



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIPROMASTIGOTA DE
EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Virola surinamensis* (Rol. ex
Rottb.) Warb (Myristicaceae)**

Maria Elinete Veras Saraiva

BELÉM – PARÁ

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIPROMASTIGOTA DE
EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Virola surinamensis* (Rol. ex
Rottb.) Warb (Myristicaceae)**

Autor: Maria Elinete Veras Saraiva

Orientador: Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e medicamentos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PARÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Saraiva, Maria Elinete Veras.

Atividades Antimicrobiana e antipromastigota de extratos e frações de *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb (Myristicaceae) / Maria Elinete Veras Saraiva ; orientador, Lourivaldo da Silva Santos - 2012.
72 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia. Belém, 2012.

1. Plantas medicinais - Pesquisa. 2. Extratos. 3. *Virola surinamensis*. 4. Atividades antimicrobiana – Avaliação. 5. Antipromastigota. 6. Doenças negligenciadas. I. Título.

CDD: 615.329

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Elinete Veras Saraiva

Avaliação das atividades antimicrobiana e Antipromastigota de *Virola surinamensis* (Rol.) Warb (Myristicaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e medicamentos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/____

Conceito _____

Banca examinadora

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos - Orientador

Instituição: PPGCF- UFPA

Assinatura: _____

Prof. Dr. Francisco Teixeira Martins

Instituição: PPGCF- UFPA

Assinatura: _____

Profa. Dra. Karla Valéria Batista Lima

Instituição: Instituto Evandro Chagas

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e
Meu marido meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e incentivo.

Ao meu marido Mauro Antonio pelo apoio e incentivo diário.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos pela atenção dispensada.

A minha co orientadora Profa. Dra Maria Fâni Dolabela pela orientação, conhecimentos compartilhados e atenção, minha maior incentivadora na execução deste trabalho.

Aos Professores e funcionários do PPGCF/Ufpa, pelo acolhimento e atenção.

A UEPA Universidade do Estado do Pará pela concessão de afastamento parcial das minhas atividades diárias para participar do PPGCF/Ufpa.

A Luelly Oliveira, Mestranda do programa de Pós Graduação de Química (PPGQ) pela obtenção dos extratos e frações utilizados nos ensaios.

Aos colegas de Mestrado por fazerem parte desta importante etapa da minha vida. Especialmente Rosa Márcia Corrêa Saraiva pelo apoio durante a execução dos ensaios microbiológicos.

A Profa Dra Marta Chagas e a equipe técnica do laboratório de microbiologia pelo apoio técnico durante minha estadia neste laboratório.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UFPA), por permitirem seu uso durante a execução dos ensaios biológicos.

Ao Dr Fernando Tobias do Departamento de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas pelo desenvolvimento de parte da pesquisa neste Instituto.

A Marliane Campos do Instituto Evandro Chagas pelo apoio na execução dos ensaios biológicos.

Enfim a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

SARAIVA, M.E.V. **ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIPROMASTIGOTA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb (Myristicaceae).** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém. , 2012.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades antimicrobiana e antipromastigota de extratos de *V. surinamensis* e suas frações. Na obtenção dos extratos foram utilizados solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol) e o extrato acetato de etila foi fracionado em coluna cromatográfica aberta, empregando como fase estacionária gel de sílica e como eluentes misturas de hexano e acetato de etila em gradiente de polaridade crescente. Para avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se o teste de difusão em Agar, sendo utilizados os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. A fração ativa foi submetida à microdiluição, onde se determinou a concentração inibitória mínima (CIM). Na avaliação da atividade antipromastigota utilizou-se a *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, sendo determinadas as concentrações inibitórias mínimas e Concentração Inibitória 50% (CI₅₀). Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico foram submetidos ao ensaio de difusão em Agar, não sendo observadas inibições do crescimento bacteriano e fúngico. Apenas a fração acetato de etila **FA3**, obtida do extrato acetato de etila, inibiu o crescimento do *S. aureus* no teste de difusão em Agar. Porém na microdiluição esta fração mostrou-se inativa (CIM>1000µg/mL). Apenas o extrato hexânico mostrou-se ativo em formas promastigota de *L. amazonensis* e *L.chagasi*. Em síntese, apenas o extrato hexânico mostrou-se ativo em formas promastigota de leishmanias.

Palavras chave: *Virola surinamensis*, *leishmania*, bactéria e fungo.

ABSTRACT

SARAIVA, M.E.V AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF EXTRACTS AND FRACTIONS ANTIPROMASTIGOTA OF *Virola surinamensis* (ex Rol. Rottb.) Warb (Myristicaceae). MSc Thesis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Pará, Belém, 2012.

The present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of extracts and antipromastigota *V. surinamensis* and its fractions. To obtain the extracts have been used increasingly polar solvents (hexane, ethyl acetate and methanol) and the ethyl acetate extract was fractionated into open column chromatography, using as stationary phase silica gel and eluents such as mixtures of hexane and ethyl acetate gradient increasing polarity. To evaluate the antimicrobial activity was used in agar diffusion test being used the following microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The active fraction was subjected to microdilution, which determined the minimum inhibitory concentration (MIC). In assessing the activity antipromastigota used the *Leishmania amazonensis* and *L. chagasi*, being determined the minimum inhibitory concentrations and 50% inhibitory concentration (IC₅₀). Extracts hexane, ethyl acetate and methanol were subjected to agar diffusion test, and there were no inhibitions of bacterial and fungal growth. Just FA3 ethyl acetate fraction obtained from the ethyl acetate extract inhibited the growth of *S. aureus* in the agar diffusion test. But in this fraction microdilution proved inactive (MIC > 1000 µg / mL). Only the hexane extract was active in promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi*. In short, only the hexane extract was active in promastigote forms of *Leishmania*.

Keywords: *Virola surinamensis*, *leishmania*, bacteria and fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Leishmania Sp</i>	23
Figura 2	Ciclo de vida <i>Leishmania spp</i>	24
Figura 3	<i>Virola surinamensis</i> : Folhas, arvoré e frutos.....	28
Figura 4	Fluxograma da obtenção dos extratos Hexanico, Acetato de Etila e Metanólico das folhas de <i>Virola surinamensis</i>	40
Figura 5	Ensaio da Atividade Antipromastigota	44
Figura 6	Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica pelo ensaio de difusão em Agar	50
Figura 7	Ensaio de microdiluição (Atividade anti-estafilocócica da FA3.... Fração acetato de etila)	51
Figura 8	Atividade Antipromastigota de <i>Virola surinamensis</i>	55

LISTA DE ESTRUTURA QUÍMICA

1	Nerodiol.....	17
2	Grandisina.....	30
3	Epigrandisina.....	30
4	Polisiforina.....	30
5	Virolina.....	30
6	Surinamensina.....	30
7	Veraguensina.....	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Meios utilizados para o cultivo de bactérias e fungos.....	37
Quadro 2	Designação das cepas de <i>Leishmania</i>	39
Quadro 3	Interpretação dos resultados para atividade.... antipromastigota	45
Quadro 4	Resultado Comparativo entre os Método de difusão Agar e método da Microdiluição	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em Agar **49**

Tabela 2 Avaliação da atividade antipromastigotas de *Virola surinamensis* frente a *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*. **54**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

AcOEt:	Acetato de etila
CCDC:	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EAE:	Extrato acetato de etila
EBM:	Extrato metanólico
EH :	Extrato hexânico
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent Assay
h:	Hora
Hex:	Hexano
MeOH:	Metanol
mL:	Mililitro
MTT :	Brometo Tialzolil azul de tetrazólio
NNN :	Meio Novy-Nicolle-Mcneal
WHO:	World Health Organization.
µg:	Micrograma
µL:	Microlitro
CCD:	Cromatografia em Camada Delgada
Sb⁵⁺ :	Antimonio pentavalente
ATCC:	American Type Culture Collection
CIM:	Concentração inibitória mínima
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute 1640
D.O :	Densidade óptica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Bactérias e Fungos.....	19
2.2	Leishmaniose	21
2.3	<i>Virola surinamensis</i>	26
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	MATERIAL	34
4.1.1	Equipamentos	34
4.1.2	Solventes	35
4.1.3	Vidrarias	35
4.1.4	Meios de Cultura	36
4.1.5	Antimicrobianos usados nos testes	37
4.1.6	Outros	37
4.1.7	Solução de RPMI 1640 estoque	37
4.1.8	Meio Novy-Nicolle-Mcneal (NNN)	38
4.1.9	Material biológico	38
4.1.1	Material vegetal	39
4.2	MÉTODOS	39
4.2.1	Obtenção dos extratos e fracionamentos	39
4.2.2	Avaliação da atividade antimicrobiana	41
4.2.2.1	Cultivo de microorganismos e preparação dos discos	41

4.2.2.2	Teste de difusão em Agar.....	41
4.2.2.3	Método de microdiluição e concentração inibitória mínima (CIM)	42
4.2.3	Atividade antipromastigota	43
4.2.3.1	Cultivo e Manutenção das Formas Promastigota de <i>Leishmania</i>	43
4.2.3.2	Ensaio da atividade Antipromastigota	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÃO.....	56
7	REFERÊNCIAS	57

1 – INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e os Médicos Sem Fronteiras propuseram uma classificação das doenças em: globais, isto é, aquelas que ocorrem em todo o mundo; negligenciadas são mais prevalentes nos países em desenvolvimento e mais negligenciadas, que são exclusivas dos países em desenvolvimento. Apesar dos avanços científicos e tecnológicos as doenças negligenciadas persistem, e isto pode estar relacionado a falhas como:

- Da ciência, com conhecimentos insuficientes sobre a doença e seu tratamento, muitas vezes, está associado a reações adversas severas onde microrganismo tornou-se resistente à terapêutica;

- Do mercado, onde medicamentos ou vacinas existem, mas a um custo proibitivo e por isso inacessível à população;

- Da saúde pública, pois o planejamento muitas vezes é inadequado ou inexistente, desta forma não são adquiridos os medicamentos na quantidade adequada (MOREL, 2006).

Várias doenças são consideradas negligenciadas, como por exemplo a leishmaniose. As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo consideradas grave problema de saúde pública, acometendo, aproximadamente, 350 milhões pessoas, em 88 países ao redor do mundo (WHO, 2011). Em relação ao tratamento desta protozoose, até os dias de hoje vem sendo realizado com os antimoniais pentavalentes [Sb⁵⁺] (antimoniato de N-metil glucamina-glucantime®) e o estibogluconato de sódio (pentostan®); sendo que estes possuem alto custo e geralmente requerem um longo período de administração. Estes fármacos são extremamente tóxicos, podendo causar alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas (OLLIARO e BRYCESON, 1993; CROFT e YARDLEY, 2002; GONTIJO e MELO, 2004).

Em síntese, para o tratamento medicamentoso das leishmanioses dispõe-se de reduzido arsenal terapêutico, sendo necessárias pesquisas que visem buscar novos fármacos. Neste contexto, as plantas medicinais podem

dar uma valiosa contribuição, visto que várias espécies são utilizadas para o tratamento de feridas de difícil cicatrização e/ou leishmanioses.

Atualmente, um dos principais problemas de saúde pública mundial é a crescente resistência dos microrganismos (bactérias e parasitos) aos fármacos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Associado a isto se tem o fato de, a maioria dos fármacos utilizados como antimicrobianos, terem sido descobertos a mais de 30 anos, logo a resistência bacteriana cresce em uma velocidade exponencial e a descoberta de novos fármacos cresce lentamente chegará um momento onde não haverá fármacos para o tratamento de muitas infecções (BERQUÓ et al. 2004). Assim, buscar novos fármacos com atividade antibacteriana é de extrema urgência.

Com o advento da quimioterapia para o câncer e a síndrome da imunodeficiência adquirida as infecções fungicas tornaram-se mais frequentes e com maior gravidade (SILVA et al. 2010). Atualmente, tem-se utilizados fármacos poliênicos como a nistatina e azólicas para o tratamento de doenças sistêmicas, como por exemplo candidíase (VASQUEZ et al. 1997), tem sido relatado o surgimento de resistência fungica ao cetoconazol (ZARDO et al. 2004). Em estudo realizado com pacientes HIV positivos foi observado alta frequência de resistência de leveduras, isoladas de orofaringe, aos derivados azólicos, incluindo o fluconazol (66,1% dos isolados;) SILVA et al. 1998).

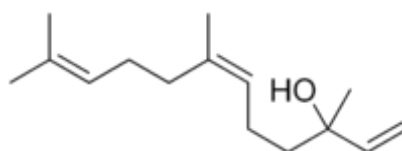
Em síntese, para os tratamentos das leishmanioses, infecções bacterianas e fungicas são necessárias pesquisas que visem à identificação de novos candidatos a fármacos. Na busca de novos fármacos várias estratégias podem ser adotadas, dentre estas a informação popular, onde diferentes espécies de plantas são utilizadas para fins medicinais.

No Brasil estima-se que 92% da população já fez uso de alguma planta medicinal (SIMÕES, 2001). O nosso país possui a maior diversidade genética vegetal do mundo com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350 e 550 mil espécies destas 10 mil podem ser medicinais, aromáticas e uteis (BARATA e QUEIROZ 1995).

Na Amazônia existe um grande número de vegetais usados com fins terapêuticos, sendo às vezes, a única fonte de remédios, principalmente em locais mais isolados e distantes. Esta cultura cabocla herdada dos indígenas em conjunto com a contribuição africana e a tradição européia, adaptada pelos colonizadores, constitui a rica farmacopéia Amazônica (BERGER, 2010). Várias espécies são utilizadas com fins medicinais, como: *Bauhinia forficata* Link (pata de vaca), *Virola surinamensis* (Rol. exRottb.) Warb., entre outras (BARATA et al. 2000).

Virola surinamensis (Rol. ex Rottb.) Warb, a ucuúba, é utilizada contra reumatismo e artrite (HOEHNE, 1939), para a cicatrização de feridas; no tratamento de cólicas e dispepsias. A resina obtida das cascas é utilizada para o tratamento de erisipelas e inflamação (SCHULTES e HOLMSTED, 1971; BERGER, 1992). Índios amazônicos da tribo Waiãpi, que vivem no oeste do estado do Amapá, inalam vapores de óleo obtidos das folhas de *Virola surinamensis* para o tratamento da malária (LOPES et al. 1999).

De *V. surinamensis* já foram isolados: lignanas, neolignanas (ROMOFF e YOSHIDA, 1997), alcalóides, flavonóides e esteróides (BORGES, 2007). Do óleo de *V. surinamensis* foram isolados vários sequiterpenos. O óleo essencial e o nerolidol (1), na concentração de 100 µg/mL, inibiram 100% do desenvolvimento de trofozoíto jovens de leishmanina (LOPES et al. 1999). O nerolidol inibiu o crescimento de promastigota de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, reduzindo em 95% a taxa de infecção dos macrófagos por *L. amazonensis*.



1- Nerolidol

O presente estudo se justifica em informações etnofarmacológicas, pois pesquisas com *Virola surinamensis*, demonstraram seu uso para o tratamento

de doenças bacterianas (SCHULTES e HOLMSTED, 1971; BERGER, 1992). Também, de espécies deste gênero foram isolados alcalóides e lignanas, sendo que vários estudos tem demonstrado o seu potencial antimicrobiano e antileishmania (ZACCHINO et al. 1997; LOPES et al.1996; MARQUES 1988; TANAKA et al. 2006). LOPES et al. (1999) demonstraram a atividade antileishmaniose de substâncias isoladas desta espécie.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Bactérias e Fungos

Doenças infecciosas são causadas por microrganismos podem ser de alta gravidade e estão envolvidas em um terço das causas de morte no mundo. Vale ressaltar ainda que podem gerar vários problemas de ordem socioeconômicas, representando um dos principais desafios para o século XXI, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008).

As bactérias são os mais simples organismos encontrados na maioria dos ambientes; e as implicadas nas infecções podem ser verdadeiramente patógenas ou patógenas oportunistas. De modo geral as bactérias são as causadoras de diversas patologias e a gravidade dos sintomas depende de diversos fatores entre eles a imunidade do hospedeiro, a virulência da bactéria causadora da doença e a resistência da bactéria aos antimicrobianos (TRABULSI et al. 1999).

As infecções bacterianas podem ser causadas por diversas espécies de bactérias do tipo Gram negativa e Gram positiva , como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre os microrganismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos com o correr dos anos, destacam se os estafilococos, as enterobactérias, a *Pseudomonas aeruginosa* e, mais recentemente, os hemófilos, gonococos, enterococos e pneumococos. A crescente resistência do *S. aureus* vem causando muita preocupação, pois cepas multidroga resistentes têm sido isoladas em infecções sistêmicas graves (HARDY et al. 2004;. TRABULSI et al. 1999), podendo ocorrer tanto em nível hospitalar quanto na comunidade (KANAFANI e FOWLER-Jr., 2006).

O *S. aureus* também traz riscos para pacientes que fazem dialise, queimados, diabéticos e HIV positivos, visto que pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas (relativamente benignas) até infecções sistêmicas (potencialmente fatais). As

infecções cutâneas incluem: foliculite simples e impetigo, assim como furúnculos e carbúnculos, que afetam o tecido subcutâneo e produzem efeitos sistêmicos, como febre (BALABAN et al. 1998; CARVALHO et al. 2005; CAVALCANTI et al. 2005).

Outro microrganismo oportunista importante no ambiente hospitalar *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo gram-negativo, que nos últimos anos tem ocupado lugar de destaque entre os patógenos hospitalares, pois é o agente de pneumonia e bacteremias associada à ventilação mecânica (ÁLVAREZ-LERMA et al. 2005), endocardite, meningite, infecções do trato urinário e de pele em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. A *P. aeruginosa* pode infectar qualquer região do corpo em um paciente susceptível, podendo causar infecções de pele em queimados, infecções oculares, em feridas, nos ossos e nas articulações, no trato urinário e mais frequentemente, infecções do trato respiratório (SADER et al. 2001; GUIMARÃES e ROCCO, 2006).

Outra bactéria responsável por diferentes tipos de infecções é a *Escherichia coli*, sendo responsável por infecções do trato urinário, na meningite e em doença diarreica entérica (NATARO e KAPER, 1998). O gênero *Escherichia coli*, pertence à família *Enterobacteriaceae* são bacilos Gram negativos móveis ou não e fazem parte da microóbiota intestinal, tornando-se patogênicas em localização extra intestinais ou mesmo intestinais. As categorias conhecidas nas infecções intestinais são: *E.coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (EaggEc).

Outro microrganismo que também pode vir a adquirir resistência são os fungos. Entre os tipos de infecções destacam-se as causadas por fungos do gênero *Candida*, em particular a *Candida albicans*, que tem emergido como importante causa de infecções nosocomiais fúngicas, estando associadas à quase 80% de todas as infecções ocorridas em ambiente hospitalar e representando a quarta maior causa de fungemia no mundo (ALMIRANTE et al. 2005). A candidíase invasiva é uma infecção severa e potencialmente letal, cuja taxa de mortalidade pode alcançar entre 40 a 60%, sendo comparável às observadas no choque séptico (BARBERINO et al. 2006). As infecções

fúngicas têm aumentado muito nos últimos anos, acometendo pessoas debilitadas que estejam passando por terapias agressivas como o tratamento da SIDA, neoplasias e transplantados.

A resistência dos microrganismos tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetivas nos últimos anos. Algumas vezes, parte da emergência de resistência está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes. Pacientes infectados por microrganismos resistentes necessitam de maior tempo de hospitalização, apresentam risco aumentado de mortalidade e utilizam antimicrobianos mais potentes, que normalmente são mais caros e/ou mais tóxicos. Esses fatores têm motivado a busca de novos fármacos cada vez mais potentes e estáveis aos mecanismos de resistência bacteriana.

2.2- Leishmaniose

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo consideradas grave problema de saúde pública, acometendo, aproximadamente, 350 de milhões pessoas, em 88 países ao redor do mundo (WHO, 2011). As síndromes clínicas causadas pela infecção por *Leishmania spp* podem abranger as formas tegumentar e mucocutânea e a leishmaniose visceral. A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum da doença, podendo evoluir desde lesões cutâneas autolimitadas (com possível cura espontânea) a lesões graves, de difícil resolução, assim como observadas nas formas mucosa, difusa e disseminada. A forma visceral da leishmaniose, também conhecida por calazar, é a mais severa da doença e sua apresentação clínica pode variar desde quadros assintomáticos a polissintomáticos, e graves, com desfecho invariavelmente fatal sem o tratamento adequado (MULLER et al. 2008; WHO 2011).

O gênero *Leishmania* foi subdividido em complexos fenotípicos agrupados em dois subgêneros: *Leishmaniae* e *Viannia*. O subgênero *Viannia* tem distribuição neotropical, causam leishmaniose cutânea e mucocutânea e compreende as espécies descritas primeiramente como do complexo

L. brasiliensis, como: *L.(V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(V.) panamensis*, e *L.(V.) peruviana* (REY, 1991). O subgênero *Leishmania* abrange espécies que causam a leishmaniose cutânea no Velho Mundo com *L. (L.) major* e *L. (L.) tropicae* dois complexos, o complexo *L. mexicana* onde se incluem as espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) pifanoie* *L. (L.) venezuelensis* e o complexo *L. donovani* cujos membros são *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L.(L.) chagasi* que causam leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente (GRIMALDI JUNIOR et al. 1989).

Esses parasitos apresentam duas formas evolutivas durante seu ciclo de vida, promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas (Figura 1A) são alongadas e da bolsa flagelar emerge um flagelo livre; no citoplasma também são observados vacúolos e o núcleo é semelhante ao da forma amastigota. O cinetoplasto é, geralmente, ovóide situado entre a extremidade da região anterior (da bolsa flagelar) e o núcleo, variando bastante sua posição (VANNIER-SANTOS et al. 2002). As formas amastigotas são tipicamente ovóides ou esféricas, podemos encontrar vacúolos em seu citoplasma, um núcleo ovóide e o cinetoplasto em forma de bastão situado próximo ao núcleo, sendo encontrado na bolsa flagelar (Figura 1B). Estas formas são parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos, entre estes, o homem (GRIMALDI JUNIOR, 1982).

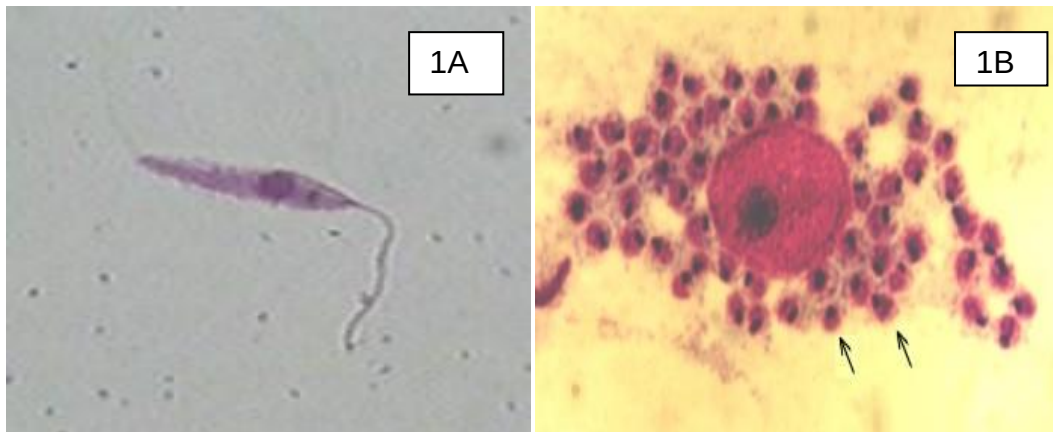


Figura 1: Micrografia da *Leishmania* sp

Legenda: 1A Promastigota, 1B amastigota.

(Fonte: [http // www.ufgs.br/para-site/Imagensatlas/protozoa / leishmania](http://www.ufgs.br/para-site/Imagensatlas/protozoa/leishmania))

A infecção causada por espécies do gênero *Leishmania* se inicia quando promastigotas metacíclicas são introduzidos na circulação do hospedeiro vertebrado pela fêmea do mosquito flebotomíneo, que durante o repasto sanguíneo regurgita estes parasitos infectivos, devido à grande quantidade presente em seu trato digestivo (ANTOINE et al. 1998). Uma vez na circulação dos mamíferos, essas formas serão fagocitadas por células fagocitárias primeiramente por neutrófilos, perdem o flagelo transformando-se em amastigotas, horas depois são fagocitadas por macrófagos, onde são internalizadas no fagossoma, que logo se funde com os lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal, onde o parasita permanece em ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais e metabólitos reativos do oxigênio, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

No entanto, a *Leishmania* está adaptada para sobreviver neste ambiente, pois é capaz de inibir diversos mecanismos de defesa celular que deveriam causar sua lise, e então consegue se multiplicar por divisão binária, até levar a ruptura da célula infectada e liberar formas amastigotas que são fagocitadas por outros macrófagos (PETERS, 2008). Vale ressaltar que, os parasitos invadem os macrófagos por receptores mediadores de endocitose, como por exemplo, via receptores de complemento, que são clivados por

proteases do parasito; eles se multiplicam em pH baixo em fagolisossomos ricos em aminoácidos e tem seu metabolismo adaptado a este microambiente (STUART et al. 2008).

Durante um novo repasto sanguíneo do vetor, estas formas amastigotas são sugadas e se transformam em promastigotas procíclicas, que se multiplicam por divisão binária no trato digestivo do flebotomíneo, sendo encontrados nas regiões de proventrículo e esôfago, onde sofrem a metaciclogênese, que consiste na transformação de promastigotas procíclicos fracamente infectivos em promastigotas metacíclicos, altamente infectivos (Figura 2; SACKS e KAMHAWI, 2001).

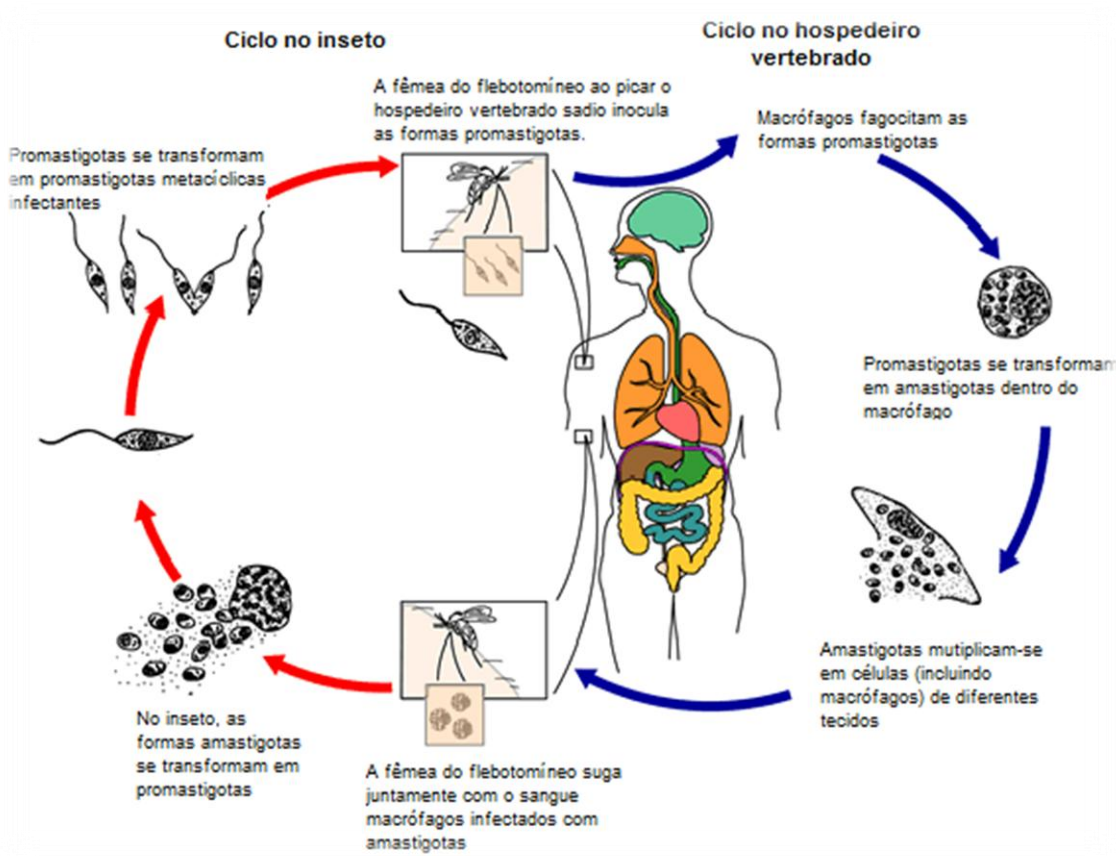


Figura 2- Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Fonte: CDC, 2012.

O tratamento convencional de ambas as formas tegumentar e visceral de leishmaniose, baseia-se principalmente no uso endovenoso ou

intramuscular de sais de antimônio pentavalente- Sb^{5+} : Antimoniato N-metil glucamina (1;Glucantime[®]) ou Antimoniato de meglumina no e Estibogluconato de sódio (2;Pentostan[®]) que não é comercializado no Brasil, mas é utilizado em países de língua inglesa, sendo medicamentos de primeira escolha, em virtude de sua comprovada eficácia terapêutica (HERWALDT, 1999; RATH et al. 2003; BRASIL, 2007).

Os antimoniais pentavalentes são administrados por via parenteral (intramuscular ou endovenosa), associado ao seu potencial hepato, cardio, nefrotóxico, aliado a outros efeitos colaterais como dores musculares, representam um sério obstáculo ao tratamento adequado dos casos, levando a redução, interrupção ou abandono da quimioterapia pelo paciente antes de seu término (DEMICHELI et al. 2005), sugerindo então a necessidade de tratamentos alternativos. Os fármacos de segunda escolha ou alternativa para o tratamento de leishmaniose são o desoxicolato sódico de anfotericina B e suas formulações, as pentamidinas (sulfato e mesilato), os imunomoduladores (interferon gama e GM-CSF). Exceto os dois primeiros fármacos, as outras estratégias terapêuticas estão ainda em fase de investigação. Todas elas só devem ser administradas em hospitais de referência (BRASIL, 2006; CAMPOS, 2008).

Os efeitos colaterais da anfotericina B são vários e freqüentes, todos, dose de penderes, sendo altamente tóxica para as células do endotélio vascular, ocasionando flebite. Ao longo da infusão poderá acontecer cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão. A infusão rápida (menos de 1 hora) é responsável pela instalação de hiperpotassemia, determinando alterações cardiovasculares, às vezes com parada cardíaca. Durante o tratamento, poderão aparecer sobrecarga hídrica e hipopotassemia (BRASIL, 2006; BERMAN, 1998). As complicações renais com o uso deste medicamento são as mais importantes – graus variados de comprometimento renal ocorrem em praticamente todos os pacientes durante o tratamento. Entretanto, as alterações renais são totalmente reversíveis, quando o fármaco é usado nas doses recomendadas (BRASIL, 2008).

Portanto, a quimioterapia das leishmanioses possui muitas limitações, tanto devido à toxidez dos antimoniais, quanto à baixa eficácia dos outros fármacos atualmente disponíveis, sendo que com exceção da Miltefosina e da anfotericina em lipossomas (Ambisome®) nenhum produto realmente novo, surgiu no mercado nos últimos 20 anos para tratar a doença (MELO, 2009). Neste cenário, estudos que visam buscar novos fármacos são extremamente importantes. Na busca destes novos fármacos, pesquisas aliadas ao conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais podem dar valiosa contribuição, dentre estas espécies têm-se o gênero *Virola*.

2.3 - *Virola surinamensis*

A família Myristicaceae é constituída por 18 gêneros e cerca de 500 espécies tem distribuição pantropical. No Brasil esta família é representada pelos gêneros *Compsonura*, *Iryanthera*, *Osteopholeum*, *Otoba* (*Sin. Diallyanthera*) e *Virola*, sendo encontradas na região Amazônica, onde espécies pertencentes a esta família são conhecidas como ucuúbas (SOUZA e LORENZI, 2005).

A família, pertence a classe das angiospermas e suas espécies têm árvores que podem alcançar 25- 35m de altura e 60-100 cm de diâmetro, râmulos com pilosidades ferrugínea, folhas alternas e dísticas, simples e sem estípulas, as inflorescências são panículas axilares ou subaxilares; a casca lisa e fina apresenta pequenas fissuras verticais e coloração pardo acinzentada. As flores masculinas têm 2-20 estames unidos; flores femininas têm um único ovário com um óvulo (semente potencial). Uma cobertura carnuda, conhecido como um arilo, rodeia a semente de pregas, que tem muito endosperma (tecido nutritivo em amido para o desenvolvimento do embrião). As folhas simples têm margens lisas e estão dispostas alternadamente ao longo do tronco (RODRIGUES, 1980).

Dentre os gêneros pertencentes a esta família destaca-se o *Virola*, que no Brasil possui as seguintes espécies: *Virola calophylla* var. *calophylloidea* (Mgf.) W. Rodr. , *Virola duckei* A. C. Smith. , *Virola elongata* (Benth.) Warb., *Virola mollissima* (Poepp. ex A. DC.) Warb., *Virola multinervia* Ducke, *Virola*

pavonis (A. DC.) A. C. Smith., *Virola polyneura* W. Rodr., *Virola rugulosa* (Spruce) Warb., *Virola sebifera* Aubl., *Virola venosa* (Benth.) Warb. *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb.

V. surinamensis é uma árvore de cerca de 20m, podendo alcançar 30 metros; e 60–100 cm de diâmetro, ramificação quase horizontal e a ponta dos ramos jovens são cobertas por densa pilosidade ferrugínea (tricomos dendríticos). A casca lisa e fina apresenta pequenas fissuras verticais e coloração pardo-acinzentada, liberando, por incisão, um líquido incolor. As folhas são alternas, dísticas, curto-pecioladas e simples e a lâmina possui formato oblongo-lanceolado, consistência coriácea, 10-25 cm de comprimento e 2-5 cm de largura; as inflorescências são panículas axilares ou subaxilares; a base é arredondada, cordada ou truncada; o ápice é cuspidado, acuminado ou agudo; as margens são inteiras e revolutas; as nervuras são planas ou levemente imersas na face superior e salientes na inferior; a face inferior é pálido-puberulenta, pecíolos canaliculados. As plantas são dióicas. As inflorescências são paniculadas axilares ou subaxilares, as inflorescências femininas possuem coloração amarelo pálida. O fruto é em forma de elipse, com 14 a 16 mm de comprimento e 11-20 mm de largura; curto, com frutificação de fevereiro a julho, o formato é subgloboso, globoso, ovóide ou elipsóide. As sementes possuem arilo vermelho, fendido quase até a base; medem cerca de 15 mm de comprimento, 10 mm de diâmetro e pesam em torno de 1,4g; o formato é globoso a elipsóide; a testa lisa e fina apresenta coloração castanho-escura; o endosperma de coloração cinzento-marmorizada é ruminado e oleaginoso, apresenta elevado teor de triglicerídeos e ácidos graxos, especialmente ácido mirístico, daí a denominação popular de ucuúba, que significa árvore produtora de gordura (Figura 3) (RODRIGUES, 1980).

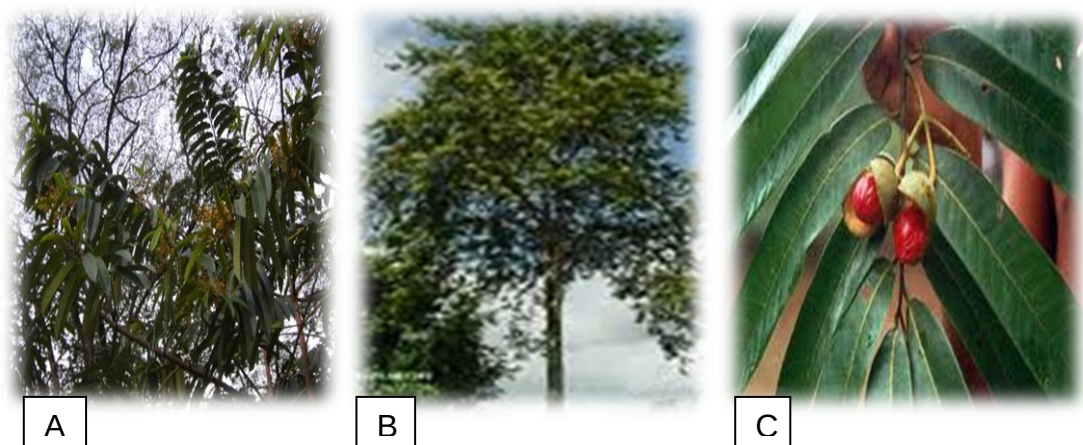


Figura 3 - *Virola surinamensis*

Fonte: paisagismodigital.com

Legenda: A- Folhas, B- árvore e C-frutos

Em síntese, a classificação taxonômica da *V. surinamensis* é a seguinte:

Classe: Angiosperma

Família: Myristicaceae

Gênero: *Virola*

Espécie: *Virola surinamensis*

Sinonímias: *Myristica surinamensis* Rol. ex Rottb

Palala surinamensis Rol. ex Rottb (RODRIGUES, 1980).

Virola surinamensis, conhecida como ucuúba da várzea, 'ucuúba branca', 'ucuúba verdadeira', 'ucuúba amarela', 'árvore de sebo', 'bicuíba' e 'virola' (Brasil); 'cumala' e 'caupuri' (Colômbia e Peru; RODRIGUES, 1980; LORENZI, 1992), é uma espécie considerada tipicamente amazônica e seu habitat são as várzeas e os igapós (LEITE e LLERAS, 1993). Ocorre na América Central e América do Sul. No Brasil concentra-se na Bacia Amazônica, atingindo todo o Estado do Amazonas, Pará, parte do Maranhão, Ceará e Goiás, predominando em locais alagados, nas margens dos rios, igarapés, furos e várzeas que são áreas atingidas pelas cheias (RODRIGUES, 1980; 1989; MAINIERI e CHIMELO, 1989).

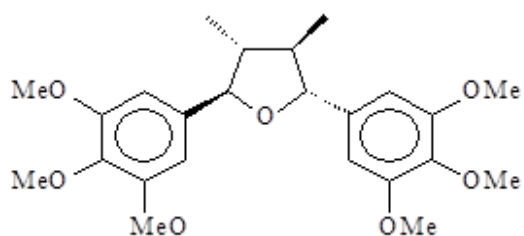
O “sebo ucuuba”, extraído das sementes, foi muito utilizado pela indústria para produção de sabão. O óleo extraído das sementes (sebo de ucuúba), rico em trimiristina e de odor agradável, pode ser usado na fabricação de velas, sabões, cosméticos e perfumes, o elevado conteúdo de óleo das sementes (60-73%) deu origem ao nome “ucuúba” que significa árvore que produz substância gordurosa (RODRIGUES, 1980). A árvore fornece abundante quantidade de frutos para aves e outros animais silvestres, portanto é útil na recomposição de áreas degradadas e de preservação.

O interesse por esta espécie ocorreu quando Schultes e Holmsted (1971) descreveram o uso da *Virola* por índios no preparo de “rapé” alucinógeno obtido da resina da casca da planta, bem como veneno em flechas de caça. O efeito alucinógeno atribuído a essas preparações é consequência da presença de alcalóides indólicos triptaminérgicos (AGURREL et al. 1969; LOPES et al. 1983).

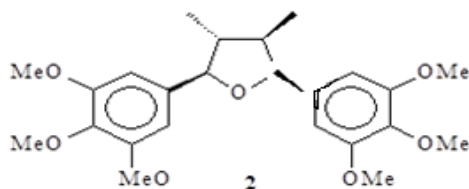
Na medicina popular é utilizada como cicatrizante em infecções dermatológicas; o chá das folhas é utilizado nas cólicas e dispepsias. A resina da casca é utilizada para o tratamento de erisipelas e outros processos inflamatórios (SCHULTES e HOLMSTED, 1971; BERGER, 1992). A infusão das folhas é usada internamente contra inflamações e febres. O látex é usado externamente misturado com água e na forma de banho no local para tratar doenças venéreas. A decocção das folhas é útil contra problemas do fígado (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). No Estado do Tocantins existem relatos da utilização da seiva da *V. surinamensis*, para o tratamento de câncer, inflamações, infecções, gastrites e úlceras (PAIXÃO e HIRUMA-LIMA, 2000). A casca é usada como medicamento para aftas, hemorróidas e contra úlceras (CORRÊA, 1984).

Diversos grupos de substâncias como ácidos graxos, alcalóides, flavonóides, lignóides, policetídeos, taninos e terpenos foram isolados e identificados principalmente das sementes, folhas e cascas de espécies de *Virola* (COROTHIE e NAKANO, 1969; LOPES et al. 1984; BLUMENTHAL et al. 1997; MARTINEZ et al. 1999; BARATA et al. 2000; REZENDE e KATO, 2002). Dentre estas substâncias destacam-se as seguintes neolignananas: Grandisina

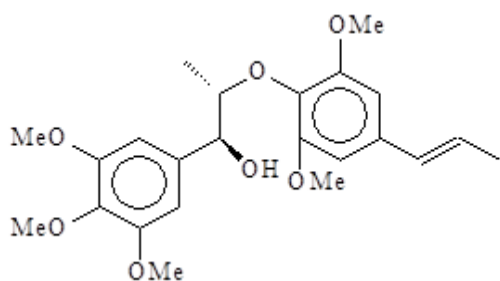
(2); Epigrandisina (3); Polisiforina (4); Virolina (5); Surinamensina (6) e Veranguesina (7).



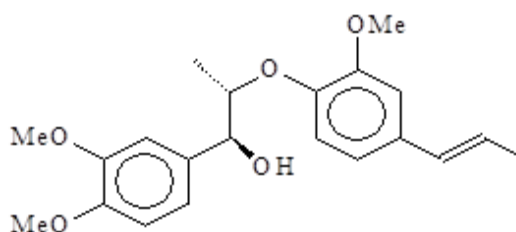
Grandisina (2)



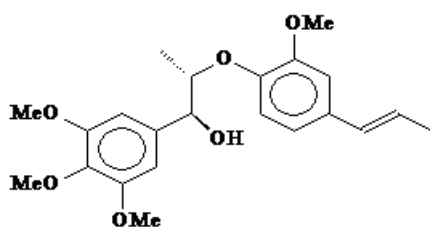
Epigrandisina (3)



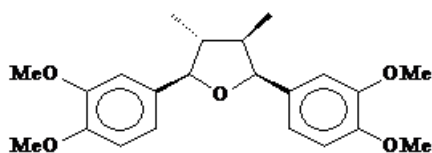
Polisiforina (4)



Virolina (5)



Surinamensina (6)



Veranguesina (7)

Neolignanas tetraidrofurânicas grandisina (2) e epigrandisina (3), bem como a neolignana do tipo 8.O.4' polisiforina (4) apresentam atividades antiplasmódicas frente ao *Plasmodium falciparum*. A polisiforina foi a mais ativa apresentando potente atividade com $CI_{50} = 400$ ng/mL (ZHANG et al. 2001). De *Virola surinamensis* foram isoladas neolignanas do tipo 8.O.4' como a (+)-virolina (5) e a (+)-surinamensina (6), e neolignanas do tipo tetraidrofurânica

como a grandisina (2) e a veranguesina (; BARATA et al. 1978; SANTOS et al. 1996; BORGES et al., 2007).

Dentre as classes de substâncias isoladas, destaca-se os alcalóides triptamínicos e β -carbolínicos (SCHULTES; HOLMSTEDT, 1971), que são responsáveis pelo o princípio ativo dos rapés utilizados pelos índios da Amazônia (BARATA, 1976).

Em outras espécies de *Virola* já foram isoladas lignanas e neolignanas, como: *V. sebifera* (VON ROTZ et al. 1989; MARTINEZ et al. 1987a), *V. cf. pavonis* (MARTINEZ et al. 1997), *V. pavonis* (MARQUES et al. 1992; FERRI e BARATA, 1991 e 1992), *V. surinamensis* (LOPES et al. 1996), *V. michelli* (SANTOS et al. 1996), *V. elongata* (KATO et al. 1986 e 1990), *V. calophylla* (MARTINEZ et al. 1990; ALVAREZ et al. 1987), *V. calophylloidea* (VON ROTZ et al. 1990), *V. venosa* (KATO et al. 1992), *V. foschnyi* (LEMUS e CASTRO, 1989) e *V. oleifera* (FERNANDES et al. 1993 e 1994). Além das lignanas, existem relatos da presença de flavonóides nas espécies *V. calophylloidea* (MARTINEZ, 1987^b), *V. michelli* (SANTOS et al., 1996) e polifenóis nas espécies *V. calophylla*, *V. carinata* e *V. flexuosa* (AGUIRRE, 1990). Isoflavonas foram isoladas de *Virola caducifolia* (BRAZ FILHO et al., 1976; BRAZ FILHO et al., 1977), e neolignanas tetraidrofurânicas de *Virola carinata*.(GOTTLIEB, MAIA, RIBEIRO, 1976; GOTTLIEB, MAIA, SOUZA, 1973).

Aos alcalóides têm sido atribuídas várias atividades farmacológicas como: antileishmania (FERREIRA et al., 2004), contração intensa dos músculos uterinos hipotensor (SCHRIPSEMA et al., 2004) e antiplasmódica (MITAINE-OFFER et al., 2002; DOLABELA, 2007; OLIVEIRA et al., 2007), antibacteriana (MARQUES, 1988; TANAKA et al., 2007). Estudo da atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica, obtidos das folhas de *Virola sebifera*, indicou que o extrato diclorometânico (EBD) foi ativo, com seletividade principalmente para a linhagem de pulmão (NCI-460) - CI_{50} de 46 μ g/mL. A atividade notada provavelmente pode ser atribuída a alcalóides ou compostos nitrogenados que foram evidenciados pelo corante Dragendorff (DENNY et al., 2007).

Do óleo de *V. surinamensis* foram isolados vários sequiterpenos, como nerolidol, que inibiu em 100% o *P. falciparum* na concentração de 100 µg/mL (LOPES et al., 1999). A atividade de nerolidol foi avaliada contra espécies de Leishmania, sendo observado efeito inibitório do crescimento de promastigota de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* com concentração inibitória 50% de 85, 74, 75 e 67 mM, respectivamente. O tratamento de macrófagos infectados por *L. amazonensis* com nerolidol 100 mM resultou em 95% de redução nas taxas de infecção (EL-KATTAN et al., 2001; YAMANE et al., 1995).

As neolignanas do tipo 8.O.4' virolina e surinamensina mostraram atividade contra a penetração de cercárias do *Schistosoma mansoni* (BARATA, 2000). Às neolignanas veraguensina e grandisina, são atribuídas ação anti-chagásica (LOPES et al., 1998).

A atividade antifúngica das espécies *V. sebifera*, *V. pavonis*, *V. surinamensis*, *V. carinata* e *V. koschnyi* foi atribuída à presença de lignanas na composição de diferentes partes da planta (PAGNOCCA et al., 1996; LEMUS e CASTRO, 1989).

3-OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar as atividades antimicrobiana e antipromastigota de extratos de *V. surinamensis* e suas frações.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antipromastigota de extratos frente a diferentes espécies de *Leishmania*
- Avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica de extratos e frações de *V. surinamensis*

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1- EQUIPAMENTOS

Escala Mac- Farland BIOMÉRIEUX

Leitor de microplaca- TP READER ELISA

Aagitador com plataforma, New Brunswick Scientific, Modelo Innova 2100;

Autoclave Vertical (Phoenix);

Balança analítica modelo BK 600 (Gehaka);

Balança Analítica Mettler Toledo, modelo AB204;

Balança analítica Modelo AG 200 (Gehaka);

Balança semi-analítica (Núcleo);

Balanças Analíticas Bio Precisa

Banho Maria (Fanem)

Bico de Bunsen

Bomba de vácuo (Marconi);

Câmara de fluxo laminar (Veco);

Câmara de ultravioleta de 254 e 365nm (Warning);

Capela de exaustão (Quimis);

Capela de fluxo laminar (Marca VECO)

Centrífuga (FANEM)

Chapa de aquecimento (Quimis);

Cromatógrafo com sistema para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Shimadzu, em escala preparativa, bombas modelo LC-8A, detector de UV-VIS,

modelo SPD-6^a e integrador CR-4;

Densitômetro (Densimat);

Dessecador de vidros;

Dessecadores de vidros;

Destilador de água; QUIMIS

Estufa bacteriológica (Fanem);

Escala Mac- Farland BIOMÉRIEUX

Estufa MD 1.2 (Medicate);

Evaporador rotativo (Fisoton);

Evaporador rotatório, Büchi, modelo B 480;
Geladeira (Cônsul);
Leitor de microplacas (ThermoPlat);
Leitor de microplaca- TP READER ELISA;
Microcentrífuga modelo 14000 D (Cientec);
Micropipetas Automáticas de 10- 200 µL Marca Discovery
Paquímetro MITUTOYO
Sistema de filtração de água Millipore (Milli-Q Plus);

4.1.2. Solventes

Acetato de etila P.A; (SYNTH, NUCLEAR, VETEC)
Acetona P.A; (SYNTH, NUCLEAR, VETEC)
Clorofórmio; (SYNTH, NUCLEAR, VETEC)
Diclorometano P.A. (SYNTH, NUCLEAR, VETEC)
DMSO Aldrich chemistry Lote V220008-358
Etanol grau 96° GL (Quimex);
Hexano P.A; (SYNTH, NUCLEAR, VETEC)
Metanol P.A; (SYNTH, NUCLEAR, VETEC)

4.1.3 - Vidrarias

Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000mL;
Cubas de vidro Pyrex;
Erlenmeyer de 50, 100, 250 e 500mL;
Espátulas de metal;
Frascos Eppendorf;
Funis de separação de 250mL e 2000mL;
Papel de filtro MN 618;
Pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL;
Pipetas de Pasteur de vidro (VWR);
Pipetas volumétricas de 10 e 20mL;
Placas com 96 poços de fundo chato;
Placas de Petri 90x15 mm (PROLAB);
Ponteiras de 10 a 1000µl e de 20 a 200µL;

Provetas 5, 20, 50, 100, 500 e 1000mL;

4.1.4 - Meios de Cultura e Preparo dos meios

Ágar Base Cetrimida (HIMEDIA);

Ágar Manitol (HIMEDIA);

Ágar McConckey (HIMEDIA);

Ágar Müller Hinton (HIMEDIA e DIFCO);

Ágar Saboreaud Dextrose (HIMEDIA);

Caldo Müller Hinton (HIMEDIA);

Citrato fosfato dextrose adenosina – CPDA;

MTT-brometo e 3-4,5-dimetiltiazol-2-ila-2,5-difeniltetrazolium (ALDRICH);

Nistatina (NEOQUÍMICA);

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) sem NaHCO_3 e com L-glutamina.

Todos os meios utilizados nos ensaios antimicrobianos foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes. O ágar foi suspenso em 1000 mL de água destilada, em seguida o meio foi fervido até sua total dissolução, sendo efetuado a autoclavação (121°C/15min.). O meio estéril foi distribuído em placas de Petri 15x90 mm (20mL /placa), sendo obtido uma camada de 4 mm de espessura. Após a solidificação o meio foi exposto à luz Ultravioleta (UV) por 15 min. Posteriormente armazenado em geladeira à temperatura de 4°C. A quantidade utilizada de cada meio de cultura, está descrita no Quadro 1.

Quadro 1 - Ágar utilizado nos diferentes meios.

Meios de Cultura	Quantidade utilizada (g)
Ágar Sabouraud Dextrose (HIMÉDIA, Ref M 063)	
Ágar Base Cetrimida (HIMÉDIA Agar Base, Ref M 024)	
Ágar Müller Hinton (HIMÉDIA, Ref. 391)	
ÁgarMacConkey (HIMÉDIA)	
Ágar Manitol (HIMÉDIA, Ref M 118)	

No preparo do caldo foi utilizado 21g de caldo Müller Hinton (Himédia, Ref. 225250) suspenso em 1000 mL de água destilada, em seguida foi fervido até sua total dissolução e posteriormente foram distribuídos 2mL do meio em tubos de ensaios (13x100) e autoclavado a 121°C por 15min. O armazenamento foi em geladeira à temperatura de 4°C.

4.1.5- Antimicrobianos usados nos testes

Gentamicina LABOR CLIN 50 Discos

Nistatina (NEOQUÍMICA);

Gentamicina 80mg (SHERING PLOUGH);

Cloranfenicol LABOR CLIN 50 discos

4.1.6- Outros

Placas de microdiluição contendo 96 poços

Ependorfs

Vidrarias (Becker, Provetas, Pipetas de vidro graduadas, Placas de Petri).

4.1.7- Solução de RPMI 1640 estoque

A solução estoque foi preparada com cerca de 800 mL de água para injeção e 10,4g de RPMI em constante agitação. Em seguida, adicionou-se 5,98g do tampão HEPES, 2g de D-glicose (dextrose), 2g de bicarbonato de sódio, 50 mg de hipoxantina, 40 mg de gentamicina (ampola), 300 mg de glutamina e completou-se com água até 1 litro. Logo após, ajustou-se o pH para 7 e filtrou-se com membrana de 0,22 ou 0,44µm e estocou-se em geladeira (4°C).

4.1.8 - Meio Novy-Nicolle-Mcneal (NNN).

No preparo deste meio, para um total de 50 tubos, foram dissolvidos 8 g de Agar base para Agar sangue em 200 mL de água destilada. Em seguida, o meio foi submetido a aquecimento em micro-ondas até sua total dissolução, posteriormente o meio foi autoclavado à temperatura de 125° C por 15 minutos e em seguida mantido em banho Maria a 56° C por duas horas. O sangue de coelho desfibrinado (25 mL) foi separado do coágulo e em seguida adicionado ao Agar estéril, juntamente com 0,25 mL de gentamicina. O meio foi homogeneizado e um volume de 4 mL foi distribuído em tubos de 15 mL. Posteriormente, os tubos foram inclinados sobre um suporte de um centímetro de altura e após a solidificação mantidos à temperatura ambiente para a formação do líquido de retração. No dia seguinte, 10% dos tubos serão incubados em estufa bacteriológica a 35° C para controle de qualidade da esterilidade.

4.1.9- Material biológico

Para os testes da atividade antifúngica e antibacteriana foram utilizadas cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*), recomendadas para testes com antimicrobianos provenientes da FIOCRUZ e cedidas pelo Laboratório Central do Pará (LACEN/PA). Os microorganismos são: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Os parasitos utilizados no presente estudo foram formas promastigotas de *L. (L.) infatum chagasi* e *L. (L.) amazonensis* (Quadro 2), sendo a primeira isolada de cão e a última de humano, todas procedentes de municípios do Estado do Pará e cedidas pelo Dr. Fernando Tobias do laboratório de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas da cidade de Ananindeua-PA, oriundas de culturas de cepas mantidas crio-preservadas no laboratório de Leishmaniose do referido Instituto.

Quadro 2- Designação das cepas de *Leishmania* utilizadas:

Registro	Espécie	Origem geográfica
MHOM/BR/2009/M26361	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Ulianópolis -PA
MCAN/BR/2011/M27289	<i>Leishmania (L.) infatum chagasi</i>	Barcarena-PA

4.1.10 - Material vegetal

As folhas da planta *Virola surinamensis* foram coletadas na reserva da EMBRAPA em Belém-PA, identificadas por botânicos da instituição, onde uma exsicata de nº 180980 encontra-se catalogada no Herbário Embrapa.

4.2- MÉTODOS

4.2.1 - Obtenção dos extratos e fracionamentos.

O estudo fitoquímico realizado para obtenção de extratos e frações e substâncias isoladas utilizadas neste trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Pesquisa pelo bolsista de Iniciação Científica Cleber Santos de Souza e pela bolsista de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Química Luely Oliveira.

As folhas foram secas em estufa a temperatura de 40 °C por um período de dois dias e depois de secas foram trituradas em moinho de facas, resultando em 6,2kg. Folhas secas e moídas de *V. surinamensis* (4,0 kg) foram extraídas à temperatura ambiente por percolação seqüencial com hexano (8L), acetato de etila (6L) e metanol (5L) durante sete dias para cada solvente . Após filtração e evaporação dos solventes foram obtidos 61,7 g de extrato hexânico (EH), 120,8g de extrato acetato de etila (EAE) e 244,3 g de extrato metanólico (EM). A figura 4 demonstra o fluxograma da obtenção dos extratos.

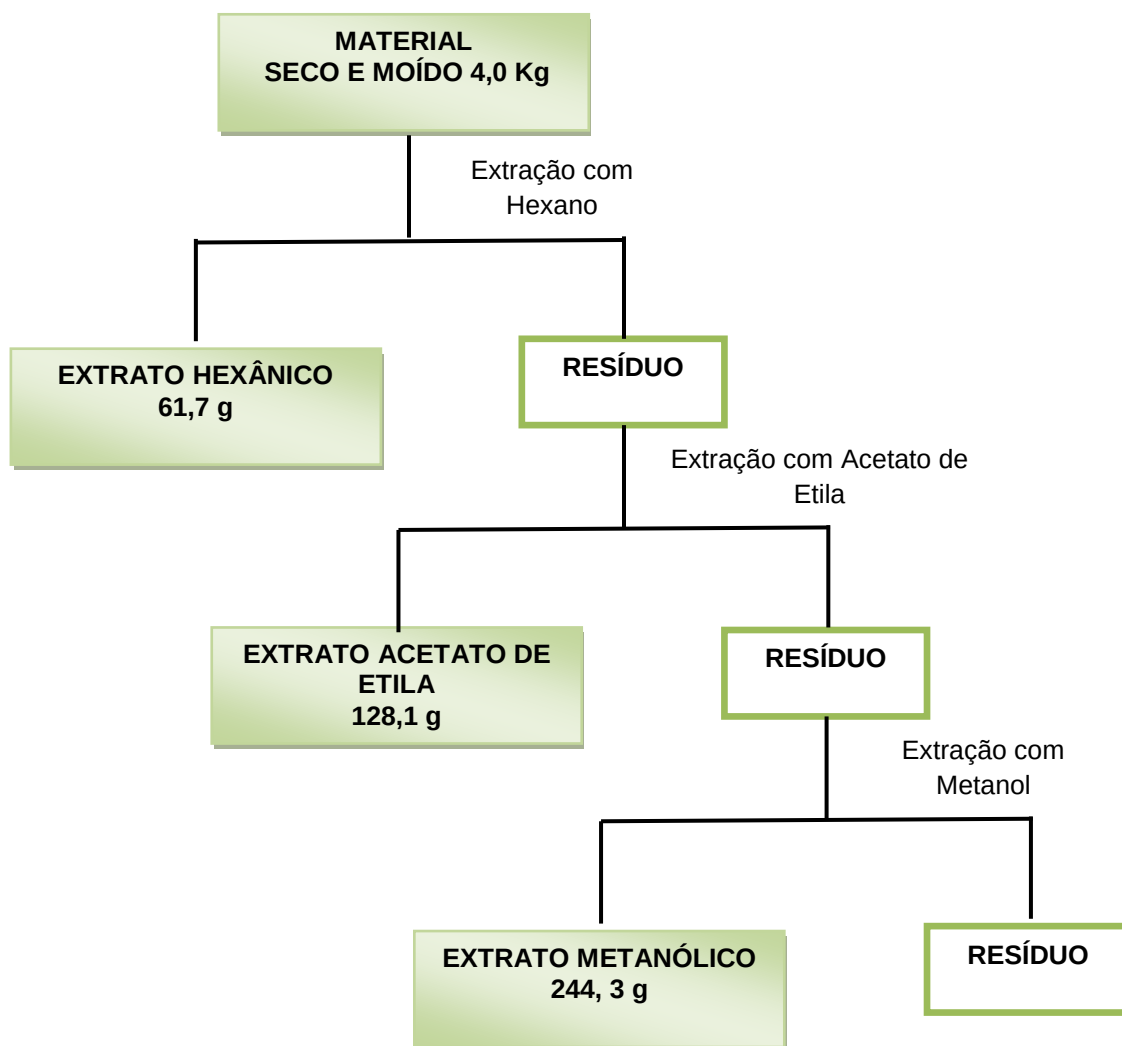


Figura 4 – Fluxograma da obtenção dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico *V. surinamensis*

O extrato acetato de etila, foi escolhido por apresentar através do perfil cromatográfico e RMN¹H, substâncias de interesse para as análises biológicas. Este foi fracionado por cromatografia de coluna (CC), sendo utilizados sistemas de solventes de polaridades crescentes: (hexano, acetato de etila e metanol) e coletadas **191 frações** as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e as frações com perfil cromatográfico semelhantes foram reunidas originando 30 subfrações. A subfração 07 (200 mg) foi denominada **FA4**, a subfração 09 (15 mg) foi chamada de fração **FA3** e as subfrações 15-18 (531 mg) foi denominada de fração **FA2**. A subfração 01

ao secar resultou em 37 mg de um sólido branco denominada fração **FA1**, solúvel em Acetato de Etila.

4.2. 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana

4.2.2.1- Cultivo de microrganismos e preparação dos discos

As cepas ATCC foram semeadas em meios de cultura específicos para cada microrganismo; sendo o Agar Sabouraud para *Candida albicans*, Agar Cetrimida para *Pseudomonas aeruginosa*, Agar McConkey para *Escherichia coli*, e Agar Manitol para *Staphylococcus aureus*. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h no caso das bactérias por 48 horas no caso do fungo, para então serem utilizados nos experimentos.

4.2.2.2 - Teste de difusão em Agar

Os inóculos dos microrganismos utilizados foram preparados retirando-se de 3 a 4 colônias da cepa após cultivo de 24 ou 48 horas se bactéria ou fungo respectivamente horas em Agar Müller Hinton e diluídos em solução salina a 0,85% até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland correspondendo aproximadamente a 1×10^8 UFC/mL de cada microrganismo (BAUER et al. 1966).

As amostras foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 500µg/ 10 mL. A suspensão de microrganismo foi semeada em triplicata, com auxílio de um *swab* descartável, em toda a superfície do meio Agar Müller Hinton. Em seguida foram adicionados discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro (Whatman - tipo 3), impregnados com 10µL dos extratos à concentração de 500µg/disco (BAUER et al. 1966), contendo os extratos (hexânico, acetato de etila e metanólico) e as frações (**FA1, FA2, FA3 e FA4**) provenientes do extrato de acetato de etila todos obtidos das folhas de *V.surinamensis*. Para o controle negativo, foram preparados discos contendo apenas 10µL de DMSO e para os controles positivos foram preparados discos contendo nistatina (120µg/disco) a partir de uma suspensão contendo 100.000 UI de nistatina/mL. O controle positivo para cepas de *E. coli* e *S. aureus* foi

o cloranfenicol na concentração de 30µg e para *P. aeruginosa* foi gentamicina na concentração de 10µg os quais foram adquiridos comercialmente.

Na leitura dos controles foi verificado se havia presença de halo de inibição nos discos do controle positivo e ausência de halo de inibição nos discos controle negativo para considerar o ensaio válido, sendo que será considerado que o extrato ativo quando foi observado halo de inibição (MOTHANA et al. 2005). Após a incubação das placas a 35 °C por 24 horas para bactérias e 25°C por 48 horas para fungo, foi realizada a leitura com auxílio de paquímetro.

4.2.2.3 - Método de microdiluição e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A fração FA3 obtida do extrato de acetato de etila se apresentou ativa frente à cepa de *S. aureus*, sendo submetida ao teste de microdiluição para a determinação da CIM (ELOFF, 1998), utilizando-se as seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL por poço. Foi preparada uma suspensão da cepa em solução salina 0,85%, ajustando-se a turbidez com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland.

Em placas de cultivo estéreis com 96 cavidades foram depositados 180µL de caldo Müller Hinton, adicionando-se uma alíquota de 10µL da amostra nas suas respectivas diluições e 10µL da suspensão bacteriana, perfazendo um quantitativo de 200µL em cada poço. Como controle positivo para os ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM), foi utilizado cloranfenicol. Como controle negativo foram utilizados 10µL da suspensão bacteriana e 190µL de caldo Müller Hinton e 10µL da suspensão bacteriana + 10µL de DMSO e 190µL de caldo Müller Hinton.

Após o semeio, as placas foram cobertas com parafilme e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Depois do período de incubação, foi acrescentado a placa de teste de CIM, 10µL de uma solução de MTT (5 mg/mL) e a placa foi novamente incubada por 3 horas. O MTT é um sal de tetrazolio, cuja coloração inicial é amarela, no entanto em células viáveis esse

sal e reduzido a formazan, que apresenta coloração azul (TAVEIRA, 2007). A leitura da placa do teste de CIM foi feita visual. Foi considerada como CIM, a menor concentração do extrato e frações capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para a avaliação do potencial antimicrobiano de um extrato vegetal no CIM, foram adotados os seguintes parâmetro: extrato vegetal com alto potencial antimicrobiano deve apresentar uma concentração inibitória mínima (CIM) < 100 µg/mL; quando a CIM está entre 100 a 500µg/mL este potencial é considerado bom; a CIM entre 500 a 1000 µg/mL este potencial é considerado fraco e o extrato inativo possui uma CIM> 1000 µg/mL (HOLETZ *et al.*, 2002).

4.2.3 - Atividade Antipromastigota

4.2.3.1- Cultivo e Manutenção das Formas Promastigotas de *Leishmania*.

As formas promastigotas das espécies *L.(L.) infatum chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, foram primeiramente cultivadas em meio NNN e posteriormente transferidas para o meio de crescimento RPMI, sendo mantidas através de passagens semanais como será descrito. Foram transferidos 100 µL de suspensão de formas promastigotas do meio NNN para garrafas de cultura de células de 25 cm², cada uma contendo 5mL de meio RPMI completo, sendo que antes da transferência da suspensão realizou-se aferição do pH que deve está em torno de 7.2, caso não estivesse procedemos o ajuste do pH do meio de cultura. A seguir, observou-se o cultivo em microscópio invertido para verificar a viabilidade das formas em meio RPMI. O cultivo do parasita em meio RPMI completo foi feito a 25°C ± 1°C, em estufa BOD. Nas passagens posteriores partiu-se da suspensão de promastigotas em meio RPMI, realizando-se uma diluição 1:1 (suspensão de promastigotas: meio RPMI completo), mantendo-se o cultivo na mesma condição de temperatura citada anteriormente.

4.2.3.2 Ensaio da Atividade Antipromastigota

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonenses* e *L.(L.) infantum chagasi* na fase logarítmica de crescimento, foram reunidas por centrifugação em meio RPMI completo 3500rpm por 10 minutos. O “pellet” foi ressuspensionado em meio

RPMI completo, as promastigotas quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração correspondente a 5×10^7 parasitos por poço, e distribuição em placas de cultura de células com fundo chato contendo 96 cavidades. Esta concentração de promastigotas foi adicionada nos poços de uma placa contendo os extratos vegetais, frações nas seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3, 25 µg/mL. Em seguida as placas foram incubadas (26° C/24 h). O controle negativo consistiu de uma suspensão do parasito e meio de cultura, controle do solvente (MEOH evaporado + suspensão do parasito + meio) e o controle positivo consistiu de uma suspensão de promastigotas adicionada de Anfotericina B (25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,3906 µg/mL) e outra suspensão adicionada de Glucantime® nas concentrações: 300; 150; 75; 37,5; 18,75; 9,375 e 4,6875 µg/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 5. Desenho esquemático das placas de 96 poços de fundo chato e da distribuição das substâncias testadas que estão representadas por cores

Legenda:  Controle negativo  Controle do solvente  Branco  Controle positivo
 Extratos  

Após o período de incubação de promastigotas com as drogas foram adicionados 10µl de MTT (5 mg/mL) em cada poço, a placa foi recoberta com papel alumínio, sucedendo-se nova incubação por 4h em estufa a 26°C para que o MTT fosse metabolizado e consequentemente fossem formados os cristais de formazam. Após 4h, foi adicionado 10µl de dimetilsulfóxido (DMSO),

para solubilizar os cristais de formazan gerados, através de agitação manual por 5 min. Em seguida, realizou-se a leitura da densidade óptica (D.O.) das amostras em leitor de placas de ELISA sob comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada. A porcentagem de células viáveis (promastigotas) será calculada pela seguinte formula, adaptada de Ngure et al.(2009):

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{abs. dos poços com amostra} - \text{abs. dos reagentes (branco)}}{\text{abs. dos poços sem amostra} - \text{Abs absorbância dos reagentes (branco)}} \times 100$$

A Concentração Inibitória 50% ou CI_{50} é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis) e foi determinada pelo programa GraphPad prism versão 5.04.

Para determinação da CIM foi realizada leitura visual e para CI_{50} leitura em leitor de placas de ELISA, na interpretação dos resultados adotaram-se os seguintes critérios (Quadro 3):

Quadro 3 : Interpretação dos resultados para atividade antipromastigota

CIM / CI_{50} µg/mL	Resultados
Menor ou igual a 100	Ativo
Entre 101- 200	Moderadamente ativo
Acima de 200	Inativo

Fonte: Mota 2010

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, o pó da planta foi extraído, sucessivamente, com hexano, acetato de etila e metanol, sendo obtidos três extratos (extrato hexânico- 1,5%, acetato de etila- 3,0% e metanólico- 6,1%). O extrato acetato etila obtido das folhas foi submetido ao fracionamento em coluna e após análise por CCD e RMN ^1H indicou possuir a substância surinamensina e a premissa inicial deste trabalho é que esta substância ou frações ricas nela possuam atividade antimicrobiana (ZACCHINO et al., 1997) e antipromastigota.

As lignanas e neolignanas correspondem cerca de 50% dos constituintes químicos isolados da família Myristicaceae (MORAIS, 2008; LOPES et al., 2004), estas possuem importantes propriedades biológicas destas, tais como: as atividades antifúngicas (ZACCHINO et al., 1997), anti-psorítica e antimalárica (LOPES et al., 1999). A atividade leishmanicida nas espécies *V. oleifera*, *V. surinamensis*, *V. donovani* e *V. pavonis* foi atribuída à presença de neolignanas (FERNANDES et al., 1993).

As análises preliminares por RMN de ^1H dos extratos e frações mostraram que o extrato hexano possui de hidrocarbonetos e ésteres de cadeia longa, glicerídeos, misturas de esteróides e arilpropanóides. No extrato acetato de etila foi detectada a presença de neolignanas. No extrato metanólico foi observado presença de flavonoides e neolignanas. Como a premissa inicial do trabalho foi que as neolignanas apresentam atividades antimicrobiana e antileishmania, fracionou-se apenas o extrato positivo para neolignana (extrato acetato de etila).

A fração **FA1** encontra-se ainda em fase de identificação. Na fração **FA2** do extrato acetato de etila foi detectada a presença de neolignanas do tipo 8.O.4', provavelmente a surinamensina. Neolignanas do tipo tetraidrofuranicas foram detectadas na fração **FA3** do extrato acetato de etila. A fração acetato de etila (**FA4**) ainda está em fase de análises químicas para identificação dos constituintes majoritários.

As lignanas são produtos da transformação da lignina em compostos fenólicos, que são metabolizados no intestino humano pelas bactérias

intestinais, formando o enterodiol e a enterolactona (estruturas semelhantes aos estrógenos). Estes compostos, por sua vez possuem ação antiestrogênica e ao mesmo tempo fraca ação estrogênica, sendo muito semelhante às isoflavonas da soja. Também possui propriedade biológica significativa como: ação antimitótica, antifúngica, antioxidante e anticarcinógeno. É um potente inibidor de atividade plaquetária e mediador das reações inflamatórias (THOMPSON et al. 1996^{a,b}; BENNET, 1994; BRZEZINSKI e DEBI, 1999).

Outros metabolitos secundários presentes neste gênero também apresentaram várias atividade biológicas, dentre estes se destacam os flavonoides e tocotrienóides (DAVINO et al., 1998; SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2007). Os flavonóides 7-dioxi-flavona e 7-hidroxi-4-metoxi-isoflavona, isolados das raízes de *V. surinamensis*, se mostraram mais ativos que o antibiótico nistatina na inibição de crescimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*, evidenciando o papel ecofisiológico desses metabólitos na prevenção contra microorganismos do solo (LOPES et al., 1999).

Visando avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana, através do teste de difusão em agar, os extratos hexânico, acetato de etila e o metanólico; assim como as frações (**FA1, FA2, FA3 e F4**), foram submetidos ao teste frente às bactérias Gram negativas (*E.coli* e *P. aeruginosa*), Gram + (*S. aureus*) e fungo (*C.albicans*).

O extrato hexânico obtido das folhas de *V. surinamensis* não inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 6; Tabela 1). O fracionamento do extrato hexânico das folhas de *V. surinamensis* conduziu o isolamento das neolignanas surinamensina e virolina (BARATA 1976), logo, esperava-se que este extrato apresentasse atividade antimicrobiana. Esta falta de atividade do extrato hexânico pode estar relacionada a vários fatores, dentre estes:

1- Metodologia utilizada na análise da atividade: o método de difusão em ágar possui várias limitações, não sendo recomendado seu uso para comparação de atividade de extratos/frações diferentes, visto que a difusão

depende das propriedades físico-químicas do produto em avaliação (BUGNO et al., 2007);

2- Vários fatores podem influenciar na síntese de metabólitos secundários, tais como: índice pluviométrico, sazonalidade, temperatura, idade do vegetal e ritmo circadiano (EVANS, 1966; CALIXTO, 2000), a metodologia utilizada no processo extrativo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), sendo que o processo extrativo por percolação, em geral, é o mais adequado. No presente estudo, provavelmente, este extrato contenha predominantemente hidrocarboneto de cadeia longa, glicerídeos, ésteres e misturas de esteróides e arilpropanóides, isto justifica a falta de efeito inibitório sobre bactérias e fungos.

Semelhantemente, o extrato acetato de etila obtido das folhas de *V. surinamensis* avaliado através do método de difusão não foi ativo para *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 6; Tabela 1), vale ressaltar que este extrato deve conter surinamensina. O extrato acetato de etila mostrou-se inativo, porém o fracionamento pode potencializar a atividade biológica, visto que podem ser obtidas frações ricas em surinamensina. Vale ressaltar que o potencial alelopático desta substância está bem estabelecido, porém carece de estudos que avaliem a atividade antimicrobiana.

O extrato metanólico obtidos das folhas de *V. surinamensis* não inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 6; Tabela 1). Do extrato metanólico das folhas de *Virola surinamensis*, foram isolados os constituintes químicos β -sitosterol, veraguensina e galbacina (THOMPSON et al., 1972).

O β -Sitosterol e sitosterol- β -D-glucopiranosídeo mostraram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* com concentrações mínimas inibitórias de 50 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente (BELTRAME et al., 2002). Apesar do extrato metanólico, provavelmente, possuir β -sitosterol, este não inibiu o crescimento bacteriano e fungico. Esta resposta diferente pode estar relacionada ao teor de β -sitosterol no extrato que pode ser muito reduzido, visto esta substância ser melhor extraída em solventes apolares.

Outros metabólitos que podem estar presentes no extrato metanólico são a veraguensina e galbacina. O extrato diclorometânico *Talauma ovata* A. St. Hil (Magnoliaceae), de onde já foi isolado a galbacina apresentou fraca atividade inibitória sobre cepas de *Staphylococcus* sp e *Candida* sp (BARROS, 2008), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Semelhante à fração **FA1**, a fração **FA2** também não inibiu o crescimento dos microrganismos (Figura 6; Tabela 1). A fração **FA2** do acetato de etila não foi ativa contra bactérias e fungos. Porém em estudos preliminares mostram que deve conter neolignanas formil do tipo 8.O.4', como a surinamesina. A surinamesina tem sido atribuída atividade antimicrobiana. Neste trabalho não foi observada atividade na fração **FA2** do extrato de acetato de etila. A análise da fração **FA1** por RMN ¹H, indicou a presença de éster do ácido ferúlico

A fração **FA4** não inibiu o crescimento de *S.aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 6; Tabela 1). A fração **FA4** encontra-se ainda em fase de identificação.

A fração **FA3** foi ativa em *S. aureus*, porém não inibiu o crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Figura 6; Tabela 1). Em estudos preliminares da fração **FA3** foram detectadas neolignanas do tipo tetrahidrofuranas, às quais têm sido atribuídas propriedades antimicrobianas.

Tabela 1 – Avaliação da atividade antimicrobiana através da difusão em Agar

	Halo Diâmetro (mm) + desvio padrão			
Amostras	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Ext. hexânico	0	0	0	0
Ext. Acetato de Etila	0	0	0	0
Ext. Metanólico	0	0	0	0
FA1	0	0	0	0
FA2	0	0	0	0
FA3	11,4 ±2,1	0	0	0
FA4	0	0	0	0
Cloranfenicol	27,6 ±1,2	27,28 ±1,9	0	0
Gentamicina	0	0	17,73 ±0,7	0
Nistatina	0	0	0	11.16 ± 0,1
DMSO	0	0	0	0

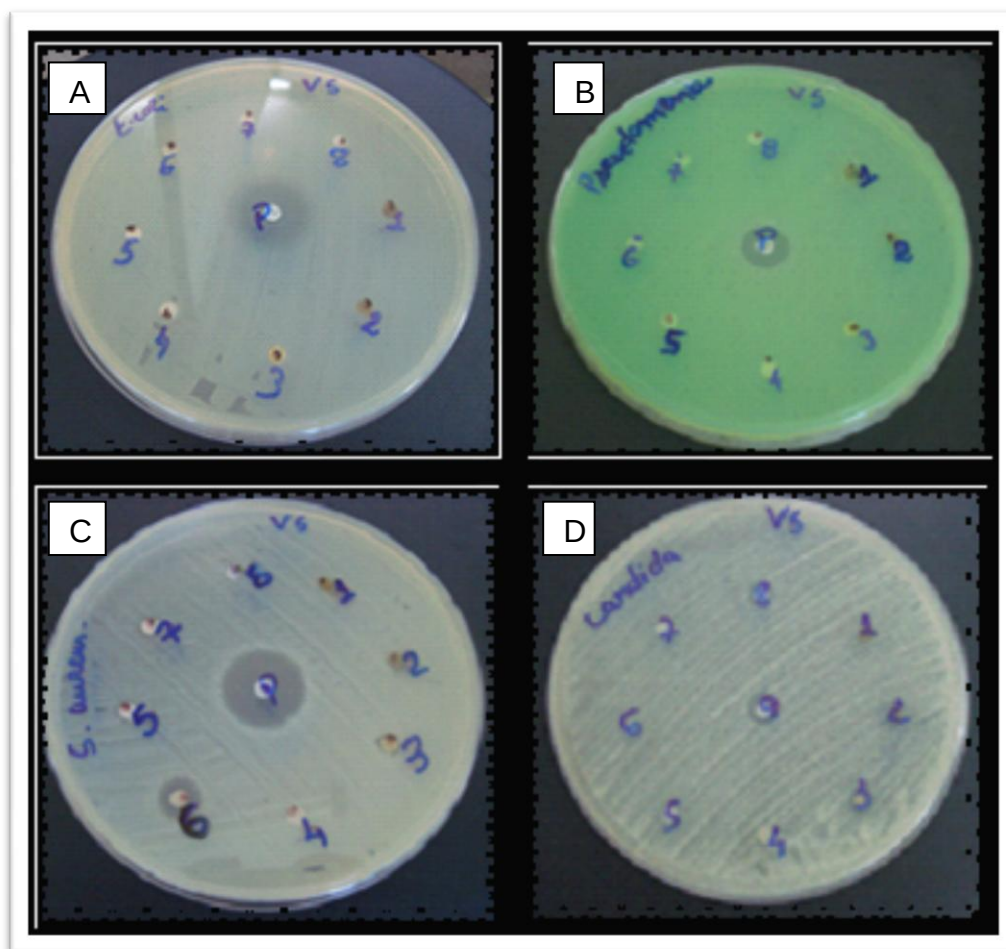


Figura 6- Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica pelo ensaio de difusão em Agar.

Legenda: **A:** *E. coli*; **B:** *P. aeruginosa* **C:** *S. aureus* e **D:** *C. albicans*; 1-Extrato metanólico; 2- Extrato de acetato de etila; 3-Extrato hexânico; 4-Fração **FA1**; 5-Fração **FA2**; 6-Fração **FA3**; 7- Fração **FA4**; 8- DMSO (Controle negativo) e P- Controle Positivo (*S.aureus* e *E.coli*- Cloranfenicol; *P. aeruginosa*-Gentamicina; *C. albicans* nistatina)

Somente a fração **FA3** foi considerada ativa no ensaio de difusão em Agar para a bactéria *S. aureus*, por isso somente esta fração foi submetida a avaliação pelo método da microdiluição em caldo (concentrações 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL). Porém, em todas as concentrações utilizadas da fração **FA3** não houve inibição do crescimento (Figura 7), sendo a CIM> 1000 µg/mL (inativa).

As diferentes respostas obtidas, isto é, a fração **FA3** foi moderadamente ativa em difusão em ágar e inativa (Quadro 4) no ensaio de microdiluição pode

estar relacionada à sensibilidade das técnicas. Isto é, o ensaio da microdiluição é mais específico que o teste de difusão em agar.

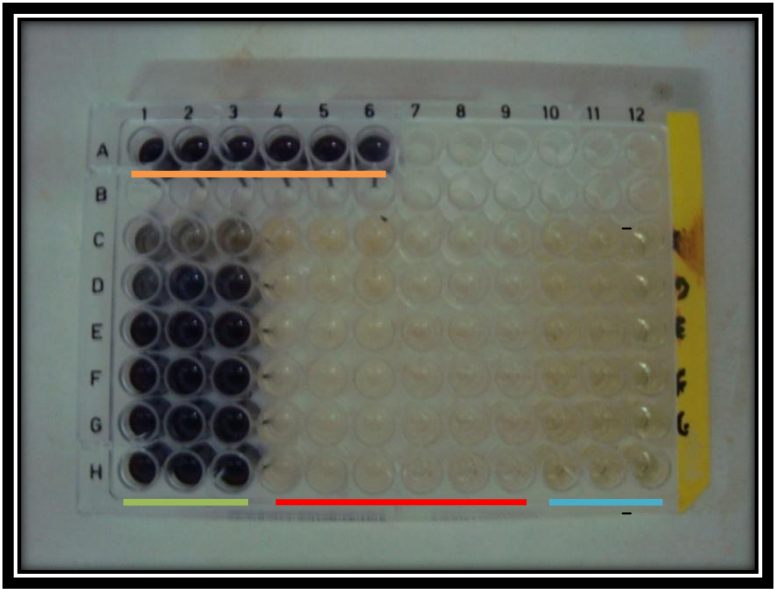


Figura 7: Atividade anti-estafilocócica de **FA3**

Legenda: 1 a 6 **CONTROLE NEGATIVO** (190µL Caldo. Hinton+10µL inoculo);colunas 1,2 e 3 de C a H-**AMOSTRA** (180µL CALDO M.HINTON + 10µL MICRODILUIÇÃO DA AMOSTRA (**FA3**) + 10µL INÓCULO DO *S. aureus*; POSIÇÃO 10-12 **C-H CONTROLE POSITIVO** (180µL CALDO M. HINTON + 10µL MICRODILUIÇÃO DO CLORANFENICOL + 10µL inóculo). Posição das colunas 4-9 e linhas C-H corresponde **CBM**

Quadro 4. Resultado Comparativo entre o Método de Agar e da Microdiluição

	Diluição em Agar	Microdiluição
Extrato Hexânico	Inativo	_____
Ext de acetato de etila	Inativo	_____
Ext.Metanólico	Inativo	_____
Fração FA1	Inativo	_____
Fração FA2	Inativo	_____
Fração FA3	Moderadamente ativo	Inativo
Fração FA4	Inativo	_____

5.1- Atividade antipromastigota

A atividade antipromastigota dos extratos obtidos da folha de *Virola surinamensis* foi testada contra as formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* na fase logarítmica de crescimento usado no ensaio o MTT. A premissa inicial foi que o extrato acetato de etila, que contém as neolignanas, fosse ativo em *Leishmania*.

O extrato hexânico apresentou atividade contra as duas espécies de *Leishmania*, conforme se observa na análise das CIM que foram de 100 µg/mL para *L. chagasi* apresentando CI_{50} de 86,40 µg/mL e para *L. amazonensis* a CIM foi de 50 µg/mL menor do que a da outra espécie de *Leishmania* estudada (Tabela 2; Figuras 8 a e b). O fracionamento do extrato hexânico das folhas de *V. surinamensis* conduziram a o isolamento das neolignanas, surinamensina e virolina (BARATA et al., 1976). Outros estudos relatam para a atividade leishmanicida de diferentes espécies como *V. oleifera*, *V. surinamensis*, *V. donovani* e *V. pavonis* atribuindo a atividade à presença de neolignanas como a surinamensina (FERNANDES et al., 1991; PINTO et al., 1990; BARATA et al., 2000).

O efeito antileishmania das lignanas e neolignanas tem sido extensamente descrito. As lignanas machila G e veraguensina apresentaram atividade *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. donovani* (SILVA FILHO et al., 2008). A verrucosina e guaiacina mostraram-se muito ativas frente as formas promastigotas de *L. amazonensis* (CI_{50} de 50 µg/mL) .

No presente estudo, foi detectado neste extrato misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa, éster de glicerídios, misturas de esteroide e arilpropanóides, sugerindo que outros metabólitos possam também apresentar atividade para ambas as espécies de *Leishmania*. Estes resultados também sugerem que a(s) molécula(s) ativa(s) devem possuir caráter apolar.

O extrato acetato de etila não foi ativo para nenhuma das duas espécies de *Leishmania* com CIM >200 µg/mL e CI_{50} >200 µg/mL (Tabela 2; Figuras 8a e 8b). Vale ressaltar que este extrato deve conter surinamensina e a atividade

antileishmania das diferentes espécies de *Virola* tem sido relacionada a este metabólito (FERNANDES et al., 1991; PINTO et al., 1998; BARATA et al., 2000). A falta de atividade em promastigota não significa ausência de atividade em amastigota, sabe-se que algumas substâncias podem ser atividades em apenas uma das formas de *leishmania*, talvez este seja o caso das neolignanas.

O extrato metanólico mostrou atividade apenas para *L.chagasi* na maior concentração utilizada neste estudo apresentando CIM de 200 µg/mL e CI₅₀ de 141,4 µg/mL (Tabela 2; Figuras 8 a e b), sendo considerado moderadamente ativo. Do extrato metanólico das folhas de *V. surinamensis*, foram isolados os constituintes químicos β-sitosterol, veraguensina e galbacina (THOMPSON et al., 1972).

Outro estudo observou fato muito semelhante, frações polares obtidas de *Jacaranda puberula* foram inativas em formas promastigota de *Leishmania* (NAKAMURA et al., 2006), enquanto que extratos apolares mostraram elevada atividade antileishmania (PASSERO et al., 2007). Desta maneira características lipofílicas parecem ser requeridas para a interação com o parasita, uma vez que a atividade dos compostos diminui com o aumento da polaridade (FERRARINI et al., 2008).

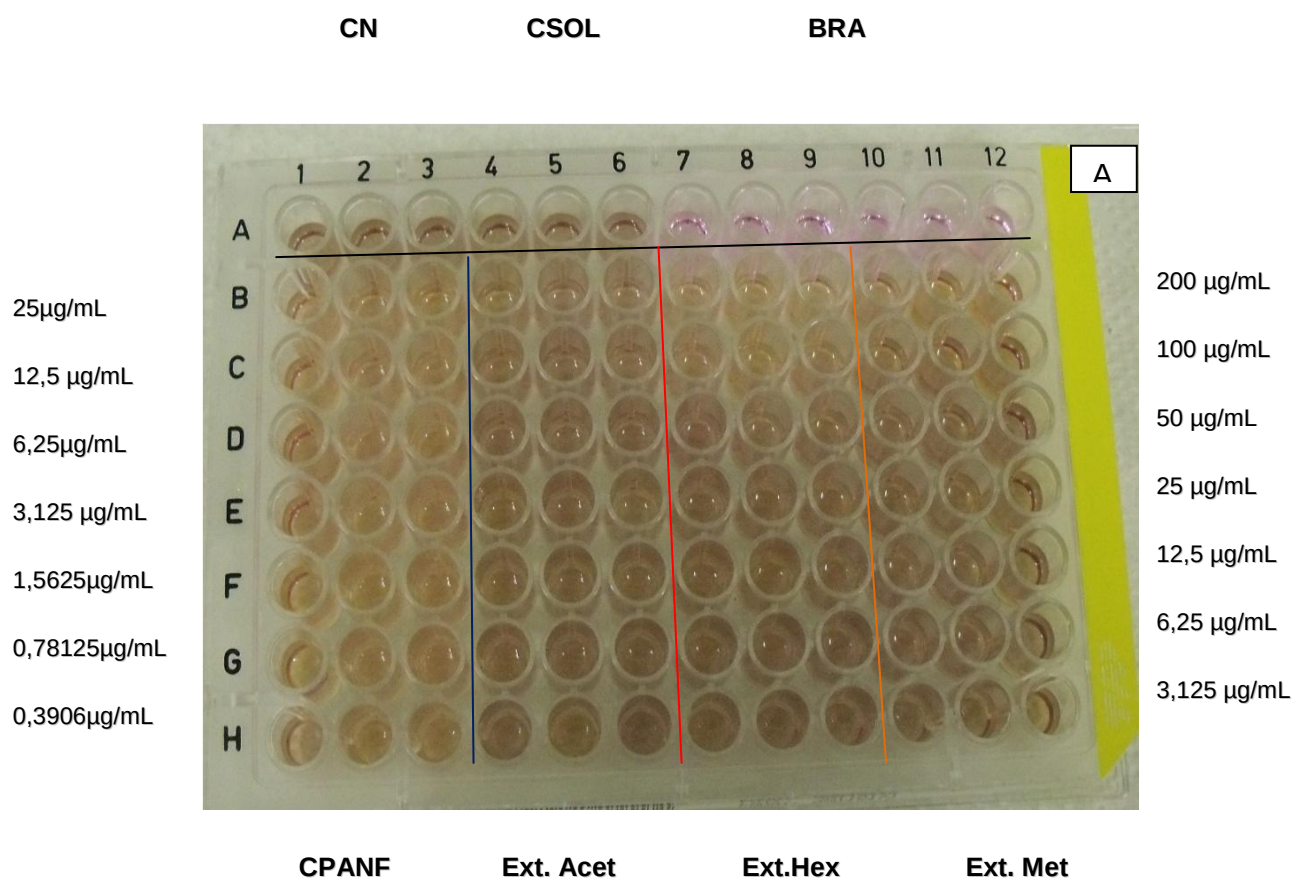
Em relação ao extrato metanólico, que contém a grandisina, apesar de não apresentar atividades antimicrobiana e antileishamina pode apresentar elevada citotoxicidade. Tal fato pode estar relacionado à grandisina que apresentou potencial genotóxico nas doses mais elevadas estudadas. Por outro lado, nas menores doses do estudo (2- 8mg/kg) foi observado que esta substância preveniu a fragmentação cromossômica, induzida pela ciclofosfamida, apresentando um potencial quimioprotetor dose dependente (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2007).

No presente trabalho, o extrato metanólico deve possuir flavonoides, principalmente. E isso pode explicar a ausência de resposta inibitória sobre as promastigotas de *Leishmania*.

Tabela 2 – Avaliação da atividade antipromastigotas de *L. chagasi* e *L.amazonensis* de *V. surinamensis*

Amostra	<i>L. chagasi</i>		<i>L.amazonensis</i>	
	CIM (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)
Ext.Hex	100	86,40	50	Não determinado
Ext. Acet	>200	270,9	>200	>200
Ext. Met	200	141,4	>200	>200
Anfotericina B	0,3906	0,062	Não determinado	Não determinado

Legenda: CIM=Concentração inibitória mínima; CI50 = Concentração inibitória 50%; Ext.Hex= Extrato Hexanico; Ext. Acet - extrato Acetato de etila; Ext.Met- extrato Metanolico; (1) Intervalo de confiança de 95%



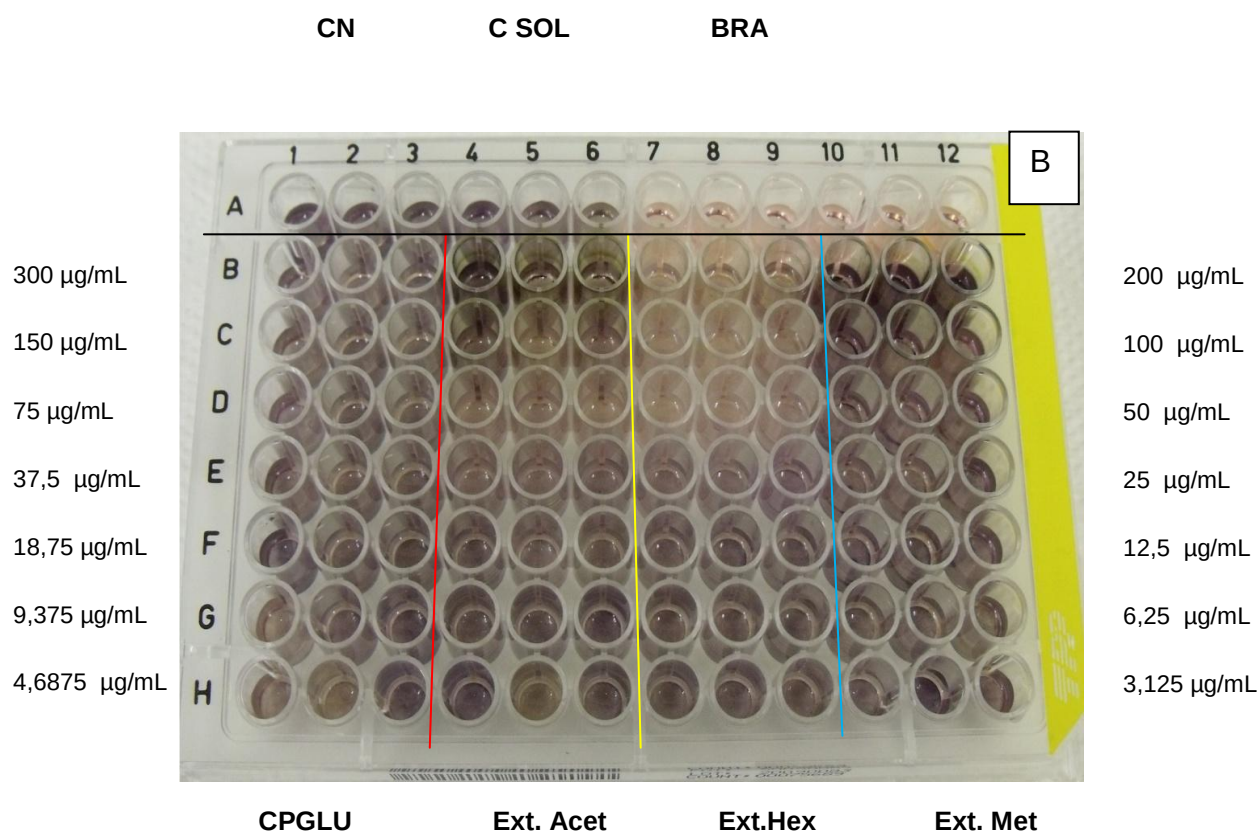


Figura 8 - Atividade anti-promastigota dos extratos obtidos das folhas de *Virola surinamensis*.
 Legenda: **Placa A**- *L. chagasi*; **Placa B** - *L. amazonensis*; CN- Controle negativo; CSOL- controle do solvente (metanol); BRA- Branco; **CPANF- Controle positivo Anfotericina B** nas concentrações: 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,5625 µg/mL, 0,78125 µg/mL e 0,3906 µg/mL; **CPGLU- Glucantime®** nas concentrações: 300 µg/mL, 150 µg/mL, 75 µg/mL, 37,5 µg/mL, 18,75 µg/mL, 9,375 µg/mL e 4,6875 µg/mL; Ext.Acet - extrato acetato; Ext.Hex- extrato Hexânico; Ext. Met.- extrato metanólico nas concentrações : 200 µg/mL; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL e 3,125 µg/mL

6- CONCLUSÃO

Neste trabalho foram avaliadas as atividades antimicrobiana e antipromastigota dos extratos hexânico, metanólico, acetato de etila bem como suas frações (**FA1, FA2, FA3 e FA4**) obtidos das folhas de *Virola surinamensis*.

Em relação à atividade antimicrobiana, apenas a fração **FA3**, que em estudos preliminares apresentou neolignanas do tipo tetraidrofurano, mostrou atividade no teste de difusão em Agar para *S. aureus*, sendo inativo no ensaio da microdiluição. Logo esta fração, provavelmente, não possua atividade antimicrobiana para as espécies testadas.

Na avaliação da atividade antipromastigota utilizou-se a *Leishmania L. amazonensis* e *L. chagasi*, sendo determinadas as concentrações inibitórias mínimas e Concentração inibitória 50%. No ensaio para atividade antileishmania, o extrato hexânico mostrou-se muito promissor e foi ativo tanto em *L. chagasi*, quanto em *L. amazonensis*. Esta atividade pode estar relacionada à presença de misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa, ésteres glicéricos, misturas de esteróides e arilpropanóides, que foram observados pela análise do espectro de RMN de ^1H .

7 - REFERÊNCIAS

AGUIRRE, GÁLVIS LUIS ENRIQUE. Aspectos quimiotaxonómicos en Myristicaceae Americanas, **Acta Biologica Colombiana** v.1, n.4, p.45-8, 1990

AGURREL, S.; HOLSTEDT, B.; LINDGREN, J. Alkaloids in certain species of *Virola* and other south American plants of ethnopharmacologic interest. **Acta Chem Scandinavica**, v.23: p.903-916, 1969.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M. SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of Candida Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43: p.1829-1835, 2005.

ALVAREZ ENRIQUE V., LUIS E. CUCA S. Y JUAN C. MARTINEZ V. "Neolignanos en hojas de *Virola calophylla* (Warb). **Revista Colombiana de Química** 14, No. 1-2, 31-41 1987.

ÁLVAREZ-LERMA, F., PALOMAR, M., OLAECHEA, P., INSAUSTI, J., BERMEJO, B., CERDÁ-CERDÁ, E. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en unidades de cuidados intensivos. Informe del año 2002. **Med Intensiva**, v. 29: p. 1-12, 2005.

ANTOINE, J.C.; RINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogénesis and properties of the parassitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v.7, n. 10, p. 392-401, 1998.

BALABAN, N.; GOLDKORN, T.; R. T. NHAN, R. T.; DANG, L. B.; SCOTT, S.; RIDGLEY, R. M.; RASOOLY, A.; WRIGHT, S.C.; LARRICK, J.W.; RASOOLY, R.; CARLSON, J. R. Auto inducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *S. aureus*. **Science**, v. 280, p. 438-40, 1998.

BARATA, L.; SANTOS, L.; FERRI, P.; PHILLIPSON, J.; PAINE, A.; CROFT, S.; Anti-leishmaniol activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogue. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.589-595, 2000.

BARATA, L.E.S. Isolamento e Síntese de Neolignanas de *Virola surinamensis* (Rol) Warb. Tese submetida ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Sp , 1976.

BARATA, L.E.S. BAKER, P.M.; GOTTLIEB, O.R.; RÚVEDA, E.A. Neolignans of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v.17, n.4, p.783-785, 1978.

BARATA, L.E.S.; QUEIROZ, S.R.R. Contribuição Efetiva ou Potencial do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade, estudo elaborado para o Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Sub-Programa de Planejamento e Gestão em Ciência e Tecnologia (PGCT), do Ministério da Ciência e Tecnologia. Campinas, 1995.

BARATA, L.S., SANTOS, L.S, FERNANDES, A.M.A.P., FERRI, P.H, PAULO, M.Q., NEAL, R, JOURDAN, M.C. *2nd Brazilian-German Symposium on Natural Products, Hannover, 18-21.1991.*

BARBERINO, M.G.; SILVA, N.; REBOUÇAS, C.; BARREIRO, K.; ALCÂNTARA, A.P.; NETTO, E.M.; ALBUQUERQUE, L.; BRITES, C. Evaluation of blood stream infections by Candida in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, p.36-40, 2006.

BARROS, L.F.L. *Estudo químico, atividade antimicrobiana e antioxidante das folhas de Talauma ovata A. St. Hil (Magnoliaceae).* 2008. 140 p Dissertação de (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2008.

BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p. 493-6, 1966.

BELTRAME, F.L.; GREISIELE, L.P.; DORO, D.L.; DIAS FILHO, B.P.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. Evaluation of the Antidiabetic and Antibacterial Activity of *Cissus sicyoides*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.45, n.1, p. 21-25, 2002.

BENNETT, B.C.; ALARCÓN, R. *Osteophloeum platyspermum* (A.DC.) Warburg and *Virola duckei* A.C. Smith (Myristicaceae): Newly reported as hallucinogens from Amazonian Ecuador. **Economic Botany**, v. 48, p.152-158, 1994.

BERGER, M.E. *Plantas Medicinais da Amazonia*, 2nd edition. CNPq, Brasil, 207 p., 1992.

BERGER, M.E. *Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático*. 3ª. Ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010.

BERMAN, J. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.11, p. 707-710, 1998.

BERQUÓ, L.S.; BARROS, A.J.D; LIMA, R.C.; BERTOLDI, A.D. Utilização de antimicrobianos em uma população urbana. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.239-46, 2004.

BLUMENTHAL, E.E.A.; SILVA, M.S.; YOSHIDA, M. Lignoids, flavonoids and polyketides of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v.46, p.745-9, 1997.

BORGES, F.C.; SANTOS, L.S.; CORRÊA, M.J.C.; OLIVEIRA, M.N.; SOUZA FILHO, A.P.S. Potencial alelopático de duas neolignanas isoladas de folhas de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 51-9, 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Portaria Interministerial nº. 1.426 de 11 de Julho de 2008*: Diário Oficial, 133, p. 37, 2008

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Série A. *Normas e Manuais*

Técnicos. Atlas de leishmaniose tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília – DF, 1ed, MS editora, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. *Normas e Manuais Técnicos*. 2.^a edição atualizada, MS editora Brasília – DF, 2007, p.177.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R.; MORAIS, A.A.; PEDREIRA, G.; PINHO, S. L.V.; MAGALHÃES, M.T.; RIBEIRO, M.N.S.. The chemistry of brazilian Myristicaceas. IX Isoflavonoids from Amazonian species. ***Journal of Natural Products***, v. 40, p. 236-238, 1977.

BRAZ FILHO, R.; MOURÃO, J.C.; GOTTLIEB, O.R.; MAIA, J.G.S.. Lanthanide Induced shifts as an aid in the structural determination of Eusiderins. ***Tetrahedron Letters***, v. 15, p. 1157-1160, 1976

BRZEZINSKI, A.; DEBI, A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators. ***Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.***, v.85, n.1, p.47-51, 1999.

BUGNO, A.; NICOLETTI, M.A.; ALMOVAVAR, A.B.; PEREIRA, T.C.; AURICCHOIO, M.T. Antimicrobial efficacy of cúrcuma zedoaria as assessed dy linear refression compared with commercial mouthrinses. ***Braz. J. microbial.***, v.38, p.440-445, 2007.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). ***Braz. J. Med. Biol. Res.***, v.33, n.2, p. 179 -189, 2000.

CAMPOS, J.F.F. *Ação leishmanicida in vitro da miltefosine em formas promastigotas de Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) guyanensis, Leishmania (Viannia) braziliensis e estudo in vivo de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental.* 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008. 79.p.

CARVALHO, C.E.; EITAN, N.; PISTELLI, I.P.; MÍMICA, L., CARDOSO, M.R.A.. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J. Pediatr.**, v.81, n.1, p.29-33, 2005.

CAVALCANTI, S.M.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.9, p.56-63, 2005.

CDC. Leishmaniasis: Life Cycle. CDC, 2012. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso em: 14 mar 2012

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, pp. 99-105, 1998.

COROTHIE, E.; NAKANO, T. Constituents of the bark of *Virola sebifera*. **Planta Medica**, v.17, p. 184- 8, 1969

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional, 1984.v.I a IV.

CROFT, S.L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design** , v. 8, n. 4 319-342, 2002.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive Mechanism in infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v.72, p. 132-141, 2002.

DAVINO, S.C.; BARROS, S.B.M.; SILVA, D H.S.; YOSHIDA, M. Antioxidant Activity of *Iryanthera sagotiana* Leaves. **Fitoterapia**, v. 69, p. 185-186, 1998.

DEMICHELI, C.; FRÉZAR, F. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Drugs Design Reviews**, v.2, n.3, p. 243-249, 2005.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M.E.; KOHN, L.K., FOGGIO, M.A., CARVALHO, J.E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.4, p. 598-603, 2007.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002.605 p.

DOLABELA, M.F. *Atividade antiplasmodica e citotoxicidade de Esenbeckia febrífuga (A.St-Hil.) Juss. Ex Mart. (RUTACEAE) e de especies do genero Aspidosperma (Apocynaceae)*. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, 2007, 181 f

E.F. Pinto, E.C. Torres-santos, M. Aveniente, L.E.S. Barata e B.R. Bergmann, "Atividade Anti-leishmanicida e Alterações Ultraestruturais Induzidas Por Análogos Sulfurados de Neolignanas de *Virola Surinamensis*", Anais do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, SI , 59, (1998).

EL-KATTAN, A.F.; ASBILL, C.S.; KIM, N.; MICHNIAK, B.B. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. **Int. J. Pharm.**, v.215, p.229-240, 2001.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.*, v. 64,p. 711-713, 1998.

EVANS, W. C.; *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 14th ed., WB Saunders Company: London, 1966, 612 p.

FERNANDES, A.M.A.P.; BARATA, L.E.S.; FERRI, P.H. Absolute configuration of the lignan oleiferins from *V. olifera*. **Phytochemistry**, v.36, n.2, p.533-534, 1994.

FERNANDES, A.M.A.P.; BARATA, L.E.S.; FERRI, P.H. Lignan and a neolignan from *V. olifera* leaves. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1567-1572, 1993.

FERNANDES, J.B.; FRAGA, R.L.; CAPELATO, M.D.; VIEIRA, P.C.; YOSHIDA, M.; Kato, M.J. Synthesis of Dibenzocyclooctadiene by Anodic Oxidation. ***Synthetic Communications***, v. 21, p. 1331-1336, 1991.

FERRARINI, S.R.; GRAEBIN, C.S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R.F.; DIAS, D.O.; ROSA, R.G.; MADEIRA, M.F.; LIMA, E. Synthesis of limonene β -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. ***Mem. Inst. Oswaldo Cruz***, v.103, n.8, p. 773-7, 2008.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; FILHO, L. G.; PINTO, L. H. B.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, v. 99, n. 3. p. 325-7, 2004.

FERRI, P.H.; BARATA, L.E.S. (–)-Di-de-O-methylgrandisin, a lignan from *Virola pavonis* leaves. ***Phytochemistry***, v.30, p.4204-5 30, 1991

FERRI, P.H.; BARATA, L.E.S. Neolignans and a phenylpropanoid from *Virola pavonis* leaves. ***Phytochemistry***, v.31, p.1375-7, 1992.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. ***Revista Brasileira de Epidemiologia***, v.7 n. 3 p. 338-49, 2004.

GOTTLIEB, O.R.; MAIA, J.G.S.; RIBEIRO, M.N.S. Neolignans from *Virola carinata*. ***Phytochemistry***, v. 15, p. 773-774, 1976.

GOTTLIEB, O.R.; SILVA, M.L.; MAIA, J.G.S.; RESENDE, C.M.A.M. Arylpropanoids from *Licaria puchury-major*. ***Phytochemistry***, v. 12, p. 471-472, 1973.

GRIMALDI JUNIOR, G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, v.77, n 2 p 195-215, 1982.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v.41, n.6, p 687-725, 1989

GUIMARÃES, M.M.Q.; ROCCO, J.R. Prevalência e prognóstico dos pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em um hospital universitário. **J .Bras. Pneumol.**, v.32, n. 4, p.339-46, 2006.

HARDY, K.J., HAWKEY, P.M., GAO, F., OPPENHEIM, B.A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. **British Journal of Anaesthesia**, v.92, n.1, p.121-30, 2004.

HERWALDT, B.L. *Leishmaniasis*. **The Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HOEHNE, E.C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. *Coletânea de aulas*. São Paulo: Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, 1939. 355p

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-31, 2002.

KANAFANI, Z.A.; FOWLER JUNIOR, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.24, n. 3, p.182-193, 2006.

KATO, M.J.; PAULINO FILHO, F.H.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Neolignans from *Viola elongata*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 279-280, 1986.

KATO, M.J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Flavones and lignoids in flowers, fruits and seedlings of *Viola venosa* (Benth.) Warb. **Phytochemistry**, v. 31, p. 283-286, 1992.

KATO, M.J.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Lignoids and Arylalkanones from fruits of *Viola elongata*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1799-1810, 1990.

LEITE, A.M.C.; LLERAS, E. Áreas prioritárias na Amazônia para a conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fase preliminar. **Acta Botânica Brasilica**, v.7, n.1, p.61-94, 1993.

LEMUS, S.M., CASTRO, C.O. Potential antifungal neolignans from *Virola koschnyi* fruits. **Spectroscopy**, v.7, n.5-6, p.353-8, 1989.

LOPES, L.M.X.; Kato, M. J.; PAULINO FILHO, H. F.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. 2-Acilocloexano-1,3-diona e 2-acilresorcinol de *Virola elongata* e de *Virola sebifera*. In: VIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1984, Manaus. *Livro de Resumos do VIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, 1984.

LOPES, L.M.X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v.22, n.6, p.1516-1518, 1983.

LOPES, N.P.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M.. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 64, p. 667-669, 1998.

LOPES, N.P.; ALMEIDA BLUMENTHAL, E.E.; A. J. CAVALHEIRO, A.J.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Lignans, γ -Lactones and propiophenones of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1089-92, 1996.

LOPES, N.P.; KATO, M.J.; ANDRADE, E.H.; MAIA, J.G.; YOSHIDA, M.; PLAICHART, A.R.; KATZIN, A.M. Antimalarial use of volatile oil of *Virola surinamensis* by Waiãpi amazon Indian. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 313-319, 1999.

LOPES, N.P.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 29-33, 1999.

LOPES, N.P.; SANTOS, P.A.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. New butenolides in plantlets of *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n.10, p. 1255–1257, 2004

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Editora Plantanum, 1992. p. 248.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J.P. 1989. *Fichas de Características das Madeiras Brasileiras*. 2ª Edição, São Paulo, IPT. 418p. (Publicação IPT n. 1791)

MARQUES, M. F. S. Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. 1988.117 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1988.

MARQUES, M.O.M; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Neolignans from fruits of *Virola pavonis*. ***Phytochemistry***, v.31, n.12, p.4380-1, 1992.

Martinez J. C and L. E. CUCA, "Flavonoids from *Virola calophylloidea*," ***Journal of Natural Products***, vol. 50, no. 6, pp. 1045–1047, 1987b

MARTINEZ V.; TORRES, J.C; RICARD, C.H. Lignans from *V. aff. pavonis* leaves. ***Phytochemistry***, v.44, n.6, p.179-82, 1997.

MARTINEZ, J. C ; YOSHIDA, M. ; GOTTLIEB, O. R. . Arylnaphthalene Neolignans From '*Virola calophylla*'. ***Phytochemistry***, v. 29, p. 2655-2657, 1990.

MARTINEZ, V.J.C.; ALDANA, J.M.I.; CUCA, S.L.E. Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves. ***Phytochemistry***, v.50, p.883-6, 1999.

MELO, N.M. *Avaliação da atividade anti-Leishmania in vitro de complexos Sb-ribonucleosídeos em Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

MITAINE-OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ, M.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. ***Phytomedicine***, v.9, p.142–145, 2002.

MORAIS, S.K.R; TEIXEIRA, A. F.; TORRES, Z. ; NUNOMURA, S. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; LINDOSO, J. A. L ; YOSHIDA, M. . Biological

Activity of Lignoids from Amazon Myristicaceous Species: *Virola michelii*, *V. molissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1110-1118 , 2008.

MOREL, C.M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n.8, p.1522-1523, 2006.

MOTHANA, R.A.A.; ABDO, S.A.A.; HASSON, S.; ALTHAWAB, F.M.N.; ALAGHBARI, S.A.Z.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. **Evid. Based Complement Altern Med.**, v.7, p.323-30, 2005.

MULLER, I.; HAILU, A.; CHOI, B.S, ABEBE, T.; FUENTES, J.M.; MUNDER, M.; MODOLELL, M.; KROPF, P. Age related alteration of arginase activity impacts on severity of leishmaniasis. **Neglected Tropical Diseases**, v. 14 , n 5 , p 1-10, 2008.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, O.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Ver. Bras. Farmacog.**, v.16, p. 61-66, 2006.

NATARO, J.P., KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, 11(1): 142-201, 1998.

NGURE, P.K.; TONUI, W.K.; INGONGA, J.; MUTAI, C.; KIGONDU, E.; NG'ANG'A, Z.; RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. In vitro antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, n.2, p.61-66, 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, L. M.; GUERRA, M. T.; VIEIRA, M. S.; VALADARES, M. C. Investigação do potencial mutagênico da grandisina. Anais eletrônicos da XV Semana Científica Farmacêutica, Goiânia: UFG, 2007, **Revista Eletronica de Farmácia**, v. IV, n.2, p.82-84, 2007

OLLIARO, P.L.; BRRYCESON, A.D.M. Pratical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. ***Parasitology Today***, v .9, p. 323-8, 1993.

PAGNOCCA, F.C.; RIBEIRO, S.B.; TORKOMIAN, V.L.V.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; SILVA, O.A.; FERNANDES, J.B; VIEIRA, P.C; SILVA, M.F.G.F.; FERREIRA, G.A. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. ***Journal of Chemical Ecology***, v. 22, n. 7, p. 1325-1330, 1996.

PAIXÃO, L.B.; HIRUMA-LIMA, A.C. *Virola surinamensis* (Rol.) Warb.: Um estudo etnofarmacológico. *Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, p. 109 , 2000.

PASSERO, L.F.D.; CASTRO,A.A.; TOMOKANE, T.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURETI, M.D.;TOYAMA, M.H. Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula* leaves. ***Parasitology Research***. v.101, n.3, p.677-80, 2007.

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***, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PINTO, M.M.M.; KIJJOA, A.; MONDRANONDRA, I.O.; GUTIERREZ, A.B.; HERZ, W. Lignans and other constituents of *knema furfuracea*, ***Phytochemistry***, v. 29, n. 6, p.1985–8, 1990.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL. P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova* v.26, p.550-3, 2003.

REZENDE, R.K.; KATO, M.J. Dibenzylbutane and arytetralonelignans from seeds of *Virola sebifera*. ***Phytochemistry***, v.61, p.427-432, 2002.

RODRIGUEZ, W. A. 1989. Two new neotropical species of Compsonura (Myristicaceae). ***Brittonia*** 4: 160-163.

RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazonica**, v. 10, suppl, p. 1–127, 1980.

ROMOFF, P.; YOSHIDA, M. Chemical constituents from Myristicaceae. **Cienc. Cultura**, v.49, n.5/6, p.345-353, 1997

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

SADER, H.S.; MENDES, R.E.; GALES, A.C.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J. Pneumol.**, v.27, n.2, p.59-6, 2001.

SANTOS L. S; CORREA M. J. C; CAMPOS L. M. O; ANDRADE M. A. Constituents from the leaves of *Virola michelli*. **Fitoterapia**, v. 67, n.6, pp. 555-556, 1996.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora da UFSC, 2003. cap. 31. p. 918-958.

SCHULTES, R.E.; HOLMSTED, B. Comments on poisonous plants from tropical new world.8. Miscellaneous plants of South-America. **Lloydia**, v.34, n.1, p.61-90, 1971.

SILVA FILHO, A.A.; COSTA, E.S.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; DHAMMIKA, N.P.; BASTOS, J.K. In vitro antileishmania and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae).

SILVA, D.H.S., PEREIRA, F.C., ZANONI, M.V.B., YOSHIDA, M. Lipophyllic antioxidants of *Iryanthera juruensis* fruits. **Phytochemistry**, v.57, p.437-442, 2001.

SILVA, D.H.S.; LOPES, N.P. ; KATO, M.J. ; YOSHIDA, M. Butanolides as a common feature between *Iryanthera lancifolia* and *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 1405-1410, 1998.

SILVA, D.H.S.; LOPES, N.P.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Fatty acids from Myristicaceous seeds of myristic acid-rich species. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 46, p. 232–235, 1997.

Silva, D.H.S.; Zhang, Y.; Santos, L.A.; Bolzani, V.S.; Nair, M.G. (Bioactive Natural Products and Phytoceuticals, Department of Horticulture and National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824, USA) Lipoperoxidation and cyclooxygenases 1 and 2 inhibitory compounds from *Iryanthera juruensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55(7): p. 2569-2574, 2007

SILVA, R. F. Capítulo 8; Infecções fúngicas em imunocomprometidos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, p. 142-147, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SOUZA V. C.; LORENZI H. Botânica Sistemática - *Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira*, baseado em APG II. Plantarum, 640 p Nova Odessa, 2005,

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R.G.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, S. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of the Clinical investigation**. v. 118, n.4, p 1301-1310, 2008.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; FERREIRA, I.C.P.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.; OLIVEIRA, A.J.B. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v.16, n.6, p.377-80, 2007.

TANAKA, J.C.A; SILVA, C.C; OLIVEIRA, A.J.B; NAKAMURA,C.V; DIAS FILHO,B.P. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, p.387- 391, 2006.

TAVEIRA, C. C. Ação antimicrobiana de extratos de plantas do Cerrado e isolamento de substância ativa de *Kielmeyera coriácea*. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em ciências médicas) – Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília, Brasília, 2007

THOMPSON, L.U.; SEIDL, M.M.; RICKARD, S.E.; ORCHESON, L.J. Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.17, p.1373-1376, 1996b.

THOMPSON, L.U.; SEIDL, M.M.; RICKARD, S.E.; ORCHESON, L.J.; FONG, H.. Antitumorigenic effect of a mammalian lignin precursor from flaxseed. **Nutr. Cancer**, v.26, p.159-165, 1996a.

THOMPSON, M.J.,DUTHY,S.R.; PATTERSON,G.W e GOODEN, E.L. NMR SPECTRA of C-24, isomeric sterols. **Phytochemistry**, 11 178 ,1972.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Livraria Atheneu Editora, 1999. 520p.

VARNIER SANTOS, M.A.; MARTINY, A; SOUZA,W. Cell biology of leishmania spp., invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**. V. 8, n. 4 p. 297-318, 2002.

VASQUEZ, J.A; Louise M. Dembry; Veronica Sanchez; Mary A. Vazquez;Jack D. Sobel; Carl Dmuchowski; and Marcus J. Zervos. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An epidemiologic study. **Journal Infectious Diseases**, v. 168, p. 195-201, 1997.

VON ROTZ R., LUIS E. CUCA S., JUAN C. MARTINEZ V. "Lignanos de *Virola sebifera*". **Revista Colombiana de Química**, 16, No. 1-2, 51-55, 1989.

VON ROTZ, R., CUCA S., L.E. Y MARTINEZ V., J.C. "Diarilpropanos y derivados indólicos en madera de *Virola sebifera* y *Virola calophylloidea*". **Revista Colombiana de Química**, 19 (1), 97 , 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The global burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organization, 2008. p.1-146.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Technical Report Series on the control of the leishmaniases* , 2011

YAMANE, M. A.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Terpene penetration enhancers in polyleneglycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.47, p. 978-989, 1995

ZACCHINO, S.; RODRÍGUEZ, G.; PEZZENATI, G.; ORELLANA, G.; ENRIZ, R.; GONZALEZ SIERRA, M. *In vitro* evaluation of antifungal properties of 8'.0.4'- neolignans. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 7, p. 659-662, 1997

ZARDO, V.; MEZARRI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *NewsLab*.[S.I.], ed 63. 2004

ZHANG, H.J.; TAMEZ, P.A; HOANG, V.D.; TAN, G.T.; HUNG, N.V.; XUAN, L.T.; HUONG, L.M.; CUONG, N.; THAO, D.T.; SOEJARTO, D.D.; FONG, H.H.S.; PEZZUTO, J.M.. Antimalarial compounds from *Rhaphidophora decursiva*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p.772-7, 2001.