e 08. A fração 04 apresentou substâncias com tempos de retenção de 1,6 e 23,6 min (Figura 21A), na fração 07 foi encontrada apenas uma substância com tempo de retenção de 1,1 min (Figura 21B) e a fração 08 apresentou substâncias com tempos de retenção de 1,1 e 3 min (Figura 21C).

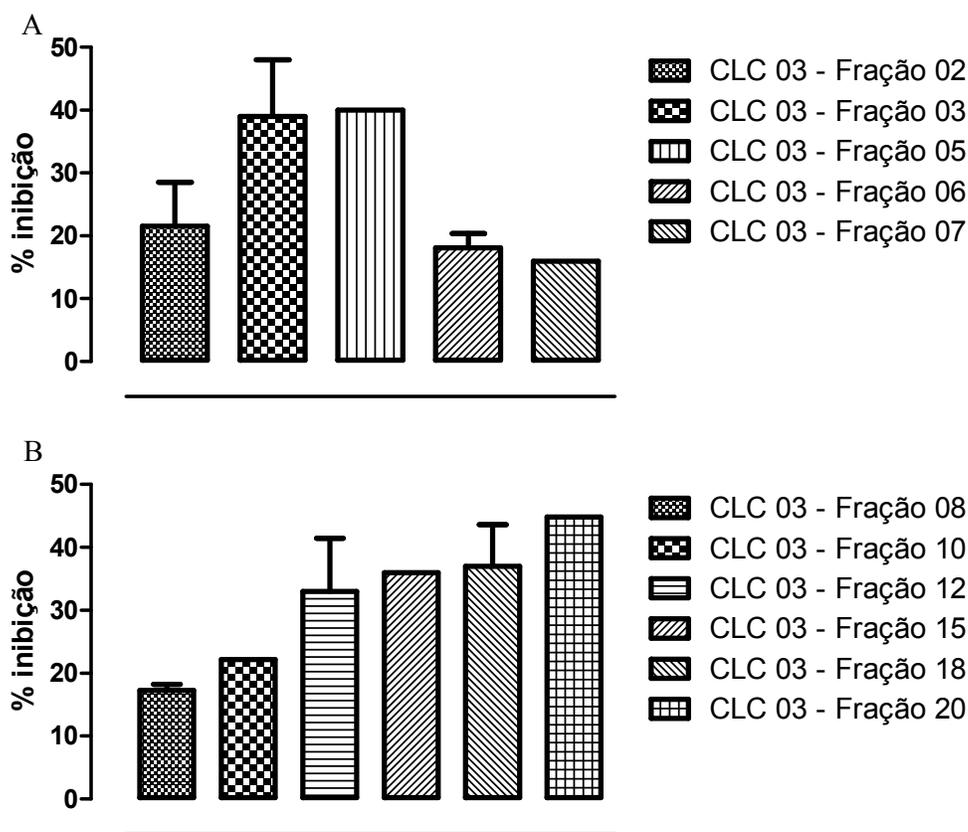


Figura 20. Inibição do crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na presença de 100  $\mu\text{g/mL}$  das frações 02, 03, 05, 06 e 07 (A) e das frações 08, 10, 12, 15, 18 e 20 (B).

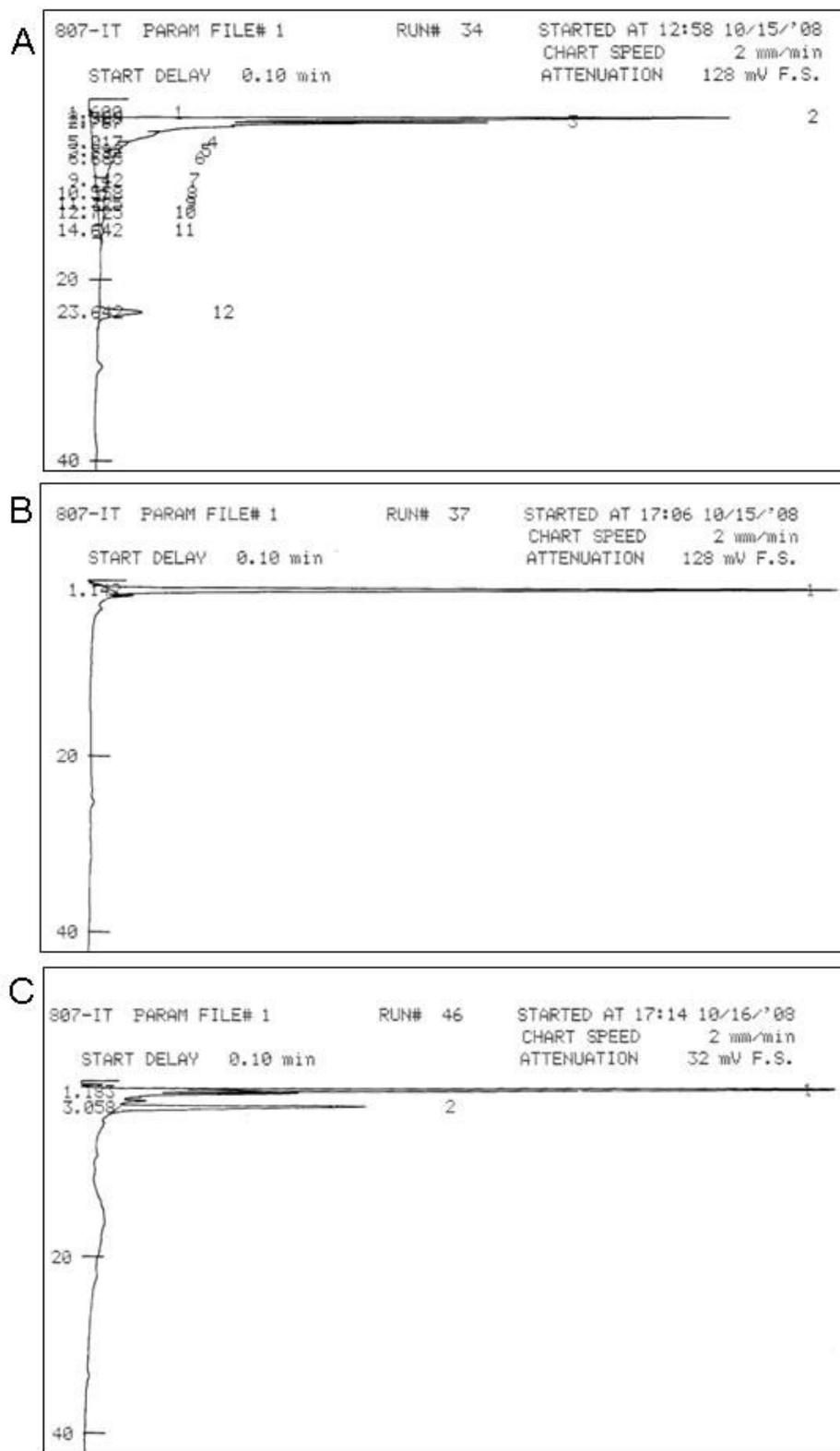


Figura 21. Cromatograma da Fração 04 (A), Fração 07 (B) e Fração 08 (C) da CLC 3 em CLAE, conforme métodos.

#### 4.8 Cinética enzimática

Na determinação da cinética enzimática, avaliou-se qual o tipo de inibição as frações estariam exercendo sobre a arginase. A  $V_{max}$  da arginase sem inibidor foi de 67,94 nmol/min e o  $K_m$  de 12,03 mM, enquanto que na presença do inibidor a  $V_{max}$  caiu para 64,34 nmol/min e o  $K_m$  aumentou para 19,05 mM (Figura 22). Estes dados sugerem um mecanismo de inibição reversível competitiva, pois os valores da  $V_{max}$  são muito próximos podendo ser considerados iguais e o  $K_m$  aumentou.

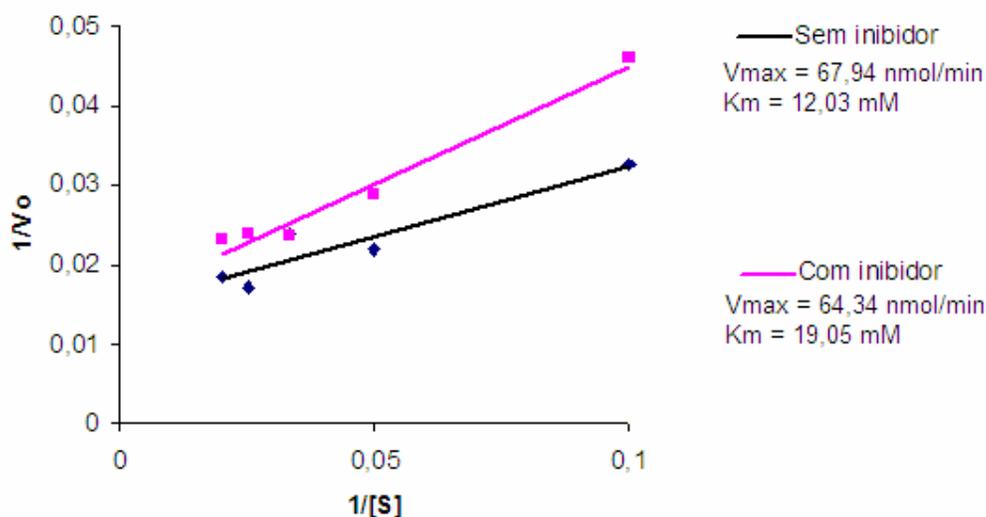


Figura 22. Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk. Avaliação da atividade enzimática na presença de concentrações crescentes de substrato, na presença e ausência de inibidor. Sendo  $V_o$  em nmol/min e  $[S]$  em mM.

#### 4.9 Toxicidade em esplenócitos

A fim de verificar as concentrações tóxicas dos extratos de *C. pachystachya* para células de mamíferos, foi utilizado o ensaio com MTT em cultura de esplenócitos. Utilizou-se apenas o extrato acetato de etila, pois foi o que apresentou maior percentual de inibição da arginase de *L. (L.) amazonensis* e, portanto, usado para seguir o fracionamento.

Nos tempos de 24, 48 e 72 h de incubação com o extrato não houve diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle, desta forma o extrato não apresentou toxicidade nas concentrações utilizadas (Figura 23).

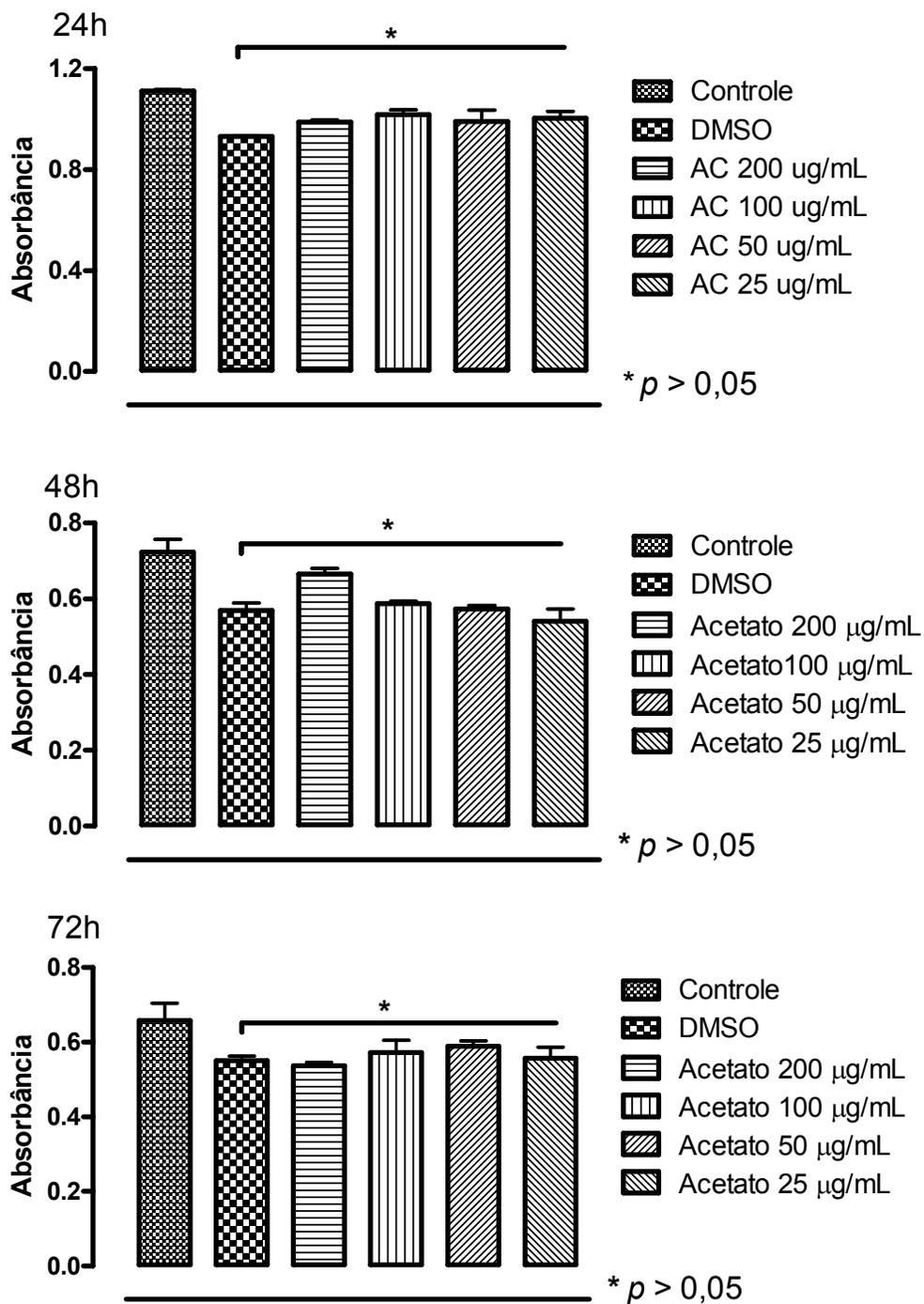


Figura 23. Avaliação da toxicidade em esplenócitos pelo método do MTT na presença de diferentes concentrações do extrato acetato de etila, nos tempos de 24, 48 e 72 h.

#### 4.10 Microscopia eletrônica de transmissão

Na avaliação ultraestrutural de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi observado que as células controle apresentavam-se íntegras, com presença de organelas características, como mitocôndria única que se ramifica ao longo da célula e cinetoplasto. Na análise das células tratadas com o extrato acetato de etila 100 µg/mL, após 72 h, verificou-se que a mitocôndria apresentava concreções eletrodensas na matriz mitocondrial (Figura 24B), além de alterações no arranjo do k-DNA no cinetoplasto (Figura 24C).

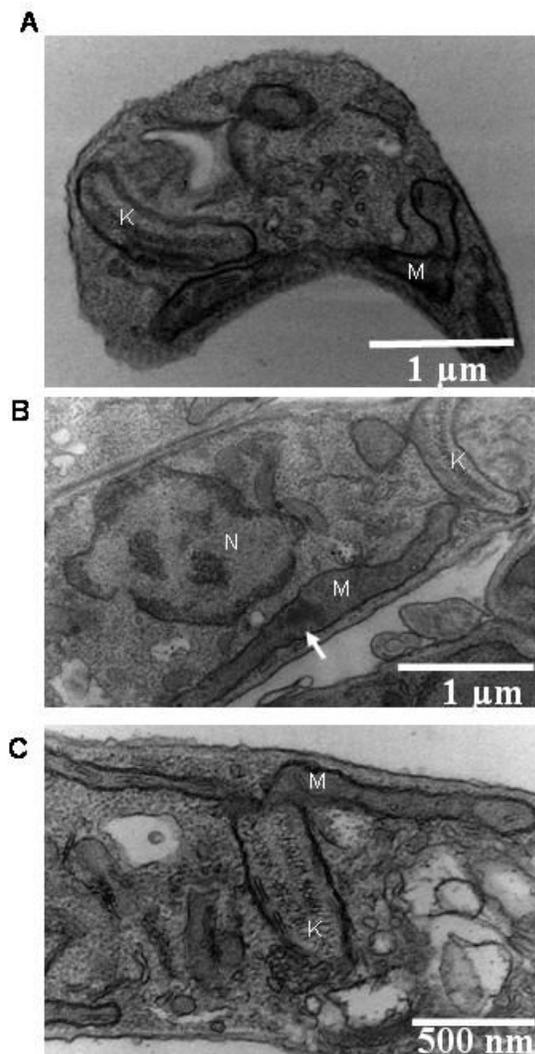


Figura 24. Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com extrato acetato de etila 100 µg/mL, após 72 h. (A) controle. (B) célula tratada apresentando alteração mitocondrial, seta indicando concreção eletrodensa na matriz mitocondrial. (C) célula tratada apresentando cinetoplasto com duas massas de k-DNA em arranjo paralelo. *K* cinetoplasto, *M* mitocôndria, *N* núcleo.

## 5 DISCUSSÃO

Antes de executar a extração do material vegetal, levou-se em consideração a parte da planta e o solvente que deveria ser utilizado. Foram utilizadas as folhas, pois o extrato hidroetanólico das folhas de *C. pachystachya* apresentou uma inibição maior que os extratos de outras partes da planta. O etanol foi utilizado, pois de acordo com Simões (2004), praticamente todos os constituintes de interesse para análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em etanol, além de possuir baixo ponto de ebulição (78,3°C) para posterior extração do solvente.

Após a obtenção do EEB, o processo de fracionamento foi direcionado por ensaios de inibição da enzima arginase de *L. (L.) amazonensis*.

O passo inicial para o fracionamento deu-se com a realização da extração líquido-líquido por partição com solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol), sendo o EEB dissolvido em etanol/água (8:2). Segundo Galagovsky Kurman (1995), para a obtenção de melhores rendimentos o volume total de solvente a ser utilizado na partição foi dividido em alíquotas, pois aumenta a superfície de contato com o líquido extrator.

Após a obtenção dos produtos da partição, tentou-se solubilizar os extratos em água para realização dos testes de inibição enzimática. O extrato hexânico não apresentou nenhuma solubilidade, o diclorometânico foi parcialmente solúvel e os extratos acetato de etila e butanólico apresentaram uma alta solubilidade, sendo o extrato acetato de etila o que apresentou o maior percentual de inibição em comparação com os demais extratos.

Lacaille-Dubois e colaboradores (2001) demonstraram que a fração acetato de etila do extrato hexânico das folhas de *C. pachystachya* inibiu a enzima conversora de angiotensina I (ECA). Entretanto, Ninahuaman e colaboradores (2006) realizaram experimentos em ratos, onde se evidenciou uma diminuição da hipertensão por mecanismos distintos da inibição da ECA. Lima-Landman e colaboradores (2006) sugeriram que o processo de geração da hipotensão poderia estar interferindo nos mecanismos celulares envolvendo o transporte de cálcio no músculo liso.

Com base nestes estudos, Tanae e colaboradores (2007) identificaram algumas substâncias presentes na fração butanólica do extrato aquoso de *Cecropia*, tais como catequinas, procianidinas, flavonóides e ácido clorogênico, podendo ser estas os prováveis princípios ativos que apresentaram atividade cardiovascular, respiratória, gastrointestinal e no

sistema nervoso central.

Com as substâncias encontradas nos trabalhos de Lacaille-Dubois e colaboradores (2001) e Tanae e colaboradores (2007), foram realizados o “docking” para verificar a sobreposição e interação com os seguintes constituintes químicos: catequina, ácido clorogênico, epicatequina, isoorientin, isoquercetrina, isovitexin, orientin e procianidina B<sub>2</sub>.

Silva (2002) construiu o modelo da arginase de *L. (L.) amazonensis* baseado na estrutura cristalográfica da arginase de *R. norvegicus* depositada no “Protein Data Bank” (PDB) com o código 1RLA (Figura 25). A partir do modelo foi utilizado o centro binuclear formado por 2 átomos de manganês (Mn<sup>2+</sup>-Mn<sup>2+</sup>), cofatores da arginase, para definir o ligante que delimita uma região onde a enzima deve interagir com prováveis inibidores (Figura 26).

A partir do modelo tridimensional da arginase de *L. (L.) amazonensis* e a estrutura cristalográfica de *R. norvegicus* (1RLA) foi possível verificar a interação dos potenciais inibidores de arginase presente no extrato de *C. pachystachya*.

A arginase de *R. norvegicus* interage com os ligantes testados utilizando aminoácidos que interagem com a L-arginina e com inibidores como N<sup>o</sup>-hidroxi-L-arginina (produzido como intermediário pela NOS). A arginase de *L. (L.) amazonensis* interage com os ligantes testados utilizando aminoácidos ao redor do sítio ativo, que não interagem diretamente com o substrato L-arginina (Figura 27).

Estas observações podem ser confrontadas com os dados de inibição, onde os constituintes químicos de *C. pachystachya* inibem a arginase de *L. (L.) amazonensis* em concentrações que não causam alteração na atividade da arginase de rato. A figura 27 mostra que as potenciais moléculas que causam inibição na arginase de *L. (L.) amazonensis* estariam impedindo a entrada do substrato no sítio ativo da enzima ou impedindo a saída dos produtos resultantes da reação o que acarretaria uma maior diminuição na velocidade de reação, enquanto que na arginase de *R. norvegicus* ela estaria ligada ao sítio, competindo diretamente pela posição do substrato.

Vale ressaltar que nos ensaios de toxicidade em esplenócitos o extrato acetato de etila não apresentou citotoxicidade nas concentrações até 200 µg/mL, corroborando dados de Ninahuaman e colaboradores (2007).

Após obtenção do extrato acetato de etila, o fracionamento seguido pela CLC 01 originou frações solúveis e insolúveis em metanol, sendo que somente as solúveis em metanol apresentaram uma atividade inibidora da arginase.

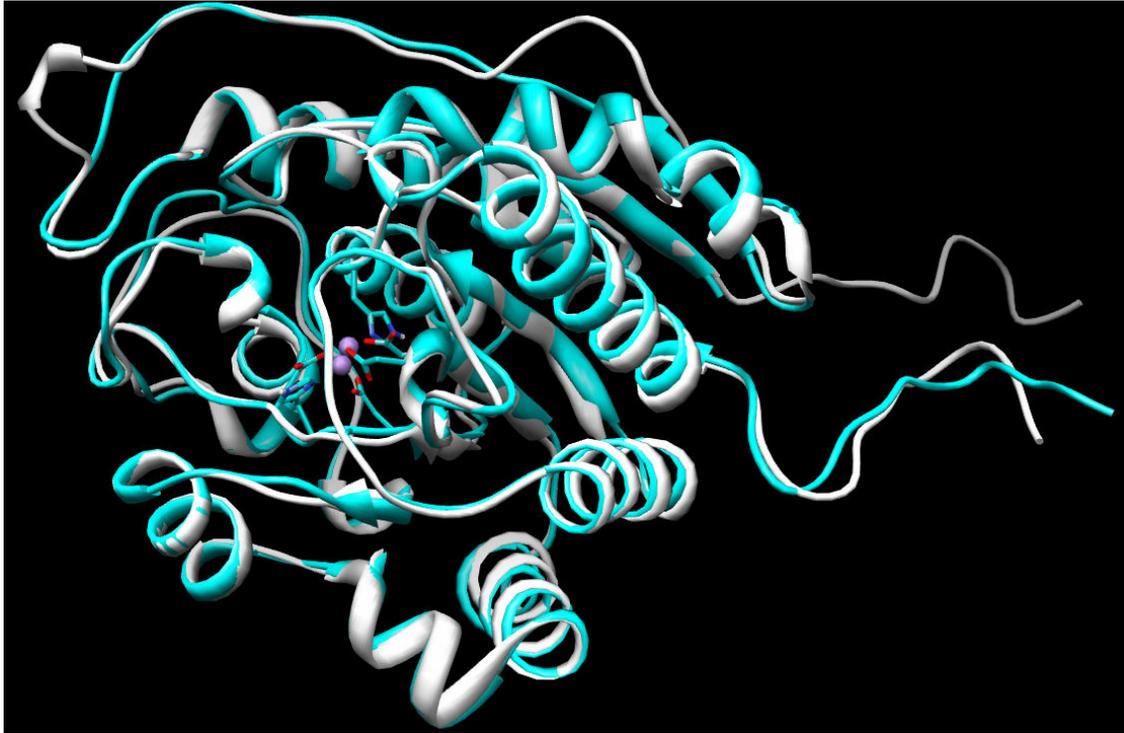


Figura 25. Sobreposição das arginases de *R. norvegicus* (Azul) e de *L. (L.) amazonensis* (cinza); esferas violetas representam o centro binuclear de  $Mn^{2+}$ .

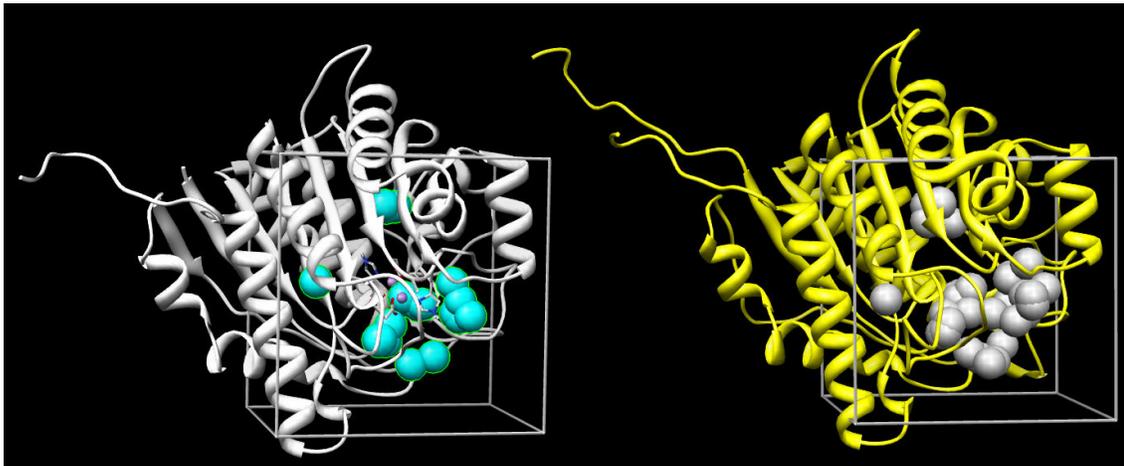


Figura 26. Esferas geradas na região do sítio ativo da arginase ao redor do ligante delimitando região para interação dos potenciais inibidores enzimáticos presentes no extrato etanólico de folhas de *C. pachystachya*. Estrutura cinza representa a arginase de rato e amarela representa a arginase de *Leishmania*. Esferas menores (violeta) na estrutura de rato representa o manganês (ligante). O cubo (caixa) que delimita a região ao redor do ligante é utilizado para gerar o 'grid' de interação ligante-receptor.

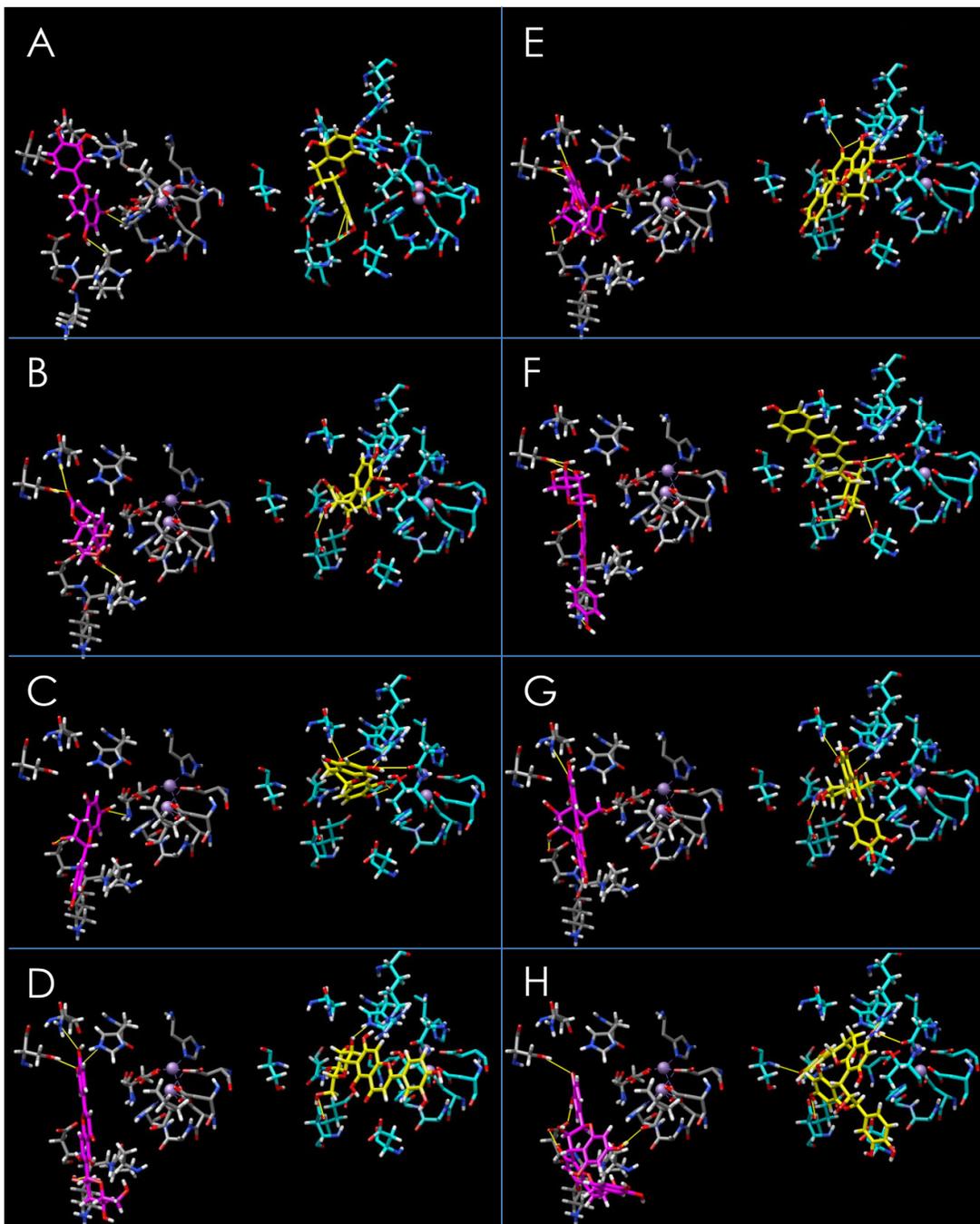


Figura 27. Interação da arginase de *L. (L.) amazonensis* e de *R. norvegicus* com os prováveis ligantes (A) catequina, (B) ácido clorogênico, (C) epicatequina, (D) isoorientin, (E) isoquercetrin, (F) isovitexin, (G) orientin, (H) procianidina B<sub>2</sub>. Ligante rosa: arginase de *L. (L.) amazonensis*. Ligante amarelo: arginase *R. norvegicus*. Pontes de hidrogênio: barras em amarelo.

Após o agrupamento das frações da CLC 01, a IC<sub>50</sub> de inibição da arginase subiu consideravelmente de menor que 10 µg/mL (extrato acetato de etila) para 109,5 µg/mL

(fração F01). Assim, o fracionamento e posterior união de algumas frações não foram eficazes, podendo ter reunido substâncias com alto peso molecular sem atividade inibitória, o que contribuiria para o aumento da  $IC_{50}$ .

A realização da CLC 02 com a fração F01 objetivou retirar os prováveis constituintes que não promoveriam a inibição enzimática. Algumas frações foram descartadas por não apresentarem solubilidade em metanol, mas restaram 11 frações com uma considerável atividade inibitória.

A tentativa de excluir as frações com atividade inibidora da arginase de *R. norvegicus* não se mostrou eficaz, visto que nenhuma fração inibiu a atividade enzimática. Este resultado já era esperado, visto que o extrato acetato de etila inibiu apenas 7% da atividade da arginase de *R. norvegicus* (dados não mostrados). A idéia do desenvolvimento de um fármaco que atue apenas o parasito esta sendo atingida com sucesso neste estudo, visto que as frações apresentam uma grande seletividade.

Mesmo apresentando características semelhantes quanto ao potencial inibitório, as frações apresentaram um perfil um pouco diferenciado na CCDC, que permitiram agrupá-las nos grupos B1 a B5. Na análise da atividade contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, a fração B3 (fração 12 da CLC 02) apresentou uma diferença significativa em relação às outras frações, apesar de possuir o mesmo percentual de inibição da arginase que as outras frações. No entanto, na análise da CCDC, ela apresentou-se com manchas diferenciadas, mas ainda com zonas similares às demais. De fato, foi a mancha escura próxima à origem o fator decisivo para formação de um único grupo para a fração 12 da CLC 02.

Na tentativa de isolar os constituintes químicos da fração B3, utilizamos a CLC 03, tendo como fase estacionária Sephadex<sup>®</sup> LH 20, bem conhecida pela potencialidade em separar moléculas com as mesmas polaridades e tamanhos distintos (AB, 1978).

Após o fracionamento por CLC 03, foram coletadas 30 frações sendo que apenas 15 foram utilizadas para realização dos ensaios devido à pouca massa das frações e apenas oito foram escolhidas para verificar a inibição da arginase (apenas as frações com maior massa).

As frações 02 a 14 apresentaram uma diminuição da  $IC_{50}$  da atividade enzimática, à medida que o número da fração aumentava. Quando verificamos a inibição do crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi constatado que as frações iniciais apresentavam uma inibição de até 40% do crescimento do parasito e até 30% de inibição enzimática, enquanto que as frações que apresentaram uma  $IC_{50}$  da atividade enzimática em torno de 70  $\mu\text{g/mL}$  também apresentaram uma inibição do crescimento do parasito de até 40%. No entanto,

algumas frações que também apresentaram a  $IC_{50}$  da arginase em torno de 70  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram menos que 20% de inibição do crescimento do parasito na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  da arginase.

Desta forma, podemos inferir a existência de outros mecanismos que atuariam juntamente com a inibição da arginase para diminuição do crescimento do parasito. É preciso ter em mente também que o processo de fracionamento não foi eficaz, pois na análise dos dados de CLAE e RMN de  $^1\text{H}$  as amostras ainda se apresentavam como misturas.

No estudo realizado por Lacaille-Dubois e colaboradores (2001), após o fracionamento do extrato acetato de etila de *C. pachystachya* por coluna Sephadex LH 20 usando acetato de etila/etanol/água (2:1:2) como eluente, obteve-se 8 frações, que foram analisadas por CLAE/UV comparando com padrões comerciais. Foram identificados os compostos: ácido protocatequínico e ácido clorogênico na fração 02; e catequina, epicatequina, isovitexina e isoqueretrina na fração 03. Identificou-se também a isoorientina por RMN de  $^1\text{H}$  em frações bem posteriores.

Tasdemir e colaboradores (2006) realizaram um estudo buscando relacionar a estrutura-atividade leishmanicida de flavonóides e seus análogos, onde mostraram que a catequina, epicatequina e vitexina apresentavam uma  $IC_{50}$  maior que 30  $\mu\text{g/mL}$  e a quercetrina mostrou uma  $IC_{50}$  de 17,7  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, se substâncias encontradas nas frações CLC 03 forem realmente as mesmas supracitadas nos trabalhos publicados, há um confirmação da atividade leishmanicida das frações estudadas.

Quanto à inibição da arginase, Iniesta e colaboradores (2001) e Roberts e colaboradores (2004) relataram que a arginase é essencial para o crescimento do parasito, Gaur e colaboradores (2007) mostraram que a ausência da arginase do parasito diminui a infecção em camundongos, uma vez que a infecção é controlada pela produção de NO pela NOS II, corroborando os dados encontrados neste estudo.

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão foi possível perceber uma desorganização do k-DNA e alterações na mitocôndria, o que pode ser relacionado à inibição da arginase, visto que a inibição da síntese de poliaminas poderia acarretar uma diminuição na síntese de tripanotona, e, portanto, prejudicando a detoxificação de ROS, o que levaria a um estresse oxidativo.

Vannier-Santos e colaboradores (2008) também demonstraram que um inibidor do metabolismo de poliaminas poderia provocar alterações mitocondriais e desorganização do k-DNA, provocados pela diminuição da síntese da molécula antioxidante mais eficaz em

tripanossomatídeos, a tripanotiona.

Os depósitos eletrondensos na matriz mitocondrial podem estar relacionados ao estresse oxidativo, pois semelhantes estruturas foram detectadas em organelas redox (hidrogenossomos) de *Tritrichomonas faetus* deficientes em poliaminas (REIS et al., 1999) e em mitocôndria de *L. (L.) amazonensis* em condição de inibição da atividade de superóxido dismutase (dados não publicados).

Uma vez que a inibição da arginase do parasito pelas substâncias presentes no extrato de *C. pachystachya* promoveu uma redução no crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, pode-se inferir que também haja uma redução da infecção em macrófagos, principalmente pela forma amastigota, tendo em vista os mecanismos de defesa da célula hospedeira, principalmente a produção de NO.

## 6 CONCLUSÃO

- O extrato acetato de etila de *C. pachystachya* apresentou uma forte inibição da arginase de *L. (L.) amazonensis*, uma leve inibição da arginase de *R. norvegicus* e não apresentou toxicidade em esplenócitos.
- Na análise ultraestrutural de promastigotas tratadas com o extrato acetato de etila foi possível perceber alterações mitocondriais e no k-DNA, que sugerem uma diminuição na detoxificação de ROS, provocados pela diminuição da tripanotona em consequência da inibição da arginase.
- De acordo com o ‘docking’, as prováveis substâncias presentes no extrato acetato de etila interagem com os aminoácidos ao redor do sítio ativo da arginase de *L. (L.) amazonensis*, impedindo a entrada da L-arginina ou a saída dos produtos resultantes da reação enzimática, o que acarretaria uma diminuição na velocidade máxima da reação, enquanto que na arginase de *R. norvegicus* elas estariam ligadas ao sítio catalítico competindo diretamente pela posição do substrato.
- Com os resultados obtidos, as frações da CLC03 parecem interferir em um outro mecanismo que promova a morte do parasito além da inibição da arginase.
- Após os fracionamentos realizados, as frações ainda se mostravam como misturas quando analisadas por CLAE e RMN de <sup>1</sup>H.
- A diminuição da proliferação das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pode favorecer a diminuição da infecção em macrófagos, mediado pela produção de NO.

## 7 BIBLIOGRAFIA

AB - Amersham Biosciences. Sephadex LH-20 chromatography in organic solvents. **AB**: 10, 1978.

ABD-EL-ALEEM, S.A.; FERGUSON, M.W.; APPLETON, I.; KAIRSINGH, S.; JUDE, E.B.; JONES, K.; McCOLLUM, C.N.; IRELAND, G.W. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. **J. Pathol.**, 191(4): 434-42, 2000.

AHASAN, H.A.; CHOWDHURY, M.A.; AZHAR, M.A.; RAFIQUEUDDIN, A. K.; AZAD K.A. Deaths in visceral leishmaniasis (Kala-azar) during treatment. **Med. J. Malaysia**, 51(1): 29-32, 1996.

ALBINA, J.E.; CUI, S.; MATEO, R.B.; REICHNER, J.S.; Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, 150(11): 5080-5085, 1993.

ALBINA, J.E.; HENRY, W.L.Jr.; MASTROFRANCESCO, B.; MARTIN, B.A.; REICHNER, J.S.; Macrophage activation by culture in an anoxic environment. **J. Immunol.**, 155(9): 4391-4396, 1995.

ALMEIDA, R.R.; RAIMUNDO, J.M.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; GATASS, C.R.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 33: 109-113, 2006.

ALVES, P.L.C.A.; PAVANI, M.C.M.D. **Instruções básicas para a coleta e preparação de material botânico a ser herborizado**. Jaboticabal: FUNEP, 1991.

ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V. & LEON, L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, 49: 751-754, 1998.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** 30: 1269-1281, 2000.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.; CUBRIA, J.C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, 30: 435-444, 1998.

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

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 44: 536-546, 1991.

BATES, P.A. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. **Parasitology**, 108( Pt 1): 1-9, 1994.

BERGMANN, B.R., COSTA, S.S. & MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **B. J. A. Adv. Science.** 49: 395-402, 1997.

BEZERRA, J.L. et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, 16: 631-637, 2006.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol. Rev.** 173: 17-26. 2000.

BOUCHER, J.L.; MOALI, C.; TENU, J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. **Cell Mol. Life Sci.**, 55(8-9): 1015-28, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos e Notificações. **Taxa de incidência leishmaniose tegumentar americana.** 2005. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2006/d0204.def>>. Acesso em: 10/out/2008.

BRASIL. Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2000.

CABALLERO-GEORGE, C.; VANDERHEYDEN, P.M.L.; SOLIS, P.N.; PIETERS, L.; SHAHAT, A.A.; GUPTA, M.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A.J. Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. **Phytomedicine**, 8: 59-70, 2001.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, 55 (3): 37-39, 2003.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, L.S.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; SOLIS, P.N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, 56: 203-210, 2000.

CAMARGO, E.P.; COELHO, J.A.; MORAES, G.; FIGUEIREDO, E.N. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. **Exp. Parasitol.**, 46(2): 141-144, 1978.

CAMARGO, E.P. Enzimas do ciclo ornitina-arginina em tripanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico. **Tese de Livre Docência:** Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

CAMARGO, E.P.; SILVA, S.; ROITMAN, I.; SOUZA, W.; JANKEVICIUS, J.V.; DOLLET, M. Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. **J. Protozool.**, 34: 439-441, 1987.

CAMARGO, M.C.; MATOS, S.; TOLEDO, C.E.M.; SILVA, E.R. Determinação de parâmetros de controle de qualidade da matéria-prima vegetal *Cecropia pachystachya* Trécül (Embaúba). **Anais IV Jornada de Iniciação Científica do Centro Universitário Luterano de Palmas.** Palmas: CEULP/ULBRA, 2004.

CARVALHO, P.B. & FERREIRA, E.I.L. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership

- against an ancient disease. **Fitoterapia**, 72:599-618, 2001.
- CHANG, K.P.; Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. **Int. Rev. Cytol. Suppl.**, 14: 267-305, 1983.
- CHANG, C.I.; LIAO, J.C.; KUO, L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. **Am. J. Physiol.**, 274(1Pt 2): H342-8, 1998.
- COLLELUORI, D.M.; MORRIS, S.M. JR; ASH, D.E. Expression, purification, and characterization of human type II arginase. **Arch. Biochem. Biophys.** 389(1): 135-143, 2001.
- CONNOLLY, M. **Ph.D. Thesis**. University of California, Berkeley, 1981.
- CONSOLINI, A.E. & MIGLIORI, G.N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **J. Ethnopharmacol.**, 96: 417-422, 2005.
- CONSOLINI, A.E.; RAGONE, M.I.; MIGLIORI, G.N.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M.G. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **J. Ethnopharmacol.**, 106: 90-96, 2006.
- CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMAN, K.; MODOLL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 206(2): 667-673, 1995.
- COX, J.D.; KIM, N.N.; TRAISH, A.M.; CHRISTIANSON, D.W. Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. **Nat. Struct. Biol.**, 6(11): 1043-1047, 1999.
- CHRISTIANSON, D.W. Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. **Acc. Chem. Res.**, 38: 191-201, 2005.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, 123 (3): 399-410, 2006.
- CRUZ, E. M.; SILVA, M.F.L.; FLOETER-WINTER, L. M.; TOLEDO, C.E.M.; SILVA, E.R. Inibição da arginase de *Rattus norvegicus* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *in vitro* e *in vivo* pela *Cecropia pachystachya* Trécul. **Anais V Congresso e VII Jornada de Iniciação Científica**. Palmas: CEULP/ULBRA, 2007.
- CUNNINGHAM, J.M.; MABLEY, J.G.; GREEN, I.C. Interleukin 1beta-mediated inhibition of arginase in RINm5F cells. **Cytokine**, 9(8): 570-576, 1997.
- DAGHIGH, F.; FUKUTO, J.M.; ASH, D.E.. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, N-G-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 202(1): 174-180, 1994.
- DAVIES, C.R.; KAYE, P.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**, 326: 377-82, 2003.

DELLA MONACHE, F.; GIACOMOZZI, C.A.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; Isolamento e identificação da isovitexina obtida de frações farmacologicamente ativas da *Cecropia glaziovii*. **Res. X Simp. Plantas Méd. do Brasil**, São Paulo, 5: 6, 1988.

DI STASI, L.C. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical atlantic Forest. **Fitoterapia**, 73: 69-91, 2002.

DESJARDINS, M. Biogenesis of phagolysosomes: the kiss and run hypothesis. **Trends Cell Biol.**, 5: 183-186, 1995.

FELDMAN, P.L.; GRIFFITH, O.W.; HONG, H.; STUEHR, D.J. Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. **J. Med. Chem.**, 36(4): 491-496, 1993.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUNÕZ, V.; HOCQUEMILLER, C.A. Effects of natural naphthoquinones in Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, 43: 219-222, 1992.

FRANÇA, F.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 29: 229-232, 1996

FUNASA. **Bol. Eletr. Epidemiol.**, 1(1): 12.03.2003. Disponível em: <[http://www.funasa.gov.br/internet/Bibli\\_boletins.asp](http://www.funasa.gov.br/internet/Bibli_boletins.asp)>.

GALAGOVSKY KURMAN, L. **Química orgânica: fundamentos teóricos-práticos para o laboratório**. Buenos Aires: Eudeba, 1995.

GAUR, U.; ROBERTS, S.C.; DALVI, R.P.; CORRALIZA, I.; ULLMAN, B.; WILSON, M.E. An Effect of Parasite-Encoded Arginase on the Outcome of Murine Cutaneous Leishmaniasis. **J. Immunol.** 179: 8446-8453, 2007.

GODAL, T. Fighting the parasites of poverty: public research, private industry, and tropical diseases. **Science**. 264: 1864-7, 1994

GOTOH, T.; SONOKI, T.; NAGASAKI, A.; TERADA, K.; TAKIGUCHI, M; MORI, M. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. **FEBS Lett.**, 395 (2-3): 119-22, 1996.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B.Jr.; McMAHON, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 41: 687-725, 1989.

GRIMALDI, G.; MOMEM, H.; NAIFF, R.D.; McMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T.V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 44: 645-661, 1991.

GRIMALDI, G. R. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and

implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 230–250, 1993.

GRODY, W.W.; KERN, R.M.; KLEIN, D.; DODSON, A.E.; WISSMAN, P.B.; BARSKY, S.H.; CEDERBAUM, S.D. Arginase deficiency manifesting delayed clinical sequelae and induction of a kidney arginase isozyme. **Hum. Genet.**, 91(1): 1-5, 1993.

HEBBY, O.; PERSSON L.; RENTALA M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. **Amino Acids**, 33: 359–366, 2007.

HELLERMANN, L. & PERKINS, M. E. Activation of enzymes II. The role of metal ions in activation of arginase. The hydrolysis of arginina induced by certain metal ions with urease. **J. Biol. Chem.**, 112: 174-94, 1935.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, 25: 363-370, 2000.

HEPBURN, N.C. Management of cutaneous leishmaniasis. **Curr. Opin. Infec. Dis.**, 14: 151-154, 2001

HERWALDT, B. Leishmaniasis. **The Lancet**, 354: 1191-1199, 1999.

HERZFELD, A. & RAPER, S.M. The heterogeneity of arginases in rat tissues. **Biochem. J.**, 153(2): 469-478, 1976.

HIRSCH-KOLB, H.; KOLB, H.J.; GREENBERG, D.M. Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase. **J. Biol. Chem.**, 246 (2): 395-401, 1971.

HOFF C., SILVA E. R., RIBEIRO E. C. Utilização de extratos vegetais para a farmacoterapia da leishmaniose. In: V Jornada de Iniciação Científica do Centro Universitário Luterano de Palmas, 2005. **Anais**. Palmas: CEULP/ULBRA, 2005.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L.C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **J. Exp. Med.**, 193(6): 777-84, 2001.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today**, 10: 65-68, 1994.

IYER, R, JENKINSON CP, VOCKLEY JG, KERN RM, GRODY WW, CEDERBAUM S. The human arginases and arginase deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 21: 86-100, 1998.

JENKINSON, C.P.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM, S.D. Comparative properties of arginases. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, 114(1): 107-132, 1996.

JIANG, Y.; ROBERTS, S.C.; JARDIM, A.; CARTER, N.S.; SHIH, S.; ARIYANAYAGAM, M.; FAIRLAMB, A.H.; ULLMAN, B. Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, 274(6): 3781-3788, 1999.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANA, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASH, M.; KOMIYAMA,

K. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **J. Nat. Prod.**, 61: 1332-1336, 1997

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; KOMIYAMA, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffi thii*. **Phytochemistry**, 50: 75-79, 1999.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, 77: 307-314, 2000.

KEPKA-LENHART, D.; MISTRY, S.K.; WU, G.; MORRIS, S.M. JR. Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? **Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 279(6): R2237-42, 2000.

KERWIN, J.F. JR; LANCASTER, JR.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **J. Med. Chem.**, 38(22): 4343-4362, 1995.

KIM, H.M., KIM, M.J, LI, E., LYU, Y.S., HWANG, C.Y., A.N., N. H., The nitric oxide-production properties of *Solanum lyratum*. **J. Ethnopharmacol.**, 67: 163-169, 1999.

KREBS, H. A. & HENSELEIT, K. Urea formation in the animal body. **Z. Physiol. Chem.** 210: 33-66, 1932.

KUHN, N.J.; TALBOT, J.; WARD, S. The pH-sensitive control of arginase by Mn(II) ions at submicromolar concentrations. **Arch. Biochem. Biophys.**, 286 (1): 217-221, 1991.

KUNTZ, I.D.; BLANEY, J.M.; OATLEY, S.J.; LANGRIDGE, R. FERRIN, T.E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.** 161: 269-288, 1982

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H.; Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, 8: 47-52, 2001.

LI, H.; MEININGER, C.J.; HAWKER, JR.; HAYNES, T.E.; KEPKA-LENHART, D.; MISTRY, S.K.; MORRIS, S.M. JR.; WU, G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 280(1): E75-82, 2001.

LIMA-LANDMAN, M.T.R.; BORGES, A.C.R.; CYSNEIROS, R.M. DE LIMA, T.C.M. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, 14: 314-320, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MAHAIO, U.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **J. Nat. Prod.**, 58: 324-328, 1995.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995.

MATHIAS, L.A. & EMILY, A. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of

Marajó Island, Pará - Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, 40:53-75, 1993.

MILLS, C.D.; SHEARER, J.; CALDWELL, M.D. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. **J. Immunol.**, 149(8): 2709-2714, 1992.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A.K. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sciences**, 63: 1823-1834, 1998.

MOHAMED, M.S. Evidence for the presence of two enzymes with arginase activity. **Acta Chem. Scand.**, 4: 990-992, 1950.

MONTANARI, C.A. & BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, 24(1): 105-111, 2001.

MOREIRA, R.C.R.; REBÊLO, J.M.M.; GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pub.**, 18: 187-195, 2002.

MOREIRA, R.C.R. et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, 17(1): 59-63, 2007.

MOSSER, D.M.; KARP, C. L. Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. **Curr. Opin. Immunol.** 11: 406-411. 1999.

MOUSTAKAS, D.T.; LANG, P.T.; KUNTZ, I.D.; BROOJIMANS, N.; RIZZO, R.C. Development and Validation of a Modular, Extensible Docking Program: DOCK 5. **J. Comput. Aided Mol. Design.** 20: 601-609, 2006.

MURRAY, H.W. & DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous  $\gamma$ -interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun.**, 68: 288-293, 2000.

NEIDLEIN, R. & KOCH, E. Structure of constituents from *Cecropia adenopus* Martins. **Arch. Pharm.**, 313: 498-508, 1980.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 10<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

NEWMAN, D.J & CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **J. Nat. Prod.**, 70(3): 461-477, 2007.

NINAHUAMAN, M.F.M.L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine**, 14: 321-327, 2007.

OMS – Organização Mundial de Saúde: **Leishmania/HIV co-infecção sudoeste da Europa**

1990-1998, WHO/LEISH/2000.42. Geneva: World Health Organization, 2000.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Disease Leishmania**. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat.**, 7: 257-266, 2004.

PEREZ-VICTORIA, F.J.; SANCHEZ-CANETE, M.P.; SEIFERT, K.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. **Drug Resist. Updat.**, 9: 26-39, 2006.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 321: 970-974, 2008.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem**. 25(13): 1605-1612, 2004

PINTO, C.A.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**, 25 (1): 45-61, 2002.

QUEIROZ, E.F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A. Pseudoephedrine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **J. Nat. Prod.**, 59: 438-440, 1996.

RAMOS-E-SILVA, M. & JACQUES, C.M.C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brasil. **Clin. Dermatol.**, 20:122-134, 2002.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, 26 (4): 550-555, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

REIS, I.A.; MARTINEZ, M.P.; YARLETT, N.; JOHNSON, P.J.; SILVA-FILHO, F.C.; VANNIER-SANTOS, M.A. Inhibition of Polyamine Synthesis Arrests Trichomonad Growth and Induces Destruction of Hydrogenosomes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 43 (8): 1919-1923, 1999.

RICHARDS, F.M. Structure of proteins. **Ann. Biophys. Bioeng Rev**. 6: 151-176, 1977.

ROBERTS, S.C.; TANCER, M.J.; POLINSKY, M.R.; GIBSON, K.M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. **J. Biol. Chem.**, 279: 23668-23678,

2004.

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

ROSKOSKI R, JR. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RUSSEL, D.G. Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. **Curr. Opin. Immunol.**, 7(4): 479-484, 1995.

SACKS, D.L. & PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**. 223: 1417-1419, 1984.

SALAS, I.; MORALES, O.M.; BRENES, J.R. Effect of chronic administration of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) on mean arterial pressure in rats. **Rev. Biol. Trop.**, 35: 359-362, 1987.

SANT'ANA, P.J.P. **Bioprospecção no Brasil** – Contribuições para uma gestão ética. Brasília: Paralelo, 15, 2002.

SILVA, S.A.G.; DA COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMAN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**, 60: 201-210, 1995.

SILVA, E.R.; CASTILHO, T.M.; PIOKERA, F.C.; SILVA, C.H.T.P.; FLOETER-WINTER, L.M. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. **Int J Parasitol.** 32(6): 727-37, 2002.

SILVA, E.R.; SILVA, M.F.L.; FISCHER, H.; MORTARAC, R.A.; MAYER, M.G.; FRAMESQUIF, K.; SILBERE, A.M.; FLOETER-WINTER, L.M. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Mol. Bioch. Parasit.**, 159: 104-111, 2008.

SIMOES, M. O.; S. CHENKEL, E. P.; COSMAN G.; PALAZZO, J. C.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 2ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SONOKI, T.; NAGASAKI, A.; GOTOH, T.; TAKIGUCHI, M.; TAKEYA, M.; MATSUZAKI, H.; MORI, M. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissue *in vivo* by lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, 272(6): 3689-3693, 1997.

SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; DE LIMA, T.C.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, 15: 462-469, 2008.

STRYER, L. **Bioquímica**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

- STUEHR, D.J.; GROSS, S.S.; SAKUMA, I.; LEVI, R.; NATHAN, C.F. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. **J. Exp. Med.**, 169(3): 1011-20, 1989.
- TANAE, M.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; DE LIMAB, T.C.M.; SOUCCARA, C.; LAPA, A.J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, 14: 309–313, 2007.
- TASDEMIR, D; KAISER, M.; BRUN, R; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F. RUEDI. P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrob. Agents Chemo.**, 50(4): 1352–1364, 2006.
- TORRES-SANTOS, E.C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; MEIRELLES, M.N.; BERGMANN, B.R. Selective effect of 2,6-dihydroxy-4-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Chem.**, 43: 1234-1241, 1999.
- VANNIER-SANTOS, M.A.; MENEZES, D.; OLIVEIRA, M.F.; MELLO, F.G. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. **Microbiology**, 154: 3104–3111, 2008.
- VAN-VOOHIS, W.C. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. **Drugs**, 40: 176-202, 1990.
- VARGAS HOWELL, R. & ULATE MONTERO, G. Diuretic effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) on albino rats. **Rev. Biol. Trop.**, 44: 93–96, 1996.
- VIDRIO, H.; GARCIA-MARQUEZ, F.; REYES, J.; SOTO, R.M. Hypotensive activity of *Cecropia obtusifolia*. **J. Pharm. Sci.**, 71(4): 475–476, 1982.
- WANG, W.W.; JENKINSON, C.P.; GRISCAVAGE, J.M.; KERN, R.M.; ARABOLOS, N.S.; BYRNS, R.E.; CEDERBAUM, S.D.; IGNARRO, L.J. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 210(3): 1009-1016, 1995.
- WU, G.; MORRIS, S.M. JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem. J.**, 336(1): 1-17, 1998.
- YANG, D. M. & LIEW, F.Y., Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, 106: 7-11, 1992.
- YIP, M.C. & KNOX, W.E. Function of arginase in lactating mammary gland. **Biochem. J.**, 127(5): 893-899, 1972.
- YOSHIDA, N. & CAMARGO, E.P. Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. **J. Bacteriol.**, 136(3): 1184-1186, 1978.