

MARIA CAROLINA SILVA MARQUES

**ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO EM BUSCA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS E O POTENCIAL ANTI-*LEISHMANIA* DE
Momordica charantia LINN.**

CAMPO GRANDE

2011

MARIA CAROLINA SILVA MARQUES

**ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO EM BUSCA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS E O POTENCIAL ANTI-*LEISHMANIA* DE
Momordica charantia LINN.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

CAMPO GRANDE

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA CAROLINA SILVA MARQUES

**ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO EM BUSCA E
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS E O POTENCIAL ANTI-*LEISHMANIA* DE
Momordica charantia LINN.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

Resultado: Aprovada.

Campo Grande (MS), 07 de outubro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walmir Silva Garcez
Orientador
Instituição: UFMS

Prof^a. Dra. Lúcia Maria Conserva
Intituição: UFAL

Prof^a. Dra. Maria Elizabeth M. Cavalheiros Dorval
Instituição: UFMS

Prof^a. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos
Instituição: UFMS

Prof^a. Dra. Edilene Delphino Rodrigues
Instituição: UFMS

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha grande companheira, amiga e filha Vitória Maria e aos meus pais, Luiz Fernando e Glória Maria, meus eternos ídolos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, razão de tudo.

Agradeço ao meu orientador **Dr. Walmir Silva Garcez**, que me acolheu de braços abertos e soube com muita paciência dividir seus conhecimentos, possibilitando o meu crescimento pessoal e profissional.

À **Dra. Lidilhone Hamerski** com os seus ensinamentos sobre bioensaios, a minha mola mestre inicial.

À professora **Dra. Fernanda Garcez** que trouxe dicas e incentivos preciosos nessa caminhada.

Aos meus colegas de laboratório, que estiveram cada um em suas lutas, mas ao mesmo tempo todos unidos, buscando auxiliar uns aos outros, em especial o **Dr. Joaquim Corsino**.

À **Dra. Edilene Delphino Rodrigues** que muito me auxiliou nas análises espectrais e dicas de informática, obrigada pela sua paciência.

Ao **Dr. Eduardo Caio Torres-Santos** e sua orientanda **Mariela Vasconcelos** do Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz pela realização dos testes em leishmania.

Às professoras **Dra. M^a Elizabeth M. Cavalheiros Dorval**, Laboratório de Parasitologia da UFMS; **Dra. Marilene Chang**, Laboratório de Microbiologia da UFMS; **Dra. Zaira da Rosa Guterres**, da UEMS; **Dra. Ubirazilda Maria Rezende**, Herbário da UFMS, que me receberam em seus laboratórios, possibilitando o desenvolvimento desse trabalho, obrigada por suas orientações.

Ao **Sr. Eugênio Vargas Alves**, raizeiro de Bonito-MS, por suas coletas e contribuições.

A todos os demais, que embora seus nomes não estejam grafados, contribuíram direta ou indiretamente para a construção desse trabalho.

Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.

Charles Chaplin

RESUMO

Marques MCS. Estudo de plantas medicinais do cerrado em busca de substâncias bioativas e o potencial anti-*Leishmania* de *Momordica charantia* Linn. Campo Grande (MS); 2011. [Tese – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste].

Os produtos naturais ainda são a principal fonte de inovação de agentes terapêuticos e aliados ao conhecimento tradicional tornam-se ferramentas fundamentais na busca de compostos farmacologicamente ativos. Por essas razões o objetivo desse trabalho foi avaliar atividades biológicas de espécies vegetais utilizadas pela população da região do Cerrado de Mato Grosso do Sul em busca de substâncias bioativas e avaliar o potencial antileishmania da espécie *Momordica charantia*. Foram coletadas 14 espécies na região de Bonito – MS, das quais obtiveram-se 23 extratos etanólicos brutos que foram submetidos aos ensaios de atividades antibacteriana (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e antifúngica (*Candida albicans*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*) pelo método de microdiluição, antileishmania em promastigotas da cepa *Leishmania amazonensis*, ensaio de citotoxicidade em *Artemia salina* e ensaio antirradicalar sobre a capacidade sequestradora de DPPH. Das 14 espécies testadas, 12 (85,7%) apresentaram de moderada a alta atividade em pelo menos uma das atividades avaliadas. O extrato da espécie *Momordica charantia* apresentou uma atividade considerável quanto à ação antileishmania e por isso foi selecionada para o estudo biomonitorado. O extrato foi submetido a técnicas cromatográficas de separação, incluindo cromatografia em coluna de sílica gel, de Sephadex LH-20, preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. As determinações estruturais foram efetuadas com base nos dados espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135° e técnicas bidimensionais NOESY, COSY, HMBC e HSQC, e análise comparativa com dados de literatura. O estudo químico biomonitorado do extrato de *Momordica charantia* conduziu ao isolamento de seis substâncias, sendo que quatro correspondem a dois pares de estereoisômeros e foram caracterizadas como 25-metóxi-3 β ,7 β -diidroxicucurbita-5,23(*E*)-dien-19-al; 3 β ,7 β ,25-triidroxicucurbita-5,23(*E*)-dien-19-al, os isômeros (19*R*, 23*E*) e (19*S*, 23*E*)-5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol e os isômeros (19*R*, 23*E*) e (19*S*, 23*E*)-5 β ,19-epóxi-19-metoxicucurbita-6,23-dien-3 β , 25-diol; apresentando uma CI_{50} na faixa de 4,6 a 5,2 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados indicam não existir uma substância específica com ação antipromastigota, mas sim a classe promissora de ação antileishmania de substâncias denominadas genericamente de cucurbitacinas.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, *Artemia salina*, DPPH, fracionamento biomonitorado, cucurbitacinas

ABSTRACT

Marques, MCS. Study of medicinal plants of the cerrado in the search for bioactive substances and the potential of *Leishmania Momordica charantia* Linn. Campo Grande (MS), 2011. [Thesis - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste].

Natural products are still the main source of innovation of therapeutic agents and allies to the traditional knowledge become key tools in the search of pharmacologically active compounds. For these reasons the objective of this study was to evaluate the biological activities of plant species used by the population of the region of Cerrado in the state of Mato Grosso do Sul in the search for bioactive substances and assess the potential antileishmanial of specie *Momordica charantia*. We collected 14 species in the Region of Bonito (MS), of which we obtained 23 ethanol extracts gross. These extracts were subjected to bioassay of antibacterial activity (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) and antifungal (*Candida albicans*, *C. krusei* and *C. neoformans*) by the method of microdilution, antileishmanial in promastigotes of *Leishmania amazonensis* strain, cytotoxicity on *Artemia salina* and antiradicalar on the ability of DPPH scavenging. Of the 14 species tested, 12, that is, 85.7 % of the species was moderate to high activity in at least one of the activities evaluated. Of these, the kind *Momordica charantia* showed an activity that is very significant as the antileishmanial activity and therefore was selected for study bioguided. This extract was subjected to chromatographic techniques of separation, including column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20, preparative and high performance liquid chromatography in reverse phase. The structural determinations were made on the basis of spectroscopic data of ^1H NMR, ^{13}C and bidimensional techniques NOESY, COZY, HMQC, HSQC, and comparative DEPT 135° analysis with the data in the literature. The bioassay-guided chemical study of the extract of *Momordica charantia* it lead to the isolation of six substances, being that four correspond the two pairs of stereoisomers and had been characterized as 25-methoxy-3 β , 7 β - dihydroxycucurbita-5,23 (*E*) - dien-19-al; 3 β , 7 β , 25-trihydroxycucurbita-5,23 (*E*) - dien-19-al, isomers (19*R*, 23*E*) and (19*S*, 23*E*) - 5 β , 19-Epoxy-19,25-dimethoxycucurbita-6,23-dien-3 β -ol and isomers (19*R*, 23*E*) e (19*S*, 23*E*) - 5 β , 19-Epoxy-19-methoxycucurbita-6,23-dien-3 β , 25-diol; presenting a IC_{50} in the band of 4,6 the 5,2 $\mu\text{g/mL}$. These data indicate not to exist a specific substance for action antipromastigota, but yes the promising classroom of antileishmania called substance action generically of cucurbitacins.

Keywords: antimicrobial activity, brine shrimp, DPPH, bioassay-guided fractionation, cucurbitacines

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista das espécies vegetais pré-selecionadas para o estudo.....	64
Tabela 2 – Identificação botânica das espécies coletadas e suas respectivas famílias, parte do material vegetal coletado e rendimento do extrato bruto etanólico.....	82
Tabela 3 – Atividades biológicas e antirradicalar dos 23 extratos das plantas coletadas.....	88
Tabela 4 – Massas do extrato bruto etanólico de <i>Momordica charantia</i> e das frações.....	90
Tabela 5 – Frações da partição acetato de etila de <i>Momordica charantia</i> (FACMC) em Sílica gel 80-230 mesh com eluição inicial de hexano:acetato de Etila (9:1) e as correspondentes massas	91
Tabela 6 – Porcentagem de inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> das frações obtidas da partição acetato de etila de <i>Momordica charantia</i> – FACMC na concentração de 6,25 µg/mL	93
Tabela 7 – Massas das subfrações obtidas do fracionamento da fração FACMC-F7	94
Tabela 8 – Porcentagem de inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> das frações FACMC-F7/F1 a F11 de <i>Momordica charantia</i> na concentração de 6,25 µg/mL.....	96
Tabela 9 – Dados experimentais de RMN de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) em acetona-d ₆ da substância CC1 e da substância 25-metóxi-3β,7β-diidroxicucurbita-5,23(E)-dien-19-al em piridina-d ₅ (FATOPE <i>et al.</i> ; 1990).....	101
Tabela 10 – Dados experimentais de RMN de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) em metanol-d ₄ da substância CC2 e da substância 3β,7β,25-triidroxicucurbita-5,23(E)-dien-19-al em piridina-d ₅ (FATOPE <i>et al.</i> ; 1990).....	103
Tabela 11 – Dados experimentais de RMN de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) em acetona-d ₆ dos dois estereoisômeros de CC3 e dos isômeros (19 <i>R</i> ,23 <i>E</i>) e (19 <i>S</i> ,23 <i>E</i>)-5β,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3β-ol (KIMURA <i>et al.</i> ; 2005; MURAKAMI <i>et al.</i> ; 2001; OKABE; MIYAHARA; YAMAUCHI; 1982).....	108
Tabela 12 – Dados experimentais de RMN de ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) em acetona-d ₆ dos dois estereoisômeros de CC5 e do isômero (19 <i>R</i> ,23 <i>E</i>)-5β,19-epóxi-19,-metoxicucurbita-6,23-dien-3,25-diol (KIMURA <i>et al.</i> ; 2005; MURAKAMI <i>et al.</i> ; 2001; OKABE; MIYAHARA; YAMAUCHI; 1982).	118
Tabela 13 – Substâncias isoladas do fracionamento biomonitorado por atividade antileishmania de <i>Momordica charantia</i> L., suas respectivas massas e CI ₅₀ das atividades antipromastigotas de <i>L. amazonensis</i>	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de drogas obtidas de plantas.....	19
Figura 2 – Compostos naturais e sintéticos: Exemplos de diversidade estrutural	21
Figura 3 – Os biomas brasileiros.....	29
Figura 4 – Distribuição geográfica das leishmanioses.....	34
Figura 5 – Densidade de casos e circuitos de produção de LT por município. Brasil, 2005 a 2007 e casos em 2008	35
Figura 6 – Casos de LT e percentuais, segundo região de residência. Brasil, 2000 a 2008.....	36
Figura 7 – Casos e incidência de leishmaniose visceral, Brasil 1999 a 2008*	36
Figura 8 – Estratificação dos casos de LV no Brasil, 2006 a 2008.....	37
Figura 9 – Formas de <i>Leishmania</i> spp. Forma amastigota (A) e forma promastigota (B).....	39
Figura 10 – Fêmea ingurgitada de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	39
Figura 11 – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	41
Figura 12 – Quadro com as modalidades de Leishmanioses no Brasil e seus agentes etiológicos.....	43
Figura 13 – Principais sinais clínicos das leishmanioses observados em humanos.....	45
Figura 14 – Estruturas dos principais compostos de antimônio pentavalentes	46
Figura 15 – Estrutura do isetionato de pentamidina	47
Figura 16 – Estrutura da anfotericina B.....	47
Figura 17 – Estrutura da miltefosina.....	48
Figura 18 – Estrutura da paromomicina	49
Figura 19 – Estruturas de alguns alcaloides que apresentaram atividade anti- <i>Leishmania</i>	53
Figura 20 – Estruturas de alguns triterpenos com atividade anti- <i>Leishmania</i>	54
Figura 21 – Estruturas da geraniina (A) e da licochalcona A (B).....	55
Figura 22 – Fotos da planta <i>Momordica charantia</i> L. (melão-de-são-caetano)	57
Figura 23 – Exemplos de compostos isolados de <i>Momordica charantia</i> L.	59
Figura 24 – Estrutura da momordicatina	61
Figura 25 – Esqueleto cucurbitano.....	62
Figura 26 – Fracionamento biomonitorado por ensaio antileishmania do extrato bruto etanólico de <i>Momordica charantia</i> (EBMC) para obtenção de substância bioativa	78
Figura 27 – Fracionamento e obtenção de substâncias puras de <i>Momordica</i> <i>charantia</i> , denominadas de CC1 a CC5.....	79

Figura 29 – Atividade anti- <i>Leishmania</i> das frações obtidas da partição acetato de etila (FAcMC) de <i>Momordica charantia</i>	92
Figura 30 – Gráfico de dispersão das frações FAcMC-F1 a F14 da fração acetato de etila de <i>Momordica charantia</i>	93
Figura 31 – Atividade anti- <i>Leishmania</i> das subfrações obtidas do fracionamento de Fração FAcMC-F7	95
Figura 32 – Gráfico de dispersão das frações FAcMC-F7/F1 a F11	96
Figura 33 – Atividade anti-amastigota da fração acetato de etila (FAcMC) e sua subfração F7 (FAcMC-F7) de <i>Momordica charantia</i>	97
Figura 34 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz – Acetona-d ₆) da substância CC1	99
Figura 35 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz – Acetona-d ₆) da substância CC1	100
Figura 36 – Espectro de DEPT 135° (75 MHz – Acetona-d ₆) da substância CC1 ...	100
Figura 37 – Estrutura química da CC1	102
Figura 38 – Estrutura química da CC2	102
Figura 39 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz – Metanol-d ₄) da substância CC2	104
Figura 40 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz – Metanol-d ₄) da substância CC2.....	104
Figura 41 – Integrações dos sinais em δ 5,18 (H-19, majoritário) e em δ 4,91 (H-19, minoritário) da amostra CC3	106
Figura 42 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz – Acetona-d ₆) da amostra CC3.....	106
Figura 43 – Estrutura química de CC3	107
Figura 44 – Estruturas dos diastereoisômeros 19- <i>R</i> e 19- <i>S</i> de CC3.....	107
Figura 45 – Espectro ¹ H – ¹ H COSY, 300 MHz, da CC3 (visão geral)	111
Figura 46 – Espectro ¹ H – ¹ H COSY, 300 MHz, da CC3 (ampliação da região em destaque da Figura 45)	112
Figura 47 – Espectro ¹ H – ¹ H NOESY, 300 MHz, da CC3 (visão geral)	113
Figura 48 – Espectro ¹ H – ¹ H NOESY, 300 MHz, da CC3 (ampliação da região em destaque da Figura 47)	114
Figura 49 – Visão tridimensional dos estereoisômeros 19- <i>R</i> (A) e 19- <i>S</i> (B) de CC3	115
Figura 50 – Espectro de RMN de ¹ H de CC5, destacando as integrações dos sinais em δ 4,70 (H-19, majoritário) e em δ 4,42 (H-19, minoritário) da amostra CC5	116
Figura 51 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz – acetona d ₆) da amostra CC5	117
Figura 52 – Estruturas dos diastereoisômeros 19- <i>R</i> e 19- <i>S</i> de CC5.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstron
ACN	Acetonitrila
AGRAER/MS	Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural do Estado de Mato Grosso do Sul
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butilhidroxitolueno (antioxidante)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CI ₅₀	Concentração Inibitória necessária para inibir 50% de um parâmetro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT 135°	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135° Angle
DMSO	Dimestilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil (radical livre)
EBMC	Extrato Bruto Etanólico de <i>Momordica charantia</i>
FAcMC	Fração Aceto de Etila de <i>Momordica charantia</i>
FHMC	Fração Hexânica de <i>Momordica charantia</i>
FHMMC	Fração Hidrometanólica de <i>Momordica charantia</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperarizaetanossulfônico (tampão)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz – expressa em termos de ciclos por segundo a frequência de um evento
J	Constante de acoplamento spin-spin
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MHz	Megahertz

MPOS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico (tampão)
MTT	Dimetil Tiazolil Difenil Tetrazolium
NME	New Molecular Entities
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de próton
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USFDA	Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamentos químicos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 <i>Produtos naturais e a pesquisa de substâncias bioativas</i>	18
2.1.1 Plantas como fonte de drogas	18
2.1.2 O conhecimento tradicional na descoberta de novos agentes terapêuticos....	22
2.1.3 Bioensaios.....	24
2.2 <i>Cerrado e as plantas medicinais da região</i>	28
2.2.1 O Cerrado, suas características e sua biodiversidade	28
2.2.2 Estudos etnobotânicos das espécies medicinais do Cerrado.....	30
2.3 <i>Leishmanioses</i>	33
2.3.1 Epidemiologia.....	33
2.3.2 O parasito e seu ciclo de vida	38
<u>2.3.2.1 Leishmania amazonensis</u>	42
2.3.3 Aspectos clínicos em humanos	43
2.3.4 Tratamento	45
2.4 <i>Produtos naturais com atividade anti-Leishmania</i>	50
2.5 <i>Momordica charantia Linn</i>	56
2.5.1 Características botânicas, farmacológicas e químicas	56
2.5.2 Cucurbitacinas.....	61
3 OBJETIVOS	63
3.1 <i>Objetivos gerais</i>	63
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	63
4 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1 <i>Coleta e identificação do material vegetal</i>	64
4.2 <i>Preparo dos extratos</i>	66
4.3 <i>Avaliação biológica dos extratos</i>	66
4.3.1 Ensaio de atividade antibacteriana.....	67
4.3.2 Ensaio de atividade antifúngica.....	68
4.3.3 Ensaio de atividade anti- <i>Leishmania</i>	69
<u>4.3.3.1 Ensaio de atividade anti-Leishmania em promastigotas</u>	69
<u>4.3.3.2 Ensaio de atividade anti-Leishmania em amastigota</u>	70

4.3.4 Ensaio de a citotoxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	71
4.3.5 Ensaio de atividade antirradicalar.....	72
4.4 <i>Determinação quantitativa de taninos</i>	73
4.5 <i>Estudo químico biomonitorado</i>	74
4.5.1 Partição e fracionamento do extrato bruto de <i>M. charantia</i>	74
4.5.2 Fracionamento e purificação da substância CC1	75
4.5.3 Fracionamento e purificação da substância CC2	75
4.5.4 Fracionamento e purificação das substâncias CC3 a CC5	76
4.5.5 Identificação estrutural das substâncias isoladas com atividade anti- <i>Leishmania</i>	76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.1 <i>Coleta e identificação do material vegetal</i>	80
5.2 <i>Preparo dos extratos</i>	84
5.3 <i>Avaliação biológica dos extratos</i>	84
5.4 <i>Estudo químico biomonitorado</i>	90
5.4.1 Fracionamento e avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> das frações obtidas do extrato de <i>Momordica charantia</i>	90
5.4.2 Avaliação da atividade antiamastigota	97
5.4.3 Identificação estrutural das substâncias isoladas com atividade anti- <i>Leishmania</i> ..	98
<u>5.4.3.1 Identificação estrutural da substância CC1</u>	98
<u>5.4.3.2 Identificação estrutural da substância CC2</u>	102
<u>5.4.3.3 Identificação estrutural da substância CC3</u>	105
<u>5.4.3.4 Identificação estrutural da substância CC5</u>	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
6 CONCLUSÃO.....	123
REFERÊNCIAS.....	125

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais são altamente atrativos em função da grande variedade estrutural que exibem, de potentes atividades biológicas e almejados perfis farmacológicos. Historicamente, produtos naturais têm sido a fonte de novas drogas (BOLDI; 2004), tanto que entre 1981 e 2002, das 1.031 novas entidades químicas aprovadas como drogas pelo órgão governamental dos Estados Unidos - Food and Drug Administration (FDA), 5% foram produtos naturais e outros 23% foram moléculas derivadas desses produtos (NEWMAN; CRAGG; SNADER; 2003).

Há várias ferramentas para a seleção de plantas para o desenvolvimento de pesquisa de produtos naturais, as quais incluem o uso do conhecimento tradicional. Esta abordagem tem se mostrado capaz de gerar medicamentos e classes de drogas que estão na lista dos mais rentáveis do mercado, tanto que a indústria farmacêutica, apesar dos avanços em biotecnologia e química sintética, continua renovando sobre descobertas do passado, que tiveram origem no conhecimento do uso tradicional de plantas (DUTFIELD; 2010).

Por outro lado, as doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitos ainda são uma das principais ameaças à saúde pública, apesar do enorme progresso na medicina (COS *et al.*; 2006). Dentre essas, destacam-se as leishmanioses (tegumentar e visceral) que, segundo o último relatório da Organização Mundial da Saúde, cerca de 350 milhões de pessoas, em 88 países, habitam áreas onde existe o risco de contrair a doença. Cerca de 14 milhões de pessoas são atingidas pelas leishmanioses e aproximadamente surgem 2 milhões de novos casos a cada ano (WHO; 2007). Aproximadamente 90% de todos os casos de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão; 90% dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru e 90% de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (BASANO; CAMARGO; 2004).

Leishmaniose é uma doença tropical causada por protozoários do gênero *Leishmania* e apresenta um espectro amplo de tipos clínicos, desde formas cutâneas a visceral, dependendo dos fatores de virulência do parasito à resposta imunológica do hospedeiro (GRIMALDI; TESH; 1993). Embora seja uma doença muito antiga e existam muitos estudos que buscam novos agentes terapêuticos, a

primeira linha quimioterápica ainda é baseada nos compostos de antimônio pentavalente desenvolvidos há mais de cinquenta anos, e as drogas alternativas disponíveis hoje, como a anfotericina B e pentamidina, apresentam vários efeitos adversos (SINGH; SIVAKUMAR; 2004).

O Brasil é um dos principais países em diversidade biológica do mundo e aliado a isso tem uma fonte riquíssima de conhecimento tradicional do uso de plantas (ELISABETSKY; WANNMACHER; 1993). Além disso, o país possui diversos biomas de grande abundância de plantas e diversas comunidades tradicionais que detêm esses conhecimentos.

Dentro desse contexto, encontra-se o bioma cerrado, um complexo vegetacional de grande diversidade biológica, que ocupa extensa área territorial na região central do país, com grande concentração populacional (RODRIGUES; CARVALHO; 2001), cujos estudos voltados para identificação de plantas úteis para fins medicamentosos entre outros são ainda escassos (GUARIM NETO; MORAIS; 2003).

Deve-se ressaltar também que a Região Centro-Oeste apresentou o terceiro maior percentual de casos (15,9%) de leishmaniose tegumentar americana do país, no período de 2000 a 2008, e que em 2008 foram registrados casos autóctones de leishmaniose visceral (LV) em 20 unidades federadas de quatro regiões do Brasil (BRASIL; 2010), sendo que em 2007 dos 2.897 casos de LV no país, o município de Campo Grande (MS) contribuiu com 6,2% desses casos (ALVES; 2009).

Verifica-se, portanto, a necessidade de buscar soluções para os problemas de saúde do Brasil e em especial da região Centro-Oeste, como as leishmanioses, utilizando-se de ferramentas disponíveis na própria região, tendo em vista a sua riqueza botânica que aliada ao conhecimento popular tornam-se capazes de gerar produtos de real aplicação.

Por essas razões o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biológico de plantas utilizadas pela população para fins medicamentosos, buscando substâncias com atividades farmacológicas, em especial, leishmanicida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Produtos naturais e a pesquisa de substâncias bioativas*

2.1.1 Plantas como fonte de drogas

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e por muito tempo, produtos de origem mineral, vegetal e animal constituíram a base de drogas da humanidade. Com o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica houve uma marcante preferência por produtos sintéticos em detrimento dos produtos naturais. As razões para tal preferência são de ordem econômica, produtiva e gerencial; no entanto, em torno de 25% das drogas prescritas no mundo todo advêm de plantas, e das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO), 11% são exclusivamente de plantas e um número significativo de drogas sintéticas são obtidas a partir de precursores naturais (RATES; 2001).

Assim, os produtos naturais ainda são a principal fonte de inovação de agentes terapêuticos das doenças infecciosas (bactérias e fungos), bem como para câncer, distúrbios lipídicos e imunomodulação (ALTMANN; 2001), tanto que, 60% das drogas antineoplásicas e 75% para as doenças infecciosas são derivadas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER; 2003).

Muitos são os exemplos de drogas obtidas de plantas e que se encontram até hoje na terapêutica, como atropina de *Atropa belladonna*, morfina e codeína de *Papaver somniferum*, a digoxina de *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp. (Figura 1); e outras descobertas mais recentemente, como é o caso de vincristina e vimblastina (Figura 1) de *Catharanthus roseus* (SHU; 1998). Deve-se ressaltar que a síntese da maioria desses compostos é economicamente inviável, sendo, portanto, obtidos de plantas nativas ou cultivadas (RATES; 2001).

Como os produtos naturais são uma fonte atrativa de estruturas variadas que apresentam atividades biológicas potentes e desejáveis perfis farmacológicos, os compostos naturais podem ser também os protótipos para o desenho e o planejamento racional de novas drogas, desenvolvimento de sínteses biomiméticas

e descoberta de novas propriedades terapêuticas até então não atribuídas aos compostos já conhecidos (BOLDI; 2004).

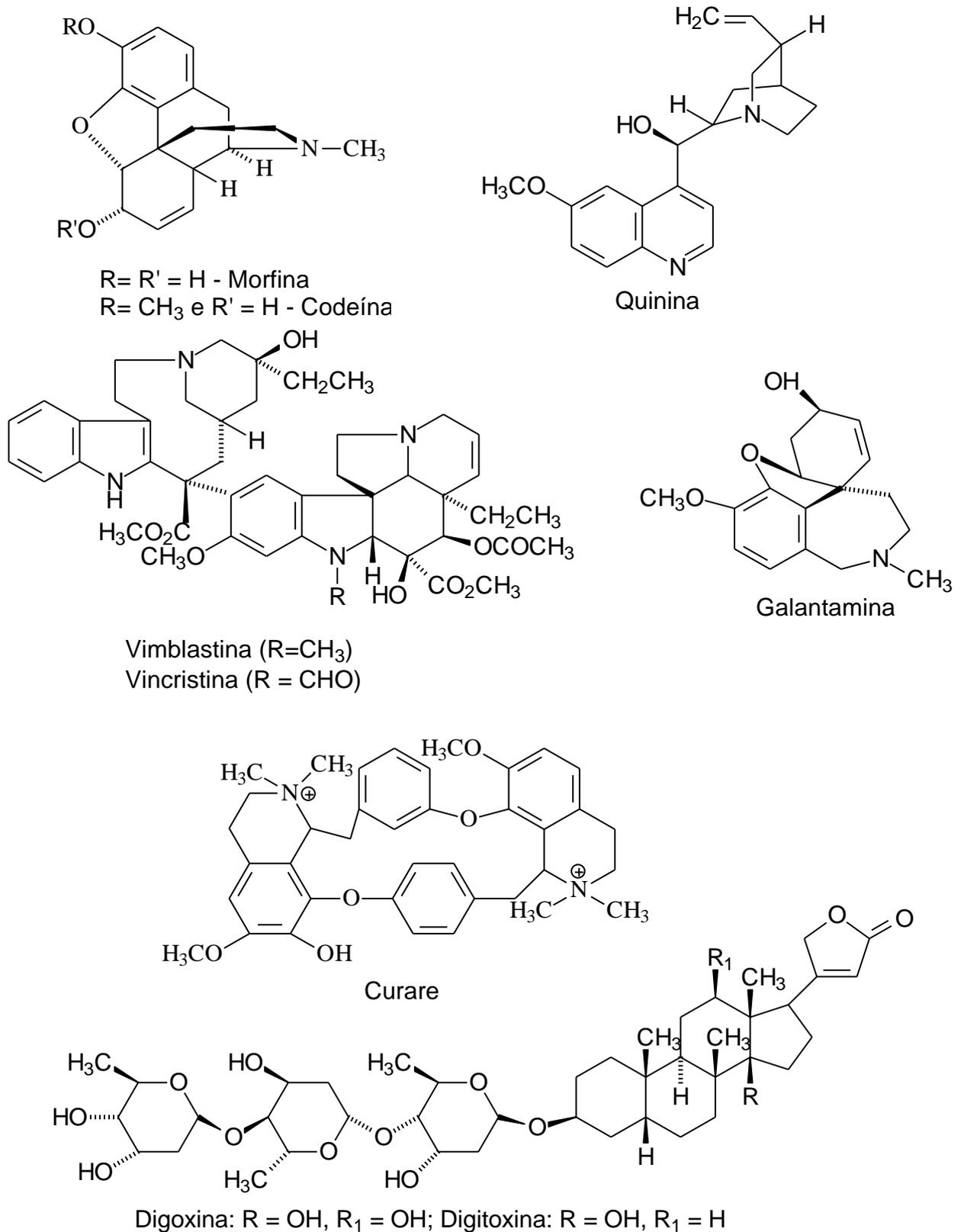


Figura 1 – Exemplos de drogas obtidas de plantas
 Fonte – Barreiro; Fraga (2001); Patrick (2001)

Os produtos naturais apresentam determinantes arquitetônicos que os diferenciam dos compostos sintéticos e que os tornam peça central nas estratégias de pesquisa das companhias farmacêuticas. Observando a Figura 2 A, verifica-se que a vancomicina e a estaurosporina, que são produtos de origem natural, apresentam muito mais centros esterogênicos e maior complexidade estrutural que os compostos sintéticos como o fluoxetina (prozac) e sildenafil (viagra). Outras diferenças importantes, os naturais apresentam muito mais carbono, hidrogênio e oxigênio e menos nitrogênio e outros elementos que os sintéticos; apresentam massa que ultrapassa os 500 daltons e maior polaridade, o que dificulta sua biodisponibilidade oral.

Tanto os produtos naturais quanto os sintéticos apresentam rigidez e restrição conformacional (anéis macrocíclicos ou fundidos), importantes para a interação com biomoléculas receptoras, e os produtos naturais apresentam grupos ou precursores de tais grupos altamente reativos, como a leinamicina (Figura 2 B) com o seu grupo 1,3-ditiano-1-óxido que é um agente antitumoral alquilante do DNA por meio da ativação do grupo tiol, formando o intermediário episulfonium (CLARDY; WALSH; 2004).

Acrescenta-se o fato que muitos dos compostos naturais, como a muscarina, fisostigmina, canabinoides, colchicina e outros são importantes ferramentas usadas em estudos farmacológicos, fisiológicos e bioquímicos (WILLIAMSON; OKPAKO; EVANS; 1996).

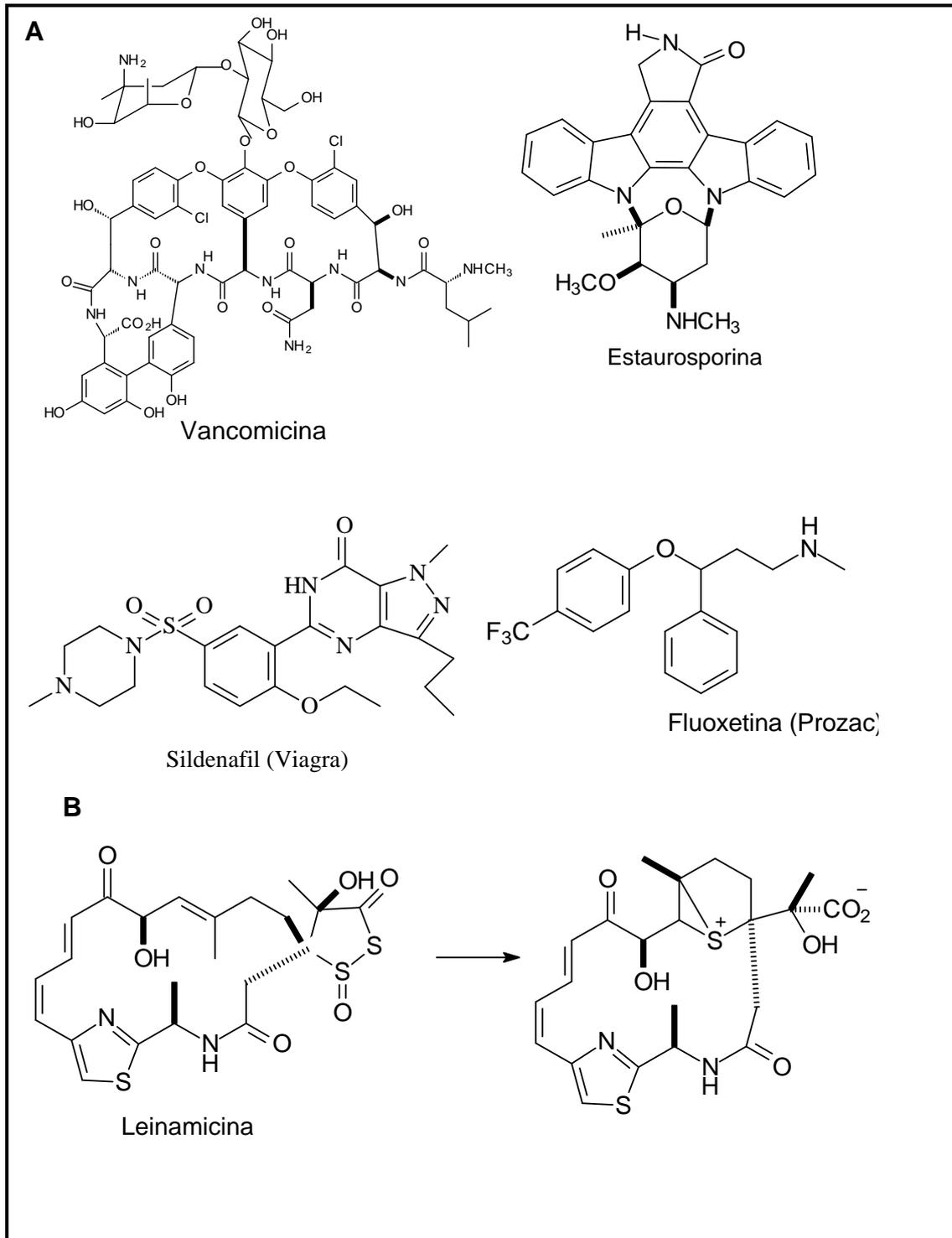


Figura 2 – Compostos naturais e sintéticos: Exemplos de diversidade estrutural
 A: Estrutura da vancomicina, estaurosporina, sildenafil (viagra) e fluoxetina (prozac); B: leinamicina formando o intermediário episulfonium
 Fonte – Clardy; Walsh (2004)

2.1.2 O conhecimento tradicional na descoberta de novos agentes terapêuticos

As plantas têm sido usadas como medicamentos por milhares de anos. No início, esse uso era feito com as drogas *in natura*, na forma de tinturas, chás, emplastros, pós, dentre outras. Esse conhecimento de uma planta específica, seu modo de aplicação para determinada enfermidade, obtido pela observação e experimentação era, então, passado oralmente às pessoas e às gerações e, eventualmente, tais informações eram coletadas e registradas em livros específicos (BALUNAS; KINGHORN; 2005).

Em épocas mais recentes, o uso de plantas como medicamentos tem envolvido o isolamento dos compostos ativos, começando com a morfina isolada do ópio no início do século 19 (KINGHORN; 2001). A partir de então se passou a ter drogas descobertas de plantas medicinais, com posterior isolamento de seus princípios ativos, como a codeína, digitoxina, cocaína em adição à própria morfina, alguns até hoje em uso na terapêutica (BUTLER; 2004; NEWMAN; CRAGG; SNADER; 2000).

Dessa forma, tem-se a etnobotânica como a ciência que investiga a relação entre as pessoas e as plantas, geralmente baseada na detalhada observação e estudo que uma sociedade faz uso dessas em toda a sua complexidade, incluindo todas as crenças e práticas culturais associadas com esse uso, não focando apenas nas plantas medicinais (HEINRICH; BREMNER; 2006). Já a etnofarmacologia que vem de etno (= cultura, pessoas) e farmacologia (= estudo dos fármacos) é a intersecção da etnografia médica e ação biológica terapêutica, isto é, uma exploração transdisciplinar que abrange as ciências biológicas e sociais (ETKIN; ELISABETSKY; 2005).

A contribuição da pesquisa etnobotânica na descoberta de novas drogas ou novos protótipos não deve ser ignorada ou considerada não relevante, pois descobertas farmacêuticas nas últimas décadas foram baseadas na avaliação sistemática de plantas superiores, como o campotecam e seus derivados, podofilotoxina, vincristina e taxol, todos agentes anticancerígenos e a galantamina (Figura 1) usada para a doença de Alzheimer (HEINRICH; TEOH; 2004).

Há pelo menos três razões pelas quais o conhecimento tradicional é tão importante como ferramenta de busca de novas substâncias bioativas.

Primeira, porque os caminhos de aprendizagem do conhecimento tradicional que levaram a alguns medicamentos e classes de drogas altamente rentáveis

podem ser tão longos e sinuosos que se tornam difíceis de percorrê-los. Redescobrimo estas trilhas pode-se mostrar, no passado, conexões com o conhecimento tradicional de alguns dos medicamentos mais vendidos hoje (DUTFIELD; 2010).

Como exemplo tem-se o curare (Figura 1), nome originalmente dado a certas preparações de plantas da América do Sul que inspirou a descoberta e o desenvolvimento dos melhores relaxantes musculares utilizados em cirurgias; por exemplo o pancurônio, vecurônio; bem como, ao usarem o curare como uma ferramenta de pesquisa, demonstraram o papel essencial dos produtos químicos na canalização de mensagens dentro do cérebro e deste para o resto do corpo, aumentando assim radicalmente a nossa compreensão da fisiologia e função cerebral. Isto levou diretamente para o desenvolvimento posterior de numerosas drogas “spin-off”, incluindo os β -bloqueadores, antidepressivos como o Prozac e tratamentos para a doença de Parkinson, asma e diarreia (FELDMAN; 2009).

Em segundo lugar, porque a indústria farmacêutica, considerando todos os seus investimentos e conhecimentos adquiridos em novas tecnologias biológicas e química sintética, é surpreendentemente dependente da reengenharia (ou 'renovação') de descobertas passadas, algumas das quais tiveram definitivamente origem do conhecimento tradicional (DUTFIELD; 2010).

Não é segredo que o número de novas entidades químicas (New Molecular Entities – NMEs) que entram no mercado tem sido decepcionante nas últimas décadas, apesar da constante investigação e crescentes gastos em desenvolvimento; assim como já foi dito “a base mais fecunda para a descoberta de uma nova droga é começar com uma velha droga” (RAJU; 2000). Das 1.264 aplicações de novas drogas submetidas ao FDA entre 1993 a 2004, 68% não eram NMEs e das 961 aprovadas, 67% também não eram NMEs (US-GAO; 2006). Desde que John Vane trabalhou o modo de ação da aspirina, em 1971, já foram encontradas diversas aplicações terapêuticas que vão além de aliviar a dor e febre. De fato, patentes relativas a novos usos da aspirina ainda estão sendo concedidas (DUTFIELD; 2010).

A terceira razão é que a investigação de produtos naturais continua, apesar da promessa de novas substâncias químicas, biotecnologia e triagem, absolutamente indispensável para a indústria. Uma investigação empírica detalhada por Newman e Cragg do National Cancer Institute – EUA (NCI) demonstra de forma convincente

que, conforme indicado em estudos anteriores, “produtos naturais desempenham um papel preponderante na descoberta de pistas para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças humanas”(NEWMAN; CRAGG; 2007).

Portanto, o uso do conhecimento etnofarmacológico é uma via atrativa para reduzir o empirismo e aumentar a probabilidade de sucesso nos esforços de encontrar novas drogas (PATWARDHAN; 2005).

2.1.3 Bioensaios

Nos últimos 20 anos, os estudos etnofarmacológicos têm cada vez mais incluído bioensaios *in vitro* como um substituto para experimentos em animais. Isto é parcialmente devido aos problemas éticos e comerciais do uso de animais, mas também à inadequação de tais práticas para o fracionamento biomonitorado dos compostos responsáveis por qualquer atividade observada (HOUGHTON; 2000).

Os bioensaios podem ser definidos como aqueles testes que são usados para detectar a atividade biológica de um extrato ou substância isolada, a partir de um organismo vivo (HOUGHTON; 2000). Os bioensaios preliminares são geralmente projetados para rápida triagem de um grande número de produtos ou de extratos, por isso eles são simples, fáceis de implementar e produzem resultados rápidos e de preferência a baixo custo (COS *et al.*; 2006).

Assim, a validação e seleção de testes de triagem primária são fundamentais para garantir a escolha de extratos ou moléculas com ação farmacológica relevantes e dignos de acompanhamento (COS *et al.*; 2006). Compostos ou extratos com uma atividade específica e doses não-tóxicas, os chamados "hits", apresentam a necessidade de serem avaliados posteriormente em bioensaios *in vitro* e em modelos de animais especializados para definir o “status” de protótipos. Em seguida, avançados estudos das propriedades cinéticas e toxicológicas finalmente os definirão como reais candidatos a fármacos (VERKMAN; 2004).

Apesar do uso difundido de ensaios *in vitro*, é importante considerar algumas de suas limitações. Um único modelo desse tipo de ensaio dificilmente representará todos os aspectos patológicos e fisiológicos de uma doença e, portanto, o uso de uma bateria de testes é preferível, uma vez que vários e complexos mecanismos estão envolvidos. Entretanto, mesmo com uma variedade de testes, é geralmente

reconhecido que os testes *in vitro* são muito reducionistas para extrapolar seus resultados a evidências de eficácia clínica, e dessa forma, os testes em animais e eventualmente, os ensaios clínicos devem ser realizados (HOUGHTON *et al.*; 2005).

Apesar desses aspectos negativos, os bioensaios *in vitro* resultaram na descoberta de alguns novos agentes terapêuticos e estão continuamente revelando compostos da medicina tradicional, que ajudam a explicar o seu uso. Eles podem ser importantes também na prestação de provas dos modos de ação dos produtos que têm mostrado atividade clínica ou *in vivo* (HOUGHTON *et al.*; 2005).

Sistemas convencionais de pesquisa que utilizam todo um organismo têm vantagens consideráveis sobre as opções de destino orientado, já que tais sistemas envolvem todos os alvos moleculares e consideram ainda os fenômenos da biodisponibilidade. Com demasiada frequência, os compostos que são potentes inibidores de enzimas *in vitro*, em última análise não confirmam essa ação contra o organismo todo, porque, entre outras razões, eles não passam pela membrana celular (COS *et al.*; 2006).

Por essas razões os modelos *in vitro*, usando todo o organismo são o “padrão ouro” e devem ser usados sempre que possível. Importante notar é que qualquer ação da droga sobre um micro-organismo deve ser discriminada de toxicidade celular inespecífica, sendo necessária a inclusão de uma avaliação paralela em linhas de células do hospedeiro (avaliação da citotoxicidade) e/ou pela inclusão de outras telas microbianas, abrangendo um grupo de bactérias, fungos, parasitas e vírus (COS *et al.*; 2006).

Por outro lado, as doenças infecciosas são responsáveis por mais de 13 milhões de mortes por ano, incluindo quase dois terços de mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade (WHO/OMS; 1999). A grande maioria dessas mortes ocorre em países em desenvolvimento. As infecções respiratórias agudas, doenças diarreicas, sarampo, AIDS, malária e tuberculose são responsáveis por mais de 85% da mortalidade em todo o mundo. As doenças infecciosas não reconhecem fronteiras e representam uma ameaça significativa para as pessoas em todas as partes do mundo. Nos últimos anos, essa ameaça tem crescido em volume e complexidade com o surgimento de novas doenças e o ressurgimento de outras consideradas em declínio (MEMISH; VENKATESH; SHIBL; 2003).

Diante de tais considerações, os bioensaios mais difundidos são os que avaliam a citotoxicidade pelo ensaio em *Artemia salina* (brine shrimp lethality – BST),

as atividades antibacteriana e antifúngica pelo método de microdiluição, antileishmania em promastigotas, além do ensaio de atividade antirradicalar.

Artemia salina L. (Artemiidae) é um camarão, componente da fauna de invertebrados dos ecossistemas aquáticos marinhos. Ele desempenha um importante papel no fluxo de energia da cadeia alimentar (PARRA *et al.*; 2001) e pode ser utilizado em bioensaios de laboratório, a fim de determinar a toxicidade através da estimativa da concentração letal média (CL₅₀) (LEWAN; ANDERSON; MORALES-GOMEZ; 1992), para uma série de toxinas e extratos vegetais (MEYER *et al.*; 1982). Esse método tem sido usado em pesquisas sobre plantas medicinais realizadas em diferentes países para avaliar a toxicidade e outras ações biológicas, que em alguns casos, foram relacionadas a estudos farmacológicos realizados para diferentes compostos químicos (FUMARAL; GARCHITORENA; 1996; MATTHEWS; 1995).

Atualmente os métodos disponíveis de estudo para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais situam-se em três grupos: bioautográfico, difusão e diluição. Os métodos de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas uma vez que só vão dizer a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Entretanto, os métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, tendo em vista que determinam a concentração inibitória mínima – CIM (VANDEN-BERGHE; VLIETINCK; 1991). Em geral, os métodos de diluição são úteis para testar extratos e substâncias polares e apolares e para determinação da CIM e a concentração mínima bactericida ou fungicida – CMB/CMF (COS *et al.*; 2006) e as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI são usadas como referência.

Contrariamente aos ensaios de atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral que são baseados em condições e parâmetros comuns, bioensaios com parasitos são mais exclusivos, uma vez que tendem a ser altamente espécie-específicos (MAES *et al.*; 2004). Tanto para a triagem de drogas com atividade anti-*Leishmania* quanto para a determinação da suscetibilidade de cepas de isolados clínicos, diferentes métodos laboratoriais que incidem sobre as promastigotas, amastigotas axênicas ou na fase amastigota intracelular estão sendo usados (VERMEERSCH *et al.*; 2009). Enquanto promastigotas são facilmente cultivadas em suspensão, amastigotas são mais difíceis para manter *in vitro*, pois exigem macrófagos como células hospedeiras para atender ao ambiente altamente ácido intracelular

(FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO; 2004). O cultivo axênico de amastigotas vem tendo sucesso, podendo tornar um método promissor para a triagem e estudos do modo de ação de drogas (SERENO; LEMESRE; 1997; TEIXEIRA *et al.*; 2002).

Os antioxidantes ajudam a lidar com o estresse oxidativo dos organismos causado pelos radicais livres, os quais são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados o que as tornam altamente instáveis e causadoras de danos a outras moléculas pela extração de seus elétrons para atingir a estabilidade (ALI *et al.*; 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas *in vivo*, tais como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila são continuamente produzidas no corpo humano e reguladas pelas superóxido dismutase, glutationala peroxidase e catalase endógenas, mas devido ao excesso de produção de espécies reativas, induzida pela exposição a substâncias oxidantes externas ou uma falha nos mecanismos de defesa, os danos às estruturas de células, DNA, lipídios e proteínas (VALKO *et al.*; 2006) induzem o aumento do risco para mais de 30 diferentes doenças. O exemplo mais notório são as doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (SMITH *et al.*; 1996; SMITH *et al.*; 2000), o comprometimento cognitivo leve (GUIDI *et al.*; 2006) e a doença de Parkinson (BOLTON *et al.*; 2000).

Vários métodos são usados para medir a atividade antioxidante de um material biológico. Os mais utilizados são os que envolvem radicais de natureza cromógena que estimulam a redução de espécies de oxigênio. A presença de antioxidantes leva ao desaparecimento desses radicais cromógenos. Esses métodos são muito populares devido à facilidade, rapidez e sensibilidade e os mais amplamente realizados são os métodos de sequestro de radicais 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) – ABTS e 1,1-difenil-2-picrilidrazil – DPPH (ALI *et al.*; 2008).

O método do DPPH é baseado na redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) pelos antioxidantes, que produz uma diminuição da absorbância a 515 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, a forma reduzida do radical é gerada acompanhada de perda de cor (BRANDWILLIAMS; CUVELIER; BERSET; 1995; SANCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO; 1998).

Assim, diferentes metodologias de seleção estão disponíveis para identificar a principal atividade farmacológica de produtos sintéticos e/ou naturais. A opção

dependerá em grande parte da natureza específica da doença a ser alvo e da disponibilidade de técnicas de laboratório biologicamente validadas. Sempre que possível, as descobertas de atividades em um nível particular de triagem devem ser confirmadas através de um modelo de avaliação do nível imediatamente superior. Por exemplo, uma boa atividade *in vitro* contra todo o organismo deve, então, ser associada a um teste de confirmação em um modelo animal (COS *et al.*; 2006).

2.2 Cerrado e as plantas medicinais da região

2.2.1 O Cerrado, suas características e sua biodiversidade

Aproximadamente 70% das espécies do mundo ocorrem em apenas 12 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Peru e Zaire. O Brasil tem uma posição de destaque em biodiversidade, pois contém duas extensas áreas consideradas “hotspots” de biodiversidade, isto é áreas com concentrações excepcionais de espécies endêmicas e que vem sofrendo perda do seu habitat, sendo a Mata Atlântica no Litoral e o Cerrado do Brasil Central (CARDOSO DA SILVA; BATES; 2002; MYERS *et al.*; 2000).

O Cerrado brasileiro é apontado como grande detentor de diversidade biológica, sendo a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo, especialmente quando se consideram as espécies lenhosas. Estudos têm catalogado mais de 6.671 táxons nativos, distribuídos em 170 famílias e 1.140 gêneros (MENDONÇA *et al.*; 2006).

A palavra cerrado tem origem espanhola e significa fechado ou vegetação densa (RIBEIRO; WALTER; 1998) e convencionou-se chamar de cerrado o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (EITEN; 1993). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia. Ocupa 21% do território nacional (Figura 3) e é considerado a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG; 2002).



Figura 3 – Os biomas brasileiros

Fonte – IBGE: www.ibge.gov.br

É possível caracterizar alguns tipos fisionômicos da vegetação predominante no Cerrado: os campos limpos, onde a vegetação é rasteira com ausência de árvores e arbustos; os campos sujos, de vegetação campestre onde as plantas rasteiras predominam; o cerradão, vegetação com um grande número de árvores (matas) e o cerrado senso restrito, que ocupa uma posição intermediária entre campo sujo e o cerradão. As veredas, os palmeirais e os campos rupestres ocorrem em menor frequência; já as matas de galerias e ciliares encontram-se ao longo dos cursos d'água (PIRES; 1999).

A região central do Cerrado distribui as águas para as bacias do Amazonas, do São Francisco e do Prata, e sua abundância hídrica exerce fator importante na vegetação (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; 1998). O clima dessa região é estacional, onde um período chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por um período seco, de abril a setembro. Os remanescentes de Cerrado que existem nos dias de hoje desenvolveram-se sobre solos muito antigos, intemperizados, ácidos, depauperados de nutrientes, mas que possuem concentrações elevadas de alumínio (DIAS; 1993). Um fato frequente no Cerrado é o regime de fogo, que pode

ocorrer naturalmente. No entanto, algumas plantas conseguem manter-se devido aos xilopódios, órgãos subterrâneos que lhes servem de proteção. Por isso, a ideia mais aceita hoje diz que, a origem do Cerrado deve estar na união dos seus fatores constituintes, como as condições climáticas, a vegetação típica, condicionada pelo fogo e pelo tipo de solo, rico em alumínio (ALHO; MARTINS; 1995).

A biodiversidade do Cerrado é elevada, tanto que o número de plantas vasculares é considerado superior àquele encontrado na maioria das regiões do mundo: plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 7.000 espécies (MENDONÇA *et al.*; 1998). Quarenta e quatro por cento da flora é endêmica e existe uma grande diversidade de habitats e alternância de espécies (RATTER; BRIDGEWATER; RIBEIRO; 2003).

Há mais espécimes vegetais em áreas amostrais da Floresta Amazônica que nas do Cerrado, no entanto, a diversidade taxonômica é certamente muito maior no cerrado. Salienta-se que essa dissimilitude do Cerrado é relativa aos táxons mais elevados (gênero, família e ordem), indicando que há maior distanciamento filogenético entre as espécies e maior, portanto, é a diferença e diversidade química entre elas (GOTTLIEB; BORIN; 1994). Por isso, a gama e o potencial de compostos bioativos produzidos pelas espécies do Cerrado seriam maiores que as da Floresta Amazônica (GUARIM NETO; MORAIS; 2003).

Embora o Cerrado mostre um elevado potencial de pesquisas, principalmente em plantas medicinais, torna-se extremamente preocupante o fato de que apenas 20% da área original permanecem como vegetação primária (RITTER; RIBEIRO; MORO; 2010). Existem estimativas indicando que pelo menos 20% das espécies endêmicas e ameaçadas permanecem fora dos parques e reservas existentes (MACHADO *et al.*; 2004), ameaçando a biodiversidade por meio da degradação do solo, dos ecossistemas nativos e a dispersão de espécies exóticas (KLINK; MACHADO; 2005).

2.2.2 Estudos etnobotânicos das espécies medicinais do Cerrado

Os estudos sobre arqueologia no Cerrado informam que a região há muito tempo vem sendo habitada, com evidência de pelo menos há 11 mil anos. Há milhares de anos, o Cerrado, dentro da América do Sul, era a região que melhor

fornecia variedade de frutos comestíveis e outros recursos como lenha, fibras e folhas, permitindo a adaptação de populações humanas que passaram a produzir culturas, em um processo contínuo de adaptação e readaptação entre os humanos e os ambientes de cerrado e floresta (BARBOSA; SCHMITZ; 1998).

Vários pesquisadores vêm estudando a forma de utilização das espécies nativas do Cerrado, procurando mostrar o seu potencial econômico e a possibilidade de seu aproveitamento sustentável (ALMEIDA *et al.*; 1998). Desta forma, tem-se destacado os altos valores de alguns nutrientes em frutas regionais (ALMEIDA; SILVA; 1994; ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO; 1990; RIBEIRO; SILVA; FONSECA; 1992; RIZZINI; MORS; 1976; SIQUEIRA; 1981); o potencial madeireiro de espécies que ocorrem nos ambientes florestais (SILVA; ALMEIDA; 1990); o uso ornamental das “plantas secas” e flores do planalto (BRANDÃO; LACA-BUENDIA; 1991) e o uso de várias espécies na medicina popular (GAVILANES; BRANDÃO; 1992).

A ciência e a imprensa têm descoberto o potencial medicinal do Cerrado, mas este não é novidade para as populações que lá viveram e vivem; a medicina do sertão foi formada pela contribuição da cultura dos povos indígenas, dos colonizadores portugueses, dos escravos africanos e seus descendentes que conhecem, manejam e utilizam uma grande variedade de plantas medicinais daquele bioma (RIBEIRO; 1999).

Alguns trabalhos de levantamento etnobotânico e de revisão bibliográfica sobre plantas medicinais de diversas partes do Cerrado brasileiro apresentam em torno de 509 espécies medicinais (ALVES *et al.*; 2008; GUARIM NETO; MORAIS; 2003; NUNES *et al.*; 2003; RODRIGUES; CARVALHO; 2001; SOUZA; FELFILI; 2006; VILA VERDE; PAULA; CANEIRO; 2003). O trabalho de Guarim Neto e Morais (2003), por exemplo, verificou que essas espécies estão distribuídas em 297 gêneros e 96 famílias. Embora essas pesquisas tenham sido feitas em épocas e/ou locais diferentes, verificam-se muitas confluências sobre as espécies consideradas medicinais pela população, partes utilizadas, suas indicações e forma de preparo.

As famílias com maior número de espécies medicinais são Leguminosae, sendo essa a família com maior número de espécies em todo o bioma Cerrado, representando 15,5% do número de espécies botânicas citadas, se considerar Fabaceae (7%), Caesalpiniaceae (5%) e Mimosaceae (3,5%) como suas sub-famílias, (MENDONÇA *et al.*; 1998), Asteraceae (7%), Bignoniaceae (4,9%), Rubiaceae (3,1%) entre outras (GUARIM NETO; MORAIS; 2003).

Nos diversos trabalhos que abordam as plantas medicinais do Cerrado, verifica-se que algumas espécies apresentam várias e recorrentes citações bibliográficas sobre seu uso pelas populações locais, tais como *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosa/Mimosoideae - barbatimão), *Anemopaegama arvense* (Bignoniaceae - catuaba), *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae/Caesalpinidoideae - jatobá-do-cerrado), *Bidens pilosa* (Asteraceae - picão), *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae - congonha de bugre), *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae - mamacadela), *Baccharis trimera* (Asteraceae - carqueja), entre outras. No entanto, algumas espécies são muito pouco citadas e raras e até nenhum estudo, como *Clavija nutans* (Teophrastaceae – porangaba), *Celtis pubescens* (Ulmaceae - cruzeirinho), *Melancium campestre* (Cucurbitaceae – melancia-do-campo), *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae – velame branco) e outras.

O uso dessas plantas medicinais é diversificado, mas de modo geral são utilizadas como depurativo do sangue, cicatrizantes, em infecções do fígado e dos rins, emenagogo, doenças venéreas, dores estomacais, bronquites, gripes, afecções da pele, dores estomacais, inflamações, contusões, pancadas e diarreias, entre outras (VIEIRA; 1994). As partes mais consumidas são raízes, caules e folhas, sendo incomum o uso de flores, frutos e sementes. Chás ou infusos são recomendados para uso interno e externamente são usados sob a forma de compressas, banhos e gargarejos.

A medicina popular através das plantas é amplamente praticada por raizeiros e nos locais de comercialização de plantas medicinais, apresentando-se em franca expansão (NUNES *et al.*; 2003).

As pessoas tendem a utilizar uma grande diversidade de plantas oriundas de diversos sítios ecológicos naturais ou manejados pelo homem, tais como áreas de vegetação nativa, zonas antropogênicas e totalmente descaracterizadas, e quintais (ALBUQUERQUE; ANDRADE; 2002). A preferência por determinada fonte de recurso pode refletir aspectos sócio-culturais da comunidade (BEGOSI; HANAZAKI; TAMASHIRO; 2002; ESTOMBA; LADIO; LOZADA; 2006) bem como as modificações antrópicas no ambiente (GAZZANEO; DE LUCENA; DE ALBUQUERQUE; 2005).

A OMS tem revelado que a maioria da população mundial, vivendo principalmente em países em desenvolvimento, não tem acesso à medicina

moderna e, conseqüentemente, aos medicamentos sintéticos e fitoterápicos, recorrendo à medicina popular (FARNSWORTH *et al.*; 1985).

Considerando, tanto o potencial taxonômico disponível e a enorme velocidade de extinção de espécies pela destruição de seus ecossistemas, é provável que nem 5% das plantas medicinais sejam adicionadas ao conhecimento disponível antes que sejam extintas (KAPLAN; GOTTLIEB; 1990). Além do mais, a exploração de recursos genéticos de plantas medicinais no Brasil está relacionada, em grande parte, à coleta extensiva e extrativa do material silvestre, com pouquíssimas espécies chegando ao nível de serem cultivadas (VIEIRA; 1994). Portanto, torna-se crescente a preocupação em se estabelecerem espécies de plantas medicinais para pesquisas, suas potencialidades, usos e meios de conservação desses recursos genéticos (RODRIGUES; 1998).

2.3 Leishmanioses

2.3.1 Epidemiologia

Leishmanioses são causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* que se multiplicam em certos vertebrados que atuam como reservatórios da doença, sendo o parasito transmitido ao homem através da picada de flebotomíneos fêmeas previamente alimentados sobre um reservatório infectado (WHO; 2007). A ação da *Leishmania* em humanos depende em grande parte da capacidade de resposta imune do hospedeiro e da virulência da cepa do parasito infectante. Os protozoários deste gênero são capazes de produzir um amplo espectro de doenças em seres humanos, que vão desde infecções assintomáticas até formas desfigurantes como na leishmaniose mucocutânea ou a forma potencialmente fatal da doença visceral ou calazar (GRIMALDI; TESH; 1993).

As leishmanioses são encontradas em quatro continentes e são endêmicas nas regiões tropicais e subtropicais de 88 países (Figura 4). Os flebotomíneos, que são os transmissores da doença, limitam a distribuição geográfica das leishmanioses, devido à suscetibilidade ao clima frio, à sua natureza hematófoga para retirar o sangue de seres humanos ou animais hospedeiros e à sua capacidade de apoiar o desenvolvimento interno de determinadas espécies de *Leishmania*. Há uma

estimativa de que 1,6 milhões de novos casos ocorrem a cada ano, dos quais 500 mil são estimados como viscerais e 1,1 milhão como cutâneos ou mucocutâneos (WHO; 2010).

As leishmanioses constituem um crescente problema de saúde pública, não somente no Brasil, onde são consideradas endemias de interesse prioritário, como em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano. Sua importância levou a Organização Mundial de Saúde a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias no programa de controle da referida instituição (WHO; 1990).

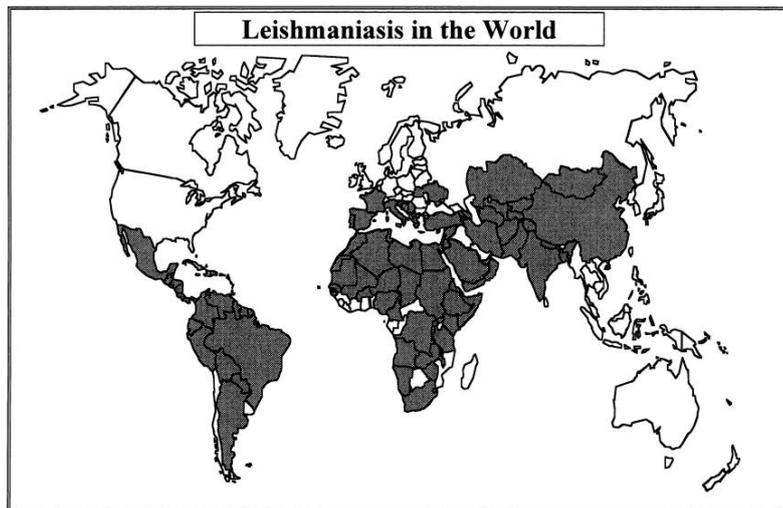


Figura 4 – Distribuição geográfica das leishmanioses
(Reprodução permitida pela OMS)

Fonte – Desjeux (1999)

As leishmanioses apresentam-se basicamente em duas formas clínicas diferentes: a forma tegumentar (LT) e a forma visceralizante (LV) (ALVES; 2009; DESJEUX; 2004). A LV afeta órgãos como fígado, baço, linfonodos e intestinos, caracterizando-se como a manifestação clínica mais grave que, quando não diagnosticada e tratada precocemente, pode cursar para o óbito em até 90% dos casos (BRASIL; 2005).

No Brasil foram notificados, no período de 1990 a 2007, 561.673 casos de leishmanioses, sendo 508.193 (90,5%) de leishmaniose tegumentar (LT) e 53.480 (9,5%) de leishmaniose visceral (LV) (ALVES; 2009).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, no período de 1980 a 2003, o número de casos de LT variou de 3.000 a 35.748. De 1985 a 2005, verificou-se uma

média anual de 28.568 casos autóctones registrados e um coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes. A evolução desta doença no Brasil mostra também uma expansão geográfica, sendo que, no início da década de 80, foram registrados casos em 19 (70%) Unidades Federadas e, em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros; observando-se que a mesma encontra-se em franco processo de crescimento, tanto em magnitude como em expansão geográfica (BRASIL; 2007), Figura 5.

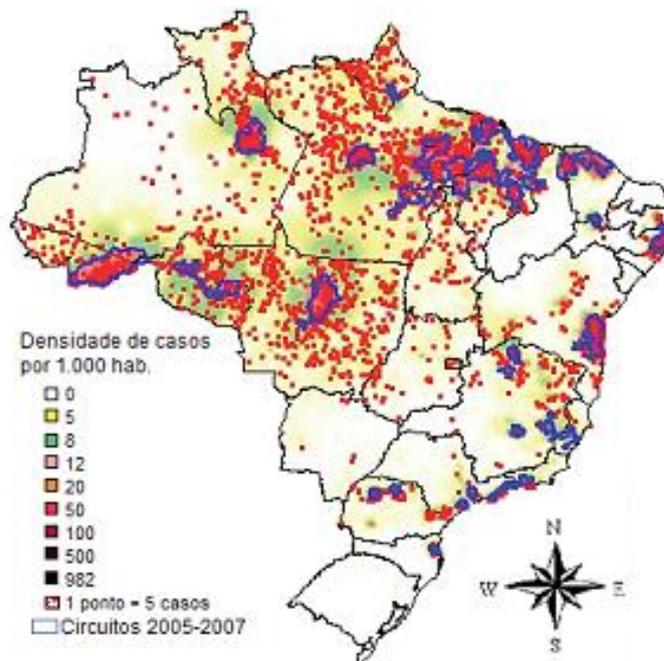


Figura 5 – Densidade de casos e circuitos de produção de LT por município. Brasil, 2005 a 2007 e casos em 2008

Fonte – Brasil (2010)

As regiões Norte e Nordeste vêm contribuindo, ao longo dos anos, com os maiores percentuais de casos de LT do país, de modo que, do total confirmado no período de 2000 a 2008, 39,4% (94.169/238.749) ocorreram na região Norte; 31,7% (75.657/238.749) na região Nordeste; 15,9% (37.853/238.749) na região Centro-Oeste; 9,6% (22.903/238.749) no Sudeste e 2,6% (6.161/238.749) na região Sul (Figura 6) (BRASIL; 2010).

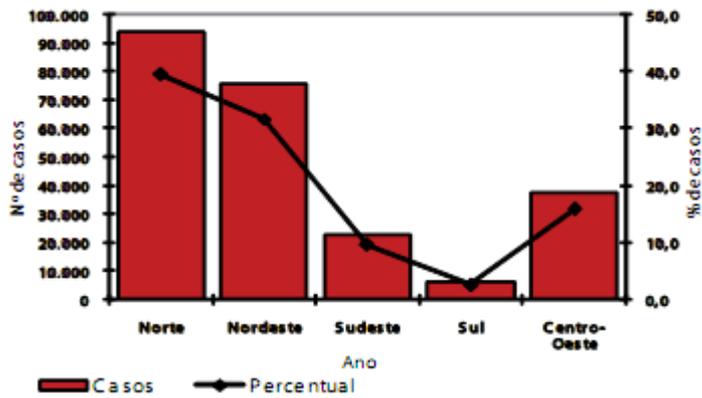


Figura 6 – Casos de LT e percentuais, segundo região de residência. Brasil, 2000 a 2008

Fonte – Brasil (2010)

Já a leishmaniose visceral, no Brasil, caracteriza-se por ser uma doença endêmica, porém com registros de surtos frequentes. Hoje encontra-se em franca expansão para grandes centros, estando distribuída em 21 unidades de federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. Nos últimos dez anos, a média anual de casos de LV foi de 3.379 casos e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes (Figura 7) (BRASIL; 2009).

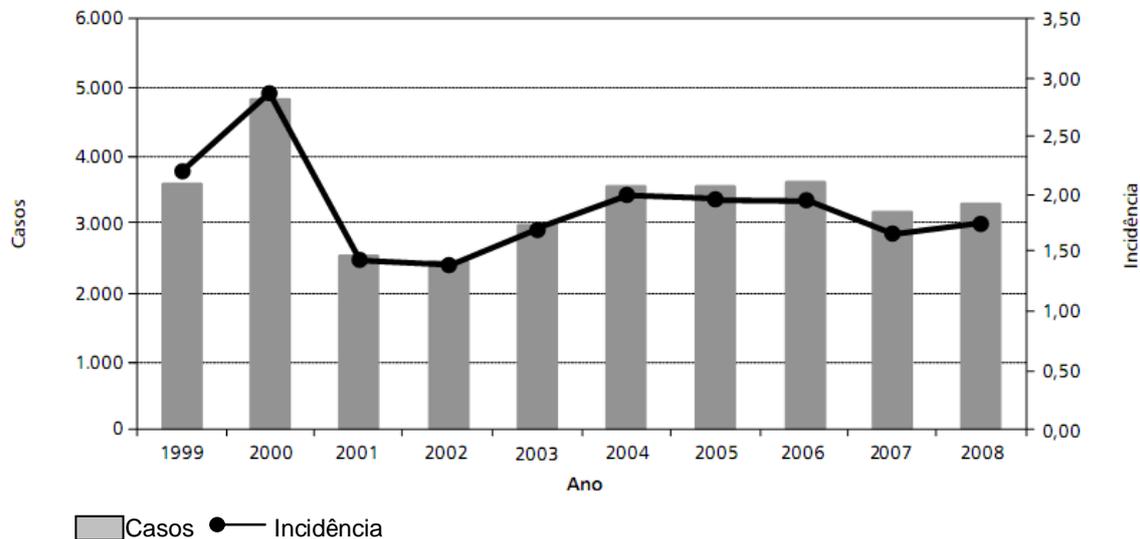


Figura 7 – Casos e incidência de leishmaniose visceral, Brasil 1999 a 2008*

* Dados preliminares

Fonte – Brasil (2009)

Até a década de 1990, o Nordeste correspondeu a 90% dos casos de LV do País. Porém, a doença vem se expandindo para as regiões Centro-Oeste, Sudeste e

Norte, modificando esta situação (ALVES; 2009), passando de 83% do total de confirmados em 2000 para 45% em 2008 (BRASIL; 2010) (Figura 8).

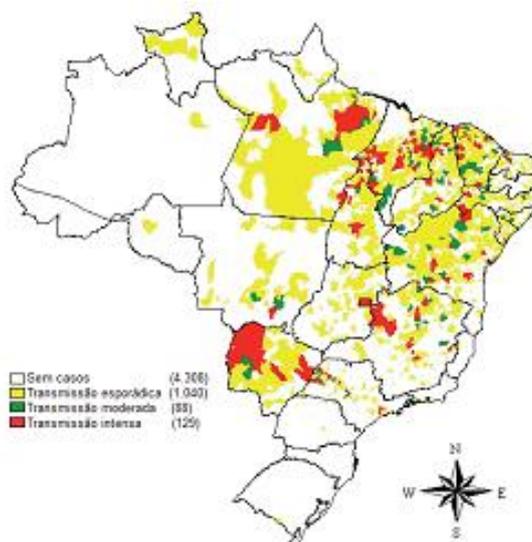


Figura 8 – Estratificação dos casos de LV no Brasil, 2006 a 2008
Fonte – Brasil (2010)

Outro aspecto a considerar é que desde 1985 quando foi diagnosticado o primeiro caso de leishmaniose associado com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), trinta e cinco países já relataram casos de coinfeção. Após a introdução da terapia antirretroviral, o número de coinfectados nos países europeus onde a doença é endêmica diminuiu drasticamente. No entanto, o problema tem se expandido para outros grandes focos de leishmanioses no mundo devido ao aumento da sobreposição das duas doenças (ALVAR *et al.*; 2008).

A pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida SIDA/AIDS tem modificado a história natural das leishmanioses (ALVAR *et al.*; 2008). A infecção pelo HIV aumenta o risco de desenvolver LV de 100 a 2.320 vezes em áreas de endemicidade, reduz a probabilidade de uma resposta terapêutica e aumenta a probabilidade de recidiva (LOPEZ-VELEZ *et al.*; 1998; PINTADO *et al.*; 2001). Ao mesmo tempo, a LV promove a progressão clínica da infecção pelo HIV e o desenvolvimento de condições definidoras da AIDS. Ambas as doenças exercem um efeito sinérgico negativo sobre a resposta imune celular, porque têm como alvo

células do sistema imunológico (OLIVIER *et al.*; 2003; TREMBLAY; OLIVIER; BERNIER; 1996).

O número de casos de coinfeção *Leishmania*-HIV é crescente também no Brasil, onde se observa uma sobreposição dessas infecções, caracterizada pela ruralização da Aids e pela urbanização da LV. Dos 3.852 casos de LV confirmados em 2008, 136 apresentaram coinfeção *Leishmania*/HIV. Desses, 73,5% (100/136) no gênero masculino e 76,5% (104/136) na faixa etária de 20 a 49 anos. Os municípios com mais registros foram Campo Grande/MS, 8,8% (12/136); Fortaleza/CE, 7,4% (10/136) e Belo Horizonte/MG, 6,6% (9/136); e do total de registros de LT em 2008, 1,3% (267/19.992) eram HIV positivos (BRASIL; 2010).

Por muitos anos, as leishmanioses têm sido muito subestimadas. Desde 1993, tornou-se evidente que as doenças são mais prevalentes do que se suspeitava anteriormente, com o risco de que irá aumentar no futuro. Há evidências em muitos países que a urbanização, o desenvolvimento agrícola, a irrigação, o desmatamento e, mais recentemente, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) contribuem para o aumento da transmissão e disseminação das leishmanioses (DESJEUX; 1999).

2.3.2 O parasito e seu ciclo de vida

Protozoários, flagelados, parasitas do gênero *Leishmania* constituem um grupo biologicamente diversificado de microrganismos. Eles possuem um DNA mitocondrial ou único cinetoplasto (kDNA) (GRIMALDI; TESH; 1993), estrutura formada de minicírculos e maxicírculos de ácido desoxirribonucleico (DNA) altamente compactado dentro da única mitocôndria da célula (STUART; 1983) e possuem a seguinte posição sistemática (LEVINE *et al.*; 1980):

Reino: Protista Haeckel, 1866

Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1817

Filo: Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: Mastigophora Desing, 1866

Classe: Zoomastigophorea Calkins, 1909

Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Sub-ordem: Trypanosomatina Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903.

O gênero *Leishmania* tem um ciclo de vida digenético e heteroxênico, isto é, evoluindo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Nos hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota (Figura 9 A), arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário. Todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Figura 10) – no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo. Nos flebotomíneos as leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo, onde as formas amastigotas se diferenciam em formas flageladas, as promastigotas, morfológica e bioquimicamente diferentes daquelas (Figura 9 B).

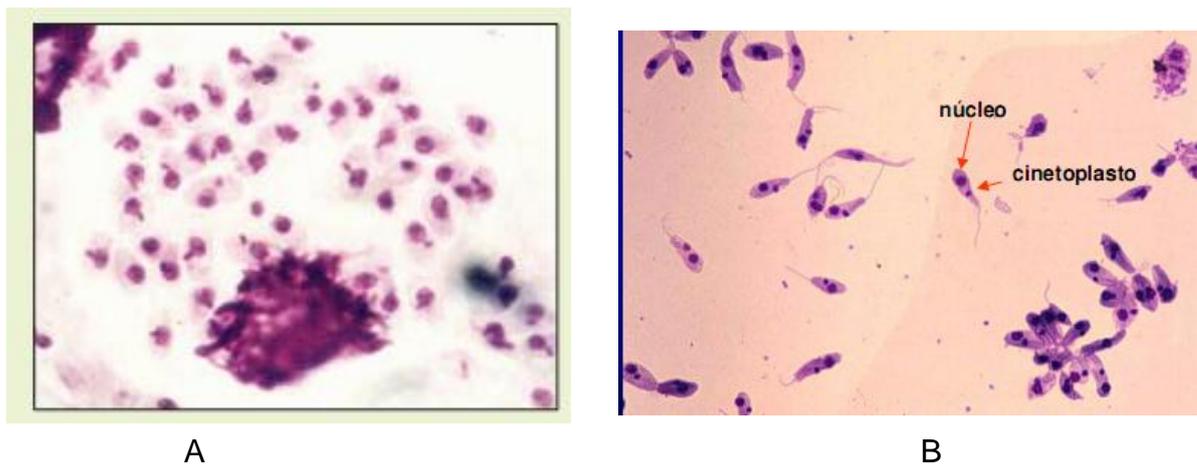


Figura 9 – Formas de *Leishmania* spp. Forma amastigota (A) e forma promastigota (B)

Fonte_A – http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_lta.pdf;

Fonte_B – <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/Leishmanioses.PDF>



Figura 10 – Fêmea ingurgitada de *Lutzomyia longipalpis*

Fonte – <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/Leishmanioses.PDF>

A infecção do inseto ocorre no momento da alimentação, quando ele suga o sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. No trato digestivo, ocorre o rompimento da membrana dos macrófagos e as amastigotas liberadas diferenciam-se na forma promastigota com capacidade de multiplicação no intestino. Após a digestão do sangue, as promastigotas migram para a região anterior do intestino e sofrem um processo de diferenciação, denominado metaciclogênese (SACKS; PERKINS; 1984). Durante esse processo, as promastigotas apresentam redução do tamanho do corpo celular, tornam-se extremamente móveis e altamente infectivas e passam a ser denominadas de metacíclicas. Essas formas migram para a probóscide e são transferidas ao hospedeiro vertebrado no momento da picada, durante um novo repasto sanguíneo. No local da picada, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear presentes na derme. No interior dos fagossomas, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas. Este período de diferenciação pode levar de 2 a 5 dias (COURRET *et al.*; 2002). Os fagossomas que contêm o parasita fundem-se com vesículas endocíticas e lisossomas. As amastigotas são resistentes às enzimas e ao pH ácido do fagolisossoma, conseguindo se multiplicar no interior dessa organela. Após diversas multiplicações, os macrófagos ficam super-infectados e rompem-se, liberando as amastigotas que são rapidamente fagocitadas por novos macrófagos, estabelecendo e disseminando a infecção (Figura 11)(MICHALICK; 2005).

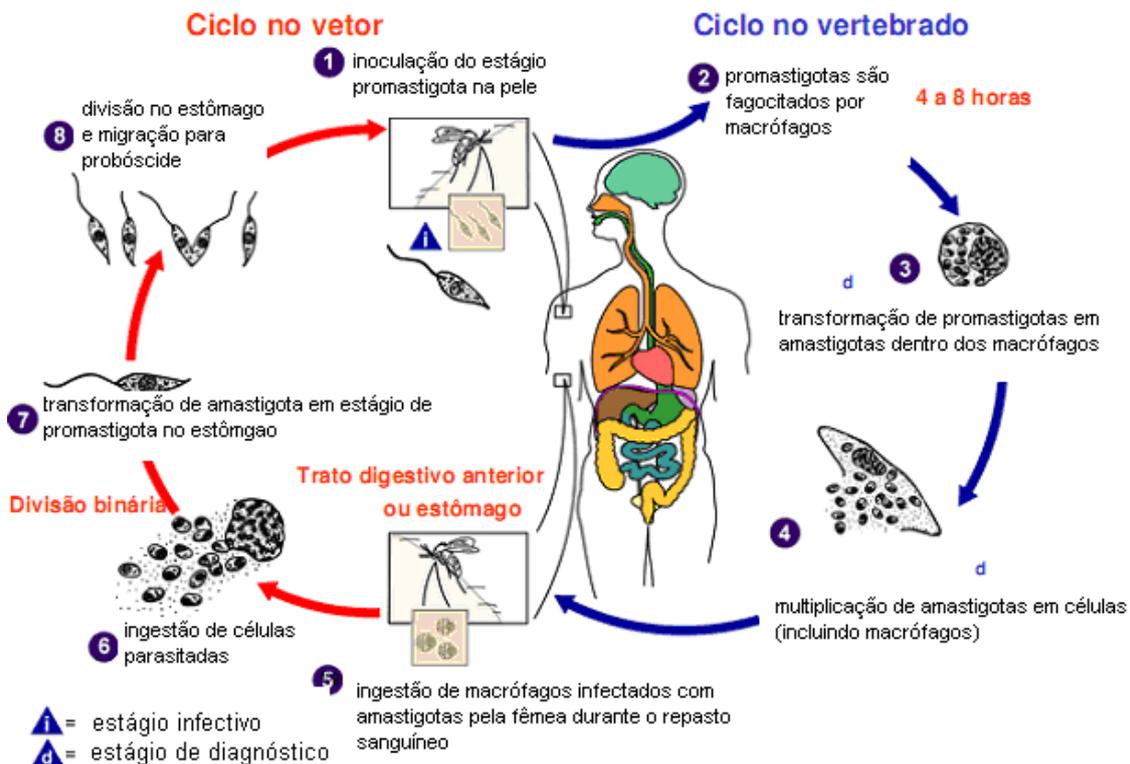


Figura 11 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Fonte – <http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/Leishmanioses.PDF>

O gênero *Leishmania* está dividido em dois subgêneros:

Subgênero *Leishmania* (Saf'Janova, 1982): parasitos do homem e de outros mamíferos, com o desenvolvimento nos insetos vetores limitados ao intestino nas regiões média e anterior. Espécie média e tipo: *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran e Mesnil, 1903 Ross, 1903). Parasitos encontrados no Velho e Novo Mundo;

Subgênero *Viannia* (Lainson e Shaw, 1987): parasitos do homem e de outros mamíferos, apresentando nos insetos vetores as formas paramastigotas e promastigotas. As paramastigotas encontram-se aderidas às paredes do intestino (piloro e/ou íleo) pelo flagelo, através de hemidesmossomos, e as promastigotas, formas livres, que migram do intestino posterior para as regiões média e anterior. Espécie-tipo: *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Viana, 1911). Parasitos encontrados na América tropical e subtropical (MICHALICK; 2005).

2.3.2.1 *Leishmania amazonensis*

A espécie *Leishmania amazonensis* pertence ao subgênero *Leishmania* e ao complexo *Leishmania mexicana*. Caracteriza-se por apresentar a fase amastigota relativamente grande (3 – 6 μm), as formas flageladas, as promastigotas, crescem fácil e rapidamente em meio de cultura e em hamster, no qual causa grandes lesões no ponto de inoculação, produzindo metastases em poucos meses. São parasitos de pequenos roedores silvestres e marsupiais, e no inseto vetor se desenvolvem nas regiões anterior e média do estômago (REY; 2008).

Essa espécie é encontrada na Bacia Amazônica (Brasil e países vizinhos), Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (REY; 2008), embora sua distribuição tenha aumentado recentemente, com casos autóctones na região Sudeste, onde a doença em humanos é relativamente rara, apresentando as formas cutânea localizada e difusa (MEDEIROS; SILVA; ROSELINO; 2008), como também nas regiões Nordeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil (DORVAL *et al.*; 2006).

No estado de Mato Grosso do Sul, foram encontrados casos autóctones de leishmaniose tegumentar americana no município de Bela Vista infectados por *Leishmaniaia (L.) amazonensis* (DORVAL *et al.*; 2006). Outro estudo, realizado nesse estado, demonstrou a presença em 41,4% dos flebótomos capturados a espécie *Bichromomyia flaviscutellata*, principal vetor de *L. amazonensis*. Nessa pesquisa duas de trinta e seis animais expostos apresentaram leishmaniose cutânea, cujo agente foi identificado como *L. amazonensis*; demonstrando que a presença simultânea do vetor e da espécie transmitida pelo mesmo pode ser fator preditor da ocorrência de leishmaniose para a população humana que permanece nesse local (DORVAL *et al.*; 2010).

A *L. amazonensis* produz um amplo espectro de doenças clínicas, desde a leishmaniose cutânea localizada, manifestação mais comum, à leishmaniose cutânea difusa, uma manifestação rara que apresenta nódulos, caracterizando-se por lesões não ulceradas com abundantes macrófagos parasitados e ausência de resposta imune mediada por anticorpos anti-*Leishmania*. Essa espécie também tem sido isolada de pacientes com leishmaniose visceral e de pacientes que apresentavam a forma mucocutânea (DE OLIVEIRA *et al.*; 2007).

2.3.3 Aspectos clínicos em humanos

Baseado nos sintomas e manifestações clínicas mais frequentes observados em infecções com as várias espécies de *Leishmania*, a doença pode ser dividida, no Brasil, em: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que apresenta diferentes formas clínicas e Leishmaniose Visceral (LV) (Figura 12) (MARZOCHI; MARZOCHI; 1994).

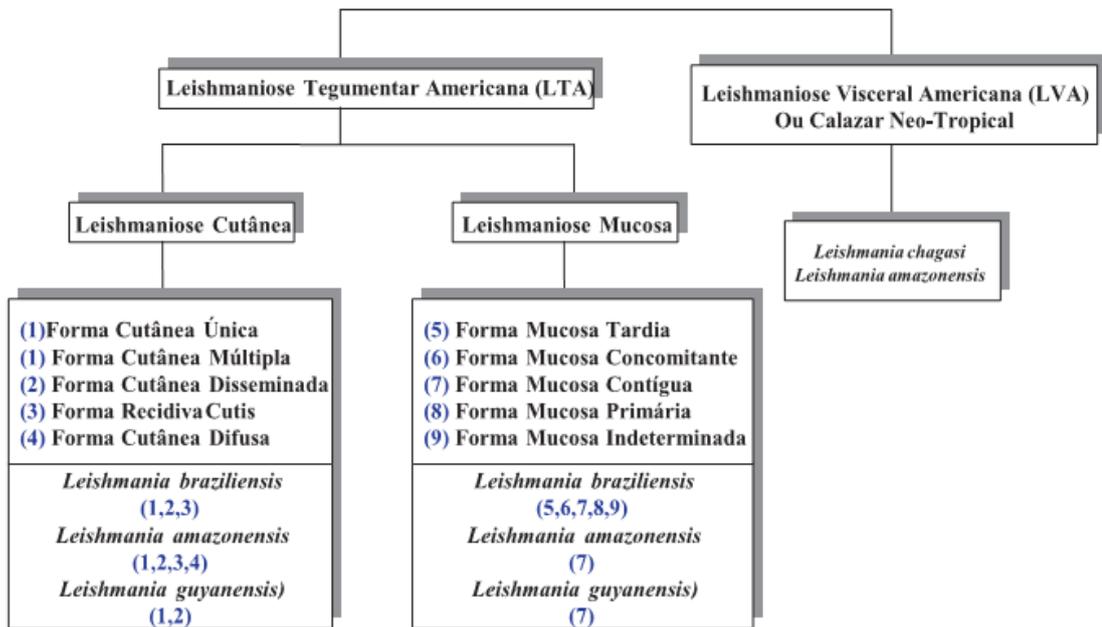


Figura 12 – Quadro com as modalidades de Leishmanioses no Brasil e seus agentes etiológicos

Fonte – Marzochi; Marzochi (1994)

A apresentação cutânea da LTA (Figura 13) caracteriza-se por lesões de pele, que podem ser localizadas (lesões únicas ou múltiplas), a forma disseminada (lesões muito numerosas em várias áreas do tegumento) e a forma difusa. Na maioria das vezes, a doença apresenta-se como uma lesão ulcerada única. Nas formas cutâneas localizadas e múltiplas, a lesão ulcerada franca é a mais comum e se caracteriza por úlcera com bordas elevadas, em moldura. O fundo é granuloso, com ou sem exsudação. Em geral, as úlceras são indolores. Observam-se também outros tipos de lesões como úlcero-crostosa, impetigóide, ectimatóide, úlcero-vegetante, verrucosa-crostosa, tuberosa, linquenóide e outras. A forma cutânea disseminada caracteriza-se por lesões ulceradas pequenas, às vezes acneiformes,

distribuídas por todo o corpo (disseminação hematogênica). É uma forma rara, as lesões são eritematosas, sob a forma de pápulas, tubérculos, nódulos e infiltrações difusas e, menos frequentemente, sob a forma tumoral. Seu prognóstico é ruim, por não responder adequadamente à terapêutica (BRASIL; 2005).

A apresentação mucosa da LTA é, na maioria das vezes, secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões de pele. Às vezes, porém, não se identifica a porta de entrada, supondo-se que as lesões sejam originadas de infecção subclínica. As cavidades nasais são mais frequentemente acometidas, seguidas da faringe, laringe e cavidade oral; podendo ocorrer destruição parcial ou total dessas estruturas. Outras mucosas, como língua e órgãos genitais, são raramente atingidas (BRASIL; 2005).

A LV (Figura 13) tem manifestação espectral, caracterizando-se por três formas clínicas distintas:

Forma assintomática – caracterizada por não apresentar manifestação clínica da doença e é somente diagnosticada quando da realização de inquéritos sorológicos em áreas de transmissão;

Forma oligossintomática – caracterizada pela presença de alguns sinais ou sintomas da doença tais como: febre, hepatomegalia, diarreia e anemia discreta. Estes sintomas podem persistir por cerca de três a seis meses, podendo evoluir para cura clínica espontânea ou para doença plenamente manifesta em cerca de dois a 15 meses;

Forma clássica – que é a doença plenamente manifesta. Nesta forma, as manifestações clínicas são bastante exacerbadas, caracterizadas por hepatoesplenomegalia volumosa, febre e comprometimento do estado geral, perda de peso progressiva, anorexia e astenia, podendo advir as principais complicações causadoras de óbitos (SÃO PAULO (ESTADO) 2006).

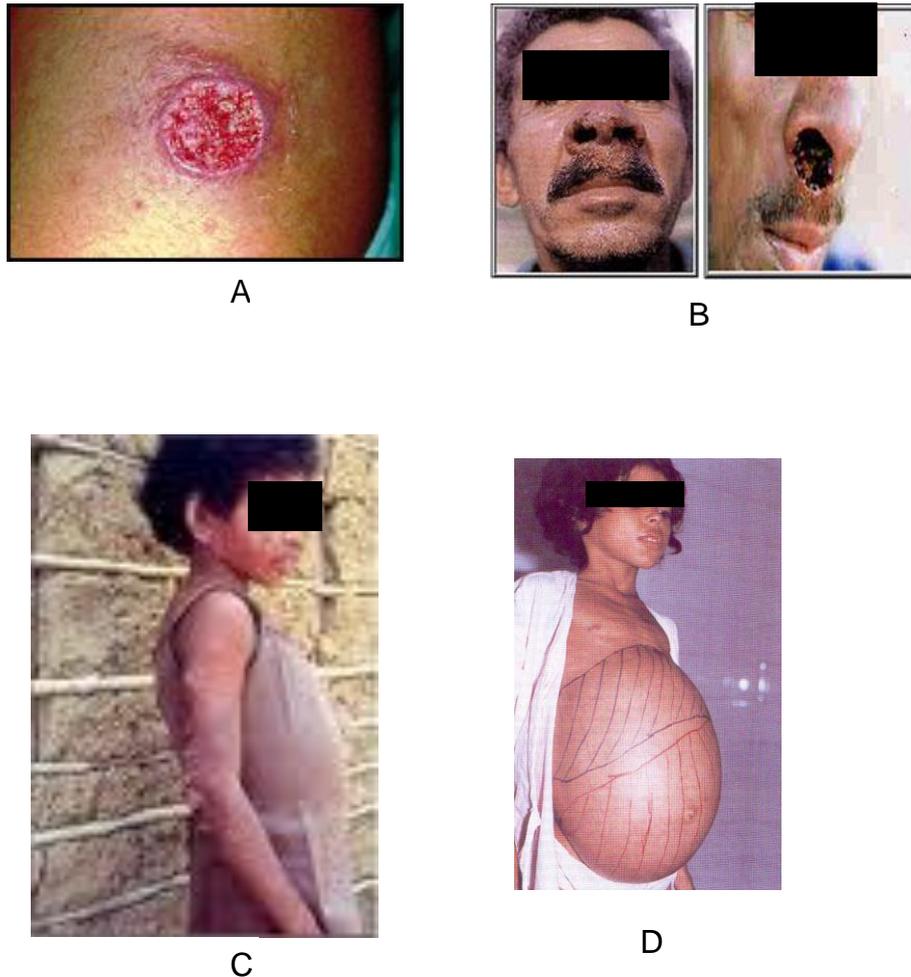


Figura 13 – Principais sinais clínicos das leishmanioses observados em humanos
 A – Leishmaniose cutânea; B – Leishmaniose mucocutânea; C –
 Leishmaniose cutânea-difusa e D – Leishmaniose visceral

Fonte_{A,C}:http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/leishmaniose_cut_nea.htm;
 Fonte_B:<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?676>; Fonte_D:<http://www.saude.rs.gov.br/dados/1239825338856LEISHMANIOSE%20VISCERAL%20QUADRO%20CL%CDNICO.pdf>

2.3.4 Tratamento

A única forma eficaz de controle nas infecções por *Leishmania* é a quimioterapia (BERMAN; 1997; OLLIARO; BRYCESON; 1993). Os primeiros agentes com índice terapêutico favorável, os compostos de antimônio pentavalentes (Sb-V), foram introduzidos na década de 1940 e ainda são o esteio da terapia para todas as formas de leishmaniose. Embora o modo de ação dos antimoniais em leishmania seja ainda obscura (BORST; OUELLETTE; 1995), esses compostos são conhecidos por inibir enzimas glicolíticas e de oxidação de ácidos graxos nas

leishmânias, e há uma inibição dose-dependente na formação de rede de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (THAKUR; KUMAR; PANDEY; 1991).

As formulações disponíveis incluem o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (Figura 14 A) em que o antimônio é complexado com ácido glucônico, e o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) (Figura 14 B) onde o antimônio é complexado com o açúcar meglumina.

O tratamento da leishmaniose visceral com regimes de antimonial é complicado pela toxicidade cardíaca e renal da droga e pela resistência às drogas (PAPADOPOULOU *et al.*; 1998). Insensibilidade aos agentes Sb-V ocorre em 5-70% dos pacientes e as taxas de resistência de 40-50% são encontradas em algumas regiões endêmicas (GROGL; THOMASON; FRANKE; 1992; OUELLETTE; PAPADOPOULOU; 1993).

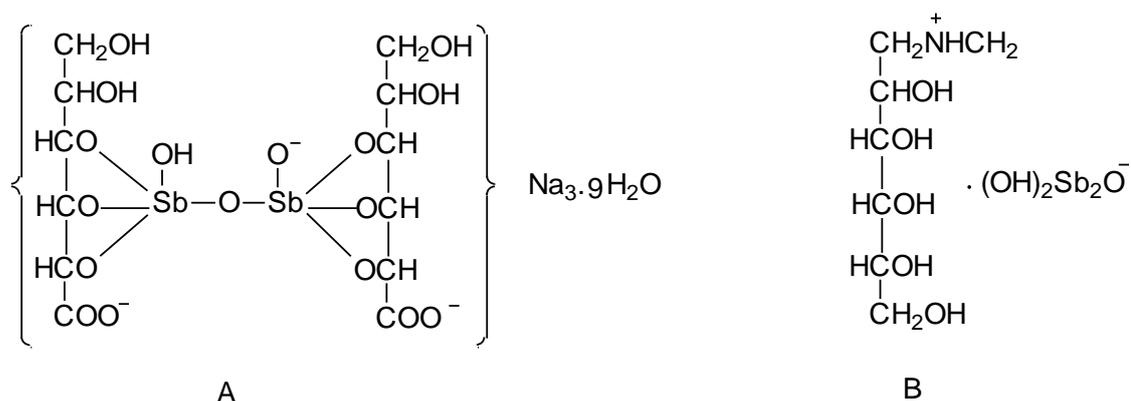


Figura 14 – Estruturas dos principais compostos de antimônio pentavalentes

A – estibogluconato de sódio e B – antimoniato de meglumina

Fonte: (RATH *et al.*; 2003).

Para os casos de resistência aos antimonais, o tratamento, portanto, depende de medicamentos de segunda linha, como a pentamidina (Figura 15) (BERMAN; 1997). Da mesma forma que Sb-V, seu mecanismo de ação não é bem compreendido. Possivelmente esta droga interfere com o transporte e a síntese de poliaminas (BASSELIN *et al.*; 1997; BASSELIN; LAWRENCE; ROBERTGERO; 1996) que são necessárias para a síntese de tripanotiona (N1, N8-bisglutacionil espermidina), um metabólito necessário para neutralização do estresse oxidativo (FAIRLAMB; CERAMI; 1992). Esquemas terapêuticos de longo prazo e com altas doses de pentamidina provavelmente são mais tóxicos do que aqueles com antimonial, e são, portanto, utilizados apenas quando há probabilidade que sejam mais eficazes do que o antimônio (PAPADOPOULOU *et al.*; 1998).

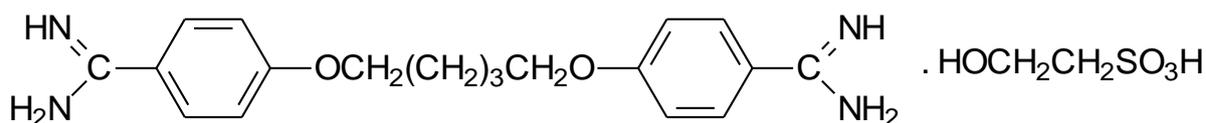


Figura 15 – Estrutura do isetionato de pentamidina

Fonte: (RATH *et al.*; 2003)

Em várias regiões do mundo, a anfotericina B – AnfB – (Fungison®)(Figura 16) está se tornando o tratamento de escolha para a leishmaniose visceral, especialmente em casos refratários a pentamidina e/ou ao Sb-V (OUELLETTE; PAPADOPOULOU; 1993). O alvo dessa droga são os esteróis do tipo ergosterol; que semelhante aos fungos, são os principais esteróis de membrana de *Leishmania* spp. (BERMAN; 1988). A AnfB inibe seletivamente a síntese da membrana do parasita, fazendo furos na membrana, levando-o à morte. Portanto, seu uso no tratamento da leishmaniose tem uma lógica bioquímica, porém, mesmo se ligando ao colesterol humano da parede celular em menor medida, produz efeitos tóxicos (SINGH; SIVAKUMAR; 2004). Formulações da AnfB (lipossomas, complexos de lipídios, em dispersão coloidal) mantêm a potência e reduzem a toxicidade significativamente, embora tenham a desvantagem do custo elevado para uma doença mais prevalente em países em desenvolvimento (PAPADOPOULOU *et al.*; 1998).

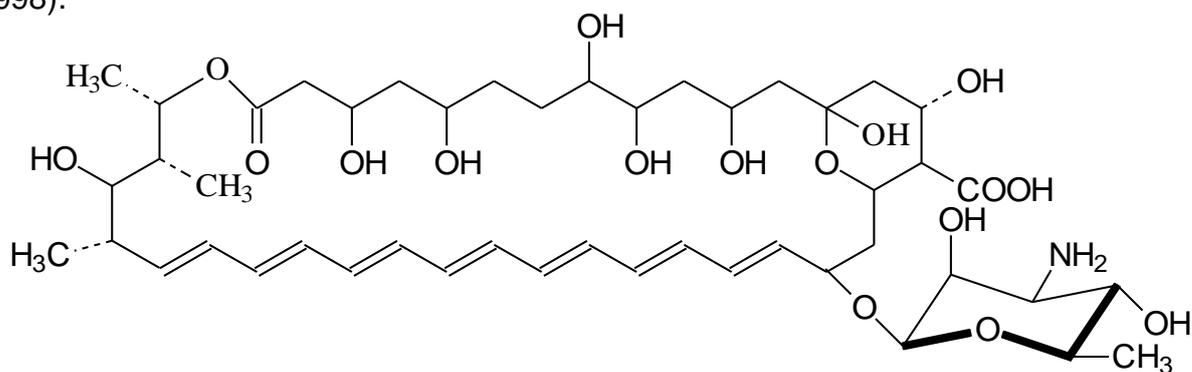


Figura 16 – Estrutura da anfotericina B

Fonte: (RATH *et al.*; 2003)

Todas as drogas acima são utilizadas por via parenteral, o que apresenta várias desvantagens, internação hospitalar ou visitas múltiplas, as despesas de injeção e o risco de infecções como HIV e hepatites B e C, transmitidas pelo sangue (SINGH *et al.*; 2000).

Surge, então, a miltefosina (Figura 17), talvez o mais recente e significativo avanço na eficácia do tratamento oral de LV. A miltefosina é um alquilfosfocolina,

originalmente desenvolvida como um agente anticancerígeno. A atividade leishmanicida da miltefosina foi descoberta em meados da década de 1980, e a demonstração posterior de sua eficácia em vários modelos experimentais (CROFT; SEIFERT; DUCHENE; 2003) levou, em meados da década de 1990, a ensaios clínicos e de codesenvolvimento da miltefosina para leishmaniose por uma parceria entre a Asta Médica (agora Zentaris) e a WHO/TDR (CROFT; COOMBS; 2003), culminando com o registro na Índia, em março de 2002, para o tratamento oral de LV e em 2005, na Colômbia, para a LT (CROFT; SEIFERT; YARDLEY; 2006).

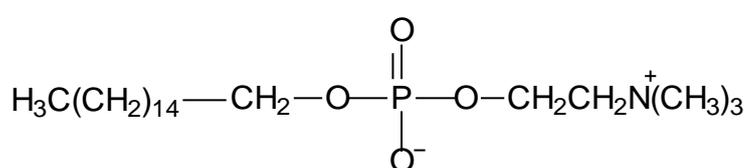


Figura 17 – Estrutura da miltefosina
Fonte: Croft; Coombs (2003)

No entanto, existem preocupações sobre a sua estreita janela terapêutica (CROFT; SEIFERT; YARDLEY; 2006), sua teratogenicidade, e o fato de que sua longa meia vida possa favorecer o aparecimento de resistência (BRYCESON; 2001). Tem sido demonstrado com estudos *in vitro* em promastigotas, que linhagens de *Leishmania donovani* resistentes à miltefosina podem ser selecionadas (SEIFERT *et al.*; 2003).

A outra droga a ser considerada é a paromomicina (PM) (Figura 18), um antibiótico aminoglicosídeo que foi originalmente identificado como leishmanicida nos anos de 1960 e tem sido usado em ensaios clínicos para ambas, LV e LT. O desenvolvimento da formulação parenteral de PM para a LV, uma droga com pobre biodisponibilidade oral, tem sido lento, mas a fase III dos ensaios estão em andamento na Índia sob a responsabilidade do Instituto de Uma Saúde Mundial (www.iowh.org) e na África Oriental gerida pelo DNDi e instituições parceiras (www.dndi.org); no entanto, como para a miltefosina, a resistência de *L. donovani* a PM pode ser induzida experimentalmente *in vitro* sobre promastigotas (CROFT; SEIFERT; YARDLEY; 2006).

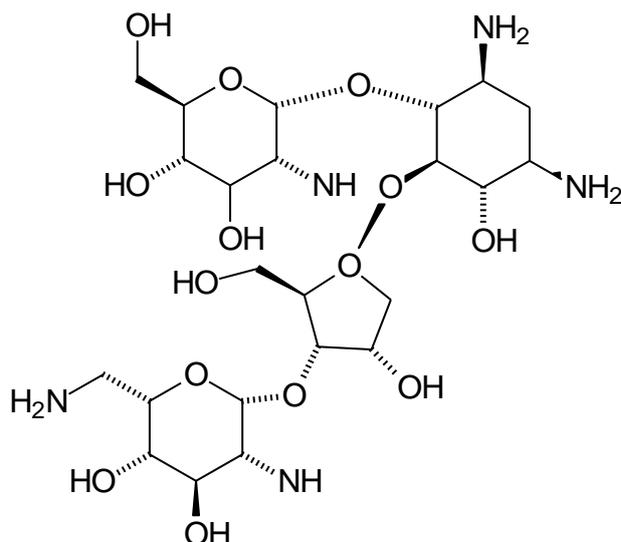


Figura 18 – Estrutura da paromomicina

Fonte: Croft; Coombs (2003)

Outras drogas estão em fase de avaliação ou em estudos pré-clínicos como os azóis, que originalmente foram desenvolvidos como antifúngicos, mas que demonstraram atividade leishmanicida (CROFT; SEIFERT; YARDLEY; 2006). Salienta-se, no entanto, que é impossível prever a possibilidade de uma droga ou formulação que seja efetiva contra todas as formas de leishmaniose, uma vez que as espécies causadoras diferenciam-se quanto à sensibilidade às drogas e os sítios de infecção nas formas visceral e cutânea requerem aspectos farmacocinéticos distintos (CROFT; COOMBS; 2003).

Assim, verifica-se que diversas drogas vêm sendo utilizadas ou encontram-se em fase final de estudo, porém, todas as drogas têm algumas limitações que incluem o custo exorbitante e a toxicidade (SINGH; SIVAKUMAR; 2004). No Brasil, o Ministério da Saúde distribui gratuitamente o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime[®]) na rede pública de saúde, adotando o esquema terapêutico preconizado pela OMS (BRASIL; 2006a), bem como a anfotericina B nas apresentações lipossomal e o desoxicolato sódico (SÃO PAULO (ESTADO) 2006). Entretanto, o tratamento pode tornar-se inviável ou seus custos podem representar um sério encargo financeiro às famílias em função que vários problemas logísticos a fim de ter acesso ao tratamento devam ser considerados, como longo tratamento; centralização deste em grandes centros, dificultando o acesso ao tratamento devido às distâncias e/ou falta de transporte (WHO; 2007).

Esses aspectos podem causar desistência e resistência às drogas pode surgir, induzindo a necessidade de outros esquemas terapêuticos, normalmente mais dispendiosos, mergulhando as famílias em um círculo vicioso de doença- pobreza-desnutrição-doença (WHO; 2007).

2.4 Produtos naturais com atividade anti-Leishmania

Nos países onde as doenças causadas por protozoários como as leishmanioses ocorrem, as plantas medicinais têm sido usadas tradicionalmente durante séculos, e embora as pessoas tenham obtido um pouco de alívio, não há dados científicos que possam justificar e apoiar o seu uso (MESIA *et al.*; 2008).

As investigações são realizadas em extratos de plantas medicinais para provar sua eficácia contra diferentes protozoários e vários trabalhos têm relatado possuir atividades interessantes (MESIA *et al.*; 2008). Alguns trabalhos de revisão (DE CARVALHO; FERREIRA; 2001; POLONIO; EFFERTH; 2008; ROCHA *et al.*; 2005) trazem importantes informações do potencial de produtos naturais para a atividade anti-*Leishmania*.

No trabalho de Rocha *et al.* (2005), foram encontradas 101 espécies de plantas que apresentaram atividade. Verifica-se que a família Asteraceae foi a que mais apresentou resultados positivos com aproximadamente 20%, seguida pela família Annonaceae com 10% e Apocynaceae com 7% de citações. As partes mais utilizadas nas pesquisas foram as folhas (36%), no entanto, diversas outras partes foram avaliadas, como casca, raiz, rizomas, caule, partes aéreas, sementes, entre outras. O tipo de extrato utilizado nas pesquisas foi principalmente o etanólico (39%) e depois a fração alcaloídica (16%). Os autores encontraram 239 substâncias naturais reportadas na literatura que foram avaliadas quanto à atividade anti-*Leishmania*. Dessas, 28,5% são alcaloides, 12,1% triterpenos, 7,9% sesquiterpenos, 7,5% lactonas, 6,7% quinoides, 5,4% flavonoides, 5,4% diterpenos, 4,1% esteroides e outras com percentuais inferiores a 4%.

Os alcaloides são compostos nitrogenados, muitos deles farmacologicamente ativos, e assim como outros metabólitos secundários das plantas possuem papel de defesa contra a invasão de microorganismos (HENRIQUES; KERBER; MORENO; 1999). Embora muitos estudos tenham atribuído excelentes atividades anti-

Leishmania aos alcaloides, nenhuma substância tem sido avaliada em estudos clínicos ou projetada para aplicações clínicas futuras (MISHRA *et al.*; 2009).

Mishra *et al.* (2009) fizeram uma revisão sobre os tipos de alcaloides que apresentaram atividades, encontrando 54 alcaloides diferentes, sendo 19 pertencentes à classe dos isoquinolínicos, 6 β -carbolínicos e números menores nas classes quinolínicos, indólicos, naftilisoquinolínicos, bisbenzilisoquinolínicos, esteroidais, benzoquinolizidina, diterpenos, pirrolidinícos, acridonas e alcaloides de esponjas marinhas.

Os alcaloides *O*-metilmoscatolina (Figura 19 A) e liriodenina (Figura 19 B), isolados da planta *Annona foetida* (Annonaceae), exibiram atividade anti-*Leishmania* *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* com um $CI_{50} < 60 \mu M$. Estudo de relação estrutura-atividade (SAR) demonstrou que a liriodenina, com o seu metilenodióxi, foi oito vezes mais ativa contra *L. braziliensis* e *L. guyanensis* que o *O*-metilmoscatolina (COSTA *et al.*; 2006).

Entre os alcaloides β -carbolínicos, a harmalina (Figura 19 C) isolada de *Perganum harmala* (Nitrariaceae) demonstrou forte atividade específica contra amastigotas (CI_{50} de $1,16 \mu M$), enquanto que da mesma planta, o metabólito harmina (Figura 19 D) apresentou atividade significativa em camundongos. Esse composto foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço em cerca de 40, 60, 70 e 80% nas formas livre, lipossomal, niosomal e nanopartícula, respectivamente (CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUEZ; 2001).

A coroniridina (Figura 19 E), um alcaloide indólico tipo-lboga, porque tem um anel isoquinuclidina fundido a uma molécula de indol, foi obtida de *Peschiera australis* (Apocynaceae) e apresentou atividade antipromastigota e anti-amastigota por um mecanismo direto sobre o parasito por meio da destruição da sua mitocôndria (DELORENZI *et al.*; 2001; DELORENZI *et al.*; 2002).

As quinolinas 2-substituídas isoladas de *Galipea longiflora* (Rutaceae), 2-propenilquinolina, chimanina D e chimanina B (Figura 19 F) apresentaram atividade antipromastigota de *L. braziliensis* com CI_{90} de 50, 25 e $25 \mu g/mL$, respectivamente (FOURNET *et al.*; 1996).

Um outro grupo de estruturas importantes são os triterpenos, pertencentes à classe dos terpenoides provenientes de unidades de isopreno – C5. Os triterpenos têm seis unidades de isopreno, contabilizando 30 carbonos (DEWICK; 2002).

O triterpenoide pentacíclico ácido diidrobetulínico – DHBA – (Figura 20 C) demonstrou atividade anti-*L. donovani* tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas por meio da inibição das DNA- topoisomerasas, induzindo a apoptose (CHOWDHURY *et al.*; 2003).

Seis saponinas triterpenoidais do tipo oleano, denominadas de maesabalideos I-VI advindas de *Maesa balansae* (Myrsinaceae) apresentaram forte atividade anti-*Leishmania*. Os maesabalideos III e IV (Figura 20 A e B) demonstraram respectivamente CI_{50} de 7 e 14 ng/mL contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* (GERMONPREZ *et al.*; 2005), embora estudos pré-clínicos com o extrato purificado de saponinas triterpenoides (PX-6518) tenham sido descontinuados devido a sua toxicidade (CROFT; COOMBS; 2003).

Do extrato metanólico das folhas de *Pourouma guianensis* (Moraceae) foram isolados entre outras substâncias, os triterpenoides ácido oleanólico (Figura 20 D) e ácido ursólico (Figura 20 E) que apresentaram forte atividade contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, devido à inibição da capacidade fagocítica dos macrófagos em uma concentração acima de 40 μ g/mL (TORRES-SANTOS *et al.*; 2004).

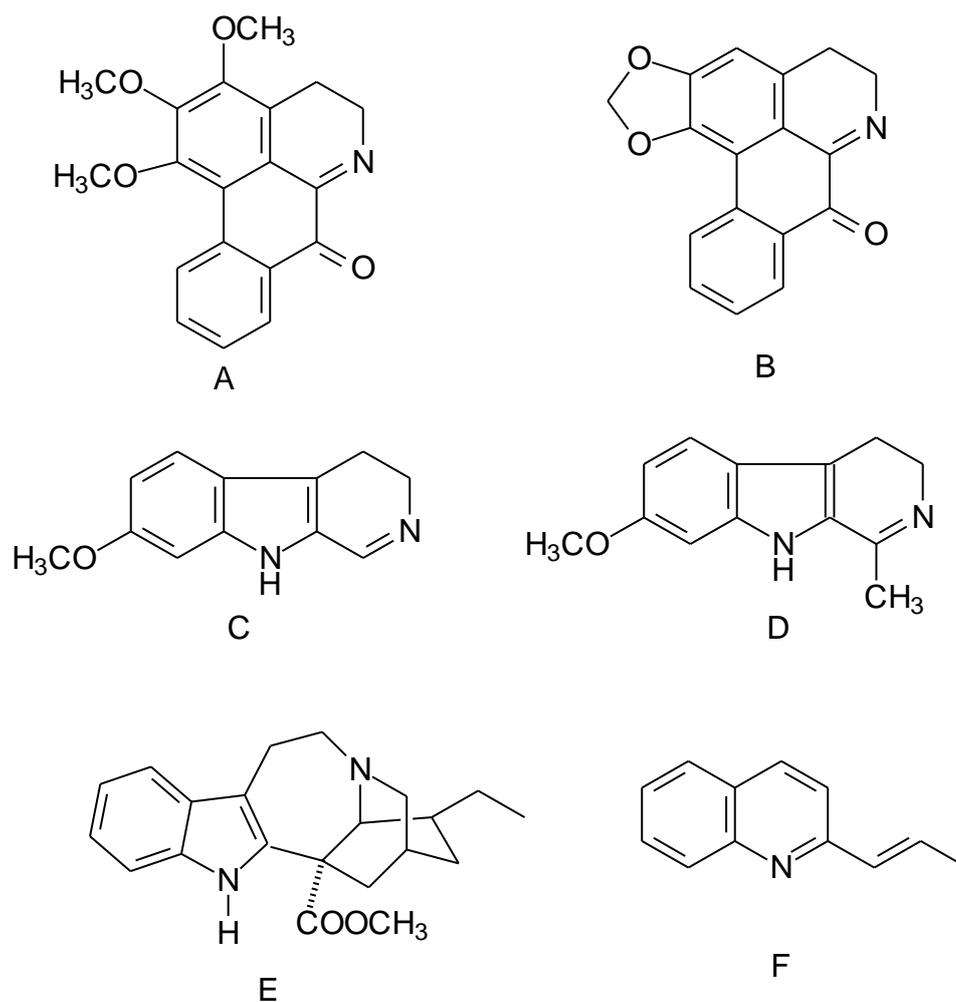


Figura 19 – Estruturas de alguns alcaloides que apresentaram atividade anti-*Leishmania*

A - O-metilmoscatoлина; B – liriodenina; C – harmalina; D – harmina; E – coroniridina e F – chimanina B

Fonte_{A, B, C e D} – Mishra *et al.* (2009); _E – Delorenzi *et al.* (2001); _F - Fournet *et al.* (1996)

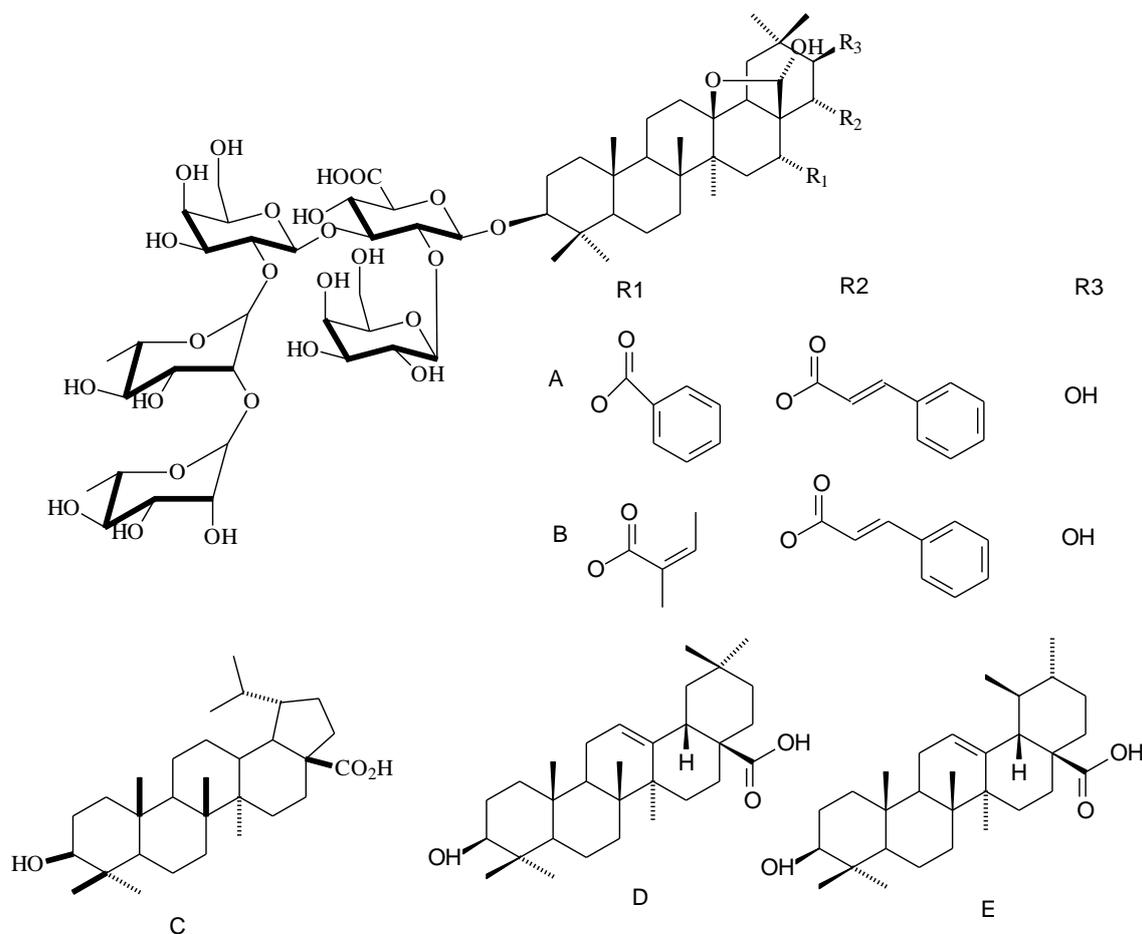


Figura 20 – Estruturas de alguns triterpenos com atividade anti-*Leishmania*
 A – Maesabalideo III, B – Maesabalideo IV; C – Ácido diidrobetulínico (DHBA); D – Ácido Oleanólico, E – Ácido ursólico

Fonte_{A,B} – Maes *et al.* (2004); _C – Chowdhury *et al.* (2003); _{D,E} – Torres-Santos *et al.* (2004)

Dentre os compostos com atividade anti-*Leishmania*, tem-se a geraniina (Figura 21 A), um tanino hidrolisável que pode ser encontrado, por exemplo, em *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae), uma espécie de quebra-pedra. Esse tanino parece atuar por meio da estimulação do macrófago e liberação do fator de necrose tumoral - TNF_{α} - e interferons que eliminam a amastigota de forma específica, já que não atua sobre a forma promastigota (KOLODZIEJ *et al.*; 2001).

De forma diferente, a licochalcona A (Figura 21 B), uma chalcona que ocorre nas raízes e rizomas do alcaçuz chinês ou Gao Cão, podendo abranger as espécies *Glycyrrhiza uralensis*, *G. inflata* e *G. glabra* (Fabaceae) é ativa contra *L. major* e *L. donovani* através da destruição da mitocôndria do parasito em ambas as suas formas, por meio da inibição da enzima fumarato redutase, enzima que não existe no hospedeiro (CHRISTENSEN *et al.*; 1994).

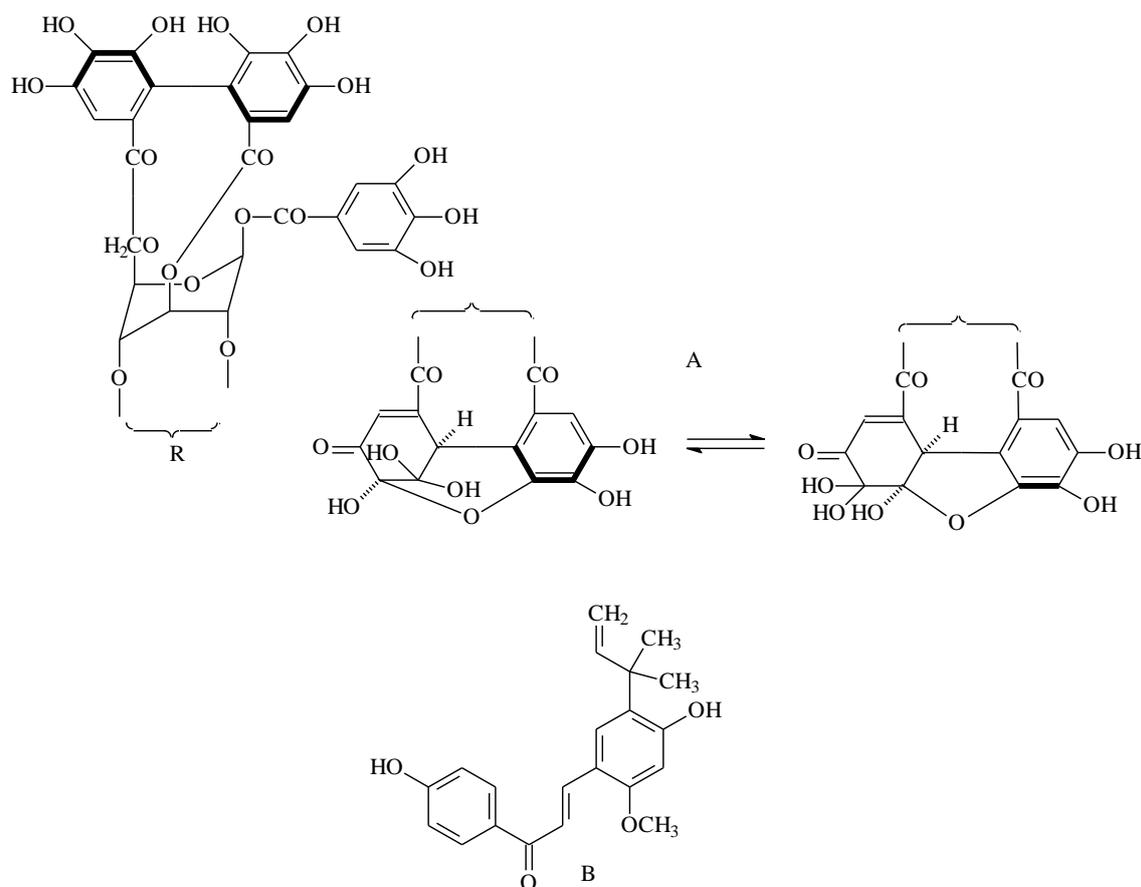


Figura 21 – Estruturas da geraniina (A) e da licochalcona A (B)
 Fonte_A – Kolodziej *et al.* (2001); B – Christensen *et al.* (1994)

Assim, embora um número significativo de compostos anti-*Leishmania* tenha sido investigado, estudos sobre o mecanismo de ação ainda são escassos e os reais locais de ação são desconhecidos na maioria dos casos. Esse conhecimento é de grande importância para investigar os princípios ativos de fármacos anti-*Leishmania* para subsequente planejamento racional de novas drogas (POLONIO; EFFERTH; 2008).

2.5 *Momordica charantia* Linn

2.5.1 Características botânicas, farmacológicas e químicas

Momordica charantia (MC) pertence à família Cucurbitaceae, sendo conhecida como Melão-de-são-caetano, no Brasil, como “bitter melon” ou “bitter gourd” em Inglês e “karela” em hindu. É uma planta trepadeira de regiões tropical e subtropical e cultivada na Ásia, África, América do Sul e Índia como fruto comestível, que está entre o mais amargo de todos os legumes, bem como para fins medicinais. *M charantia* é tradicionalmente utilizada como medicamento em países em desenvolvimento como Brasil, China, Colômbia, entre outros (DERMARDEROSIAN; BEUTLER; 2005).

Momordica significa "mordida", referindo-se às bordas irregulares das folhas, que aparecem como se tivessem sido mordidas. As flores são amarelas (Figura 22 A) e o fruto é oblongo verde-esmeralda, quando jovem, passando a amarelo-alaranjado quando maduro, assemelhando-se a um pequeno pepino (Figura 22 B e C). As partes usadas incluem os frutos, folhas, sementes e o óleo da semente (DERMARDEROSIAN; BEUTLER; 2005; GROVER; YADAV; 2004).

O Melão-de-são-caetano contém compostos biologicamente ativos que incluem glicosídeos, saponinas, alcaloides, óleos fixos, triterpenos, esteroides e proteínas. Os frutos imaturos são uma boa fonte de vitamina C e também fornecem vitamina A, fósforo e ferro (BRACA *et al.*; 2008; XIE *et al.*; 1998; ZHANG *et al.*; 2009).

Muitos compostos como momorcharinas, momordenol, momordicina, momordicinas, momordicinina, momordina, momordolol, charantina, charina, criptoxantina, cucurbitinas, cucurbitacinas, cucurbitanos, cicloartenols, diosgenina, ácidos elaeostearico, eritrodiol, ácido galacturônico, ácido gentísico, goiaglicosídeos, goiassaponinas e multiflorenol (Figura 23) foram isolados de todas as partes da planta (BEGUM *et al.*; 1997; GROVER; YADAV; 2004; MURAKAMI *et al.*; 2001; PITIPANAPONG *et al.*; 2007; YASUDA *et al.*; 1984).



A



B



C

Figura 22- Fotos da planta *Momordica charantia* L. (melão-de-são-caetano)
A – Folhas e flores; B – Fruto verde; C – Fruto maduro

Fonte- <http://www.fotosearch.com/photos-images/bitter-melon.html>

Especificamente, o Melão-de-são-caetano contém os glicosídeos mormordina e charantina, sendo esta última composta de esteroides mistos com ação hipoglicemiante. Um glicosídeo tipo pirimidina também foi encontrado. O alcaloide mormordicina também está presente, juntamente com um óleo fixo. As folhas contêm ferro, sódio e vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina e ácido ascórbico. Um peptídeo “insulina-like” hipoglicemiante, "polipeptídeo-P", está presente e foi isolado a partir do fruto, sementes e tecidos da planta. Sementes do Melão-de-são-caetano podem conter 32% de óleo, constituído de ácidos esteárico, linoleico e oleico e as glicoproteínas ricina, α -momorcharina e β -momorcharina e lectinas. Moléculas semelhantes à insulina também têm sido encontradas nas sementes (DERMARDEROSIAN; BEUTLER; 2005).

Já foi reportada a presença de inibidores de tripsina, elastase, guanilato ciclase, α -glucosidase-“like”-D-(+)-trealose, bem como inibidores “proteínas-like” do vírus HIV (BEGUM *et al.*; 1997; GROVER; YADAV; 2004; MURAKAMI *et al.*; 2001; YASUDA *et al.*; 1984).

Quanto às suas propriedades medicinais, na Índia essa planta é utilizada como antidiabética, abortiva, antihelmíntica, anticoncepcional, antimalária e laxante. É ainda usada para tratamento da dismenorréia, eczema, como emenagoga, galactogoga, gota, icterícia, disfunções renais (pedra), hanseníase, leucorreia, pneumonia, psoríase, reumatismo e sarna (GROVER; YADAV; 2004). Em Togo, na África Ocidental (BELOIN *et al.*; 2005), o Melão-de-são-caetano é principalmente utilizado para problemas gastrointestinais e infecções viróticas em crianças, embora uma gama maior de usos também seja citada, como para tratamento de febre causada por infecções e diabetes. No Brasil, segundo Rodrigues e Carvalho (2001), a *Momordica charantia* é uma planta colonizadora do cerrado e as folhas frescas ou secas são usadas como antileucorreica, emenagoga, vermífuga e em diabetes; já as folhas frescas nas dermatoses e sarnas e o fruto nas hemorroidas.

Considerando que os estudos etnofarmacológicos nos diversos países em que essa planta é utilizada apresentam o seu uso como antidiabética, que pesquisas para avaliar essa atividade têm sido amplamente realizadas; nas quais todas as partes da planta (polpa de frutas, sementes, folhas e planta inteira) mostraram atividade hipoglicemiante em animais normais ou induzido por estreptozotocina, bem como modelos genéticos de diabetes (GROVER; YADAV; 2004). No entanto, os constituintes responsáveis pela atividade de reduzir a glicose ainda não são conhecidos, embora mais de cem artigos científicos tenham descrito a fitoquímica e as propriedades farmacológicas da planta (HARINANTENAINA *et al.*; 2006; TAN *et al.*; 2008).

Várias outras atividades têm sido investigadas como a atividade antibacteriana para a qual, tanto experimental quanto clinicamente tem sido demonstrado um amplo espectro de atividade; destacando-se os resultados para *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenterae*, *Streptomyces griseus*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* e o protozoário *Entamoeba histolytica* (KHAN; AL.; 1998; OGATA *et al.*; 1991; OMOREGBE; IKUEBE; IHIMIRE; 1996).

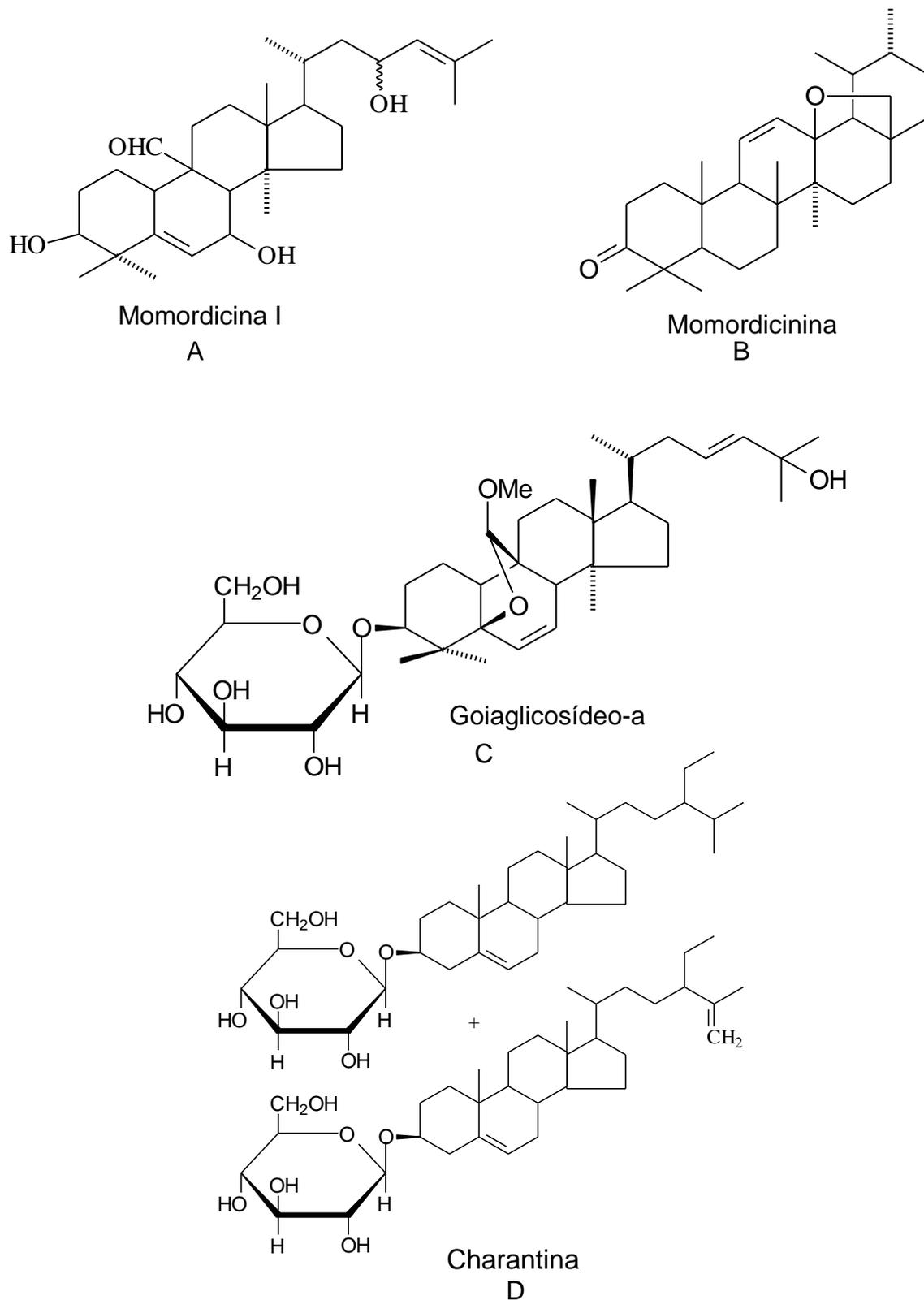


Figura 23 – Exemplos de compostos isolados de *Momordica charantia* L.
 Fonte_A – Yasuda *et al.* (1984); _B – Begum *et al.* (1997); _C – Murakami *et al.* (2001); _D – Pitipanapong *et al.* (2007)

Também foi relatada a ação de α -momorcharina como abortiva, supressora de tumor e anti-HIV (NG; CHAN; YEUNG; 1992). Outras substâncias também apresentaram ação antiviral, como β -momorcharina, lecitina e a uma proteína isolada denominada de MAP 30.

Outras atividades como anticâncer foram avaliadas e estudos demonstraram que α -momorcharina, β -momorcharina, momordina e cucurbitacina B apresentaram clinicamente a atividade de inibir a guanilato-ciclase ligada à patogênese da leucemia e outros cânceres (TAKEMOTO; DUNFORD; MCMURRAY; 1982; TAKEMOTO *et al.*; 1982). Outros estudos realizados com o extrato bruto de *Momordica charantia* e com várias frações purificadas têm demonstrado atividade anticancerígena contra alguns tipos de cânceres (GANGULY; DE; DAS; 2000; SUN *et al.*; 2001).

Alguns estudos demonstraram a atividade abortiva e antifertilidade das proteínas de *M. charantia* (CHAN *et al.*; 1985; CHAN; TAM; YEUNG; 1984; LAW; TAM; YEUNG; 1983), bem como potente atividade antiespartogênica e antiesterogênica e androgênica em ratos do extrato alcoólico das sementes de *M. charantia* apresentaram (NASEEM *et al.*; 1998).

Outras atividades reportadas foram antiúlcera (GURBUZ *et al.*; 2000; MATSUDA *et al.*; 1999), antimalária (KOHLENER *et al.*; 2002; MUNOZ *et al.*; 2000) e imunomodulatória, tendo efeitos variáveis, desde imunossupressivos a imunoestimulantes (CUNNICK *et al.*; 1990; LEUNG; YEUNG; LEUNG; 1987; SPREAFICO *et al.*; 1983; ZHENG; BEN; JIN; 1999).

Um recente trabalho demonstrou a ação do extrato aquoso dos frutos verdes de *Momordica charantia* e da substância purificada a partir do extrato, a momordicatina (Figura 24), contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* com CI_{50} de 0,6 mg/mL e 0,02 mg/mL, respectivamente. Quando administrado no modelo animal para leishmaniose visceral, 100% de inibição da parasitemia foi obtida na dose de 300 mg/kg de peso corporal do extrato bruto e 10 mg/kg de peso momordicatina. O mecanismo proposto foi pela inibição da enzima superóxido dismutase (SOD) do parasito, enzima chave do metabolismo oxidativo de *Leishmania* (GUPTA *et al.*; 2010).

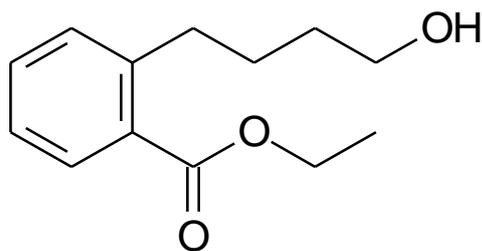


Figura 24 – Estrutura da momordicatina
Fonte – Gupta *et al.* (2010)

De forma geral, em relação à toxicidade, o melão-de-são-caetano mostrou-se seguro já que não houve sinais de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e qualquer influência negativa sobre o peso dos órgãos em crescimento e parâmetros hematológicos em animais experimentais quando ingerido em doses baixas por 2 meses (PLATEL; SHURPALEKAR; SRINIVASAN; 1993; VIRDI *et al.*; 2003). No entanto, baixa toxicidade de todas as partes da planta também são relatadas quando ingerida, embora a morte em animais de laboratório tenha sido relatada quando o extrato em altas doses foi administrado por via intravenosa ou por via intraperitoneal (KUSAMRAN; RATANAVILA; TEPUSWAN; 1998). Os frutos e as sementes apresentaram maior toxicidade do que as folhas ou as partes aéreas da planta (GROVER; YADAV; 2004).

2.5.2 Cucurbitacinas

As cucurbitacinas constituem um grupo de diversas substâncias triterpenoides que são bem conhecidas pela sua amargura e toxicidade (CHEN *et al.*; 2005). São triterpenos altamente oxigenados, com o esqueleto biogeneticamente incomum 19(10→9β)-abeo-10α-lanostano (cucurbitano) (Figura 25), que podem ser encontrados livres ou glicosilados. São classificadas de acordo com suas funcionalidades no anel A, modificações na cadeia lateral e considerações estereoquímicas. Inicialmente, essas moléculas isoladas recebiam a denominação de cucurbitacina seguida de uma letra, de acordo com a cronologia do isolamento/elucidação estrutural; mas não se constitui uma regra geral, tendo diversos nomes para esses compostos (VALENTE; 2004).

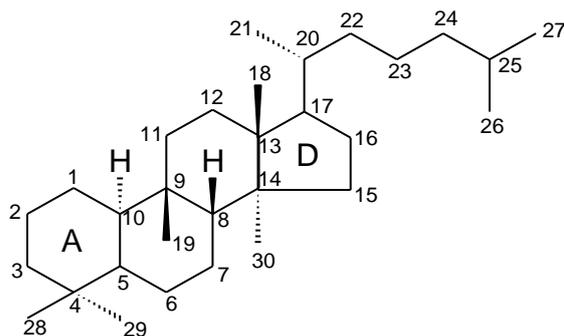


Figura 25 – Esqueleto cucurbitano

Fonte – Valente (2004)

As cucurbitacinas foram originalmente isoladas como os princípios amargos das cucurbitáceas e mais tarde foram encontradas glicosiladas ou não em plantas das famílias Brassicaceae, Scrophulariaceae, Begoniaceae, Elaeocarpaceae, Datisceae, Desfontainiaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Sterculiaceae, Rosaceae e Thymelaeaceae. Mais recentemente, foram isoladas de diferentes gêneros de cogumelos, incluindo *Russula* e *Hebeloma*, e até de moluscos (CHEN *et al.*; 2005).

Segundo Valente (2004), essas substâncias têm despertado grande interesse devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, tais como citotóxica, antitumoral, anti-inflamatória, antifertilizante, fagorrepeleante, hepatoprotetora e antimicrobiana, entre outras, fato também comentado por Chen *et al.* (2005).

Entre os metabólitos secundários de *M. charantia*, triterpenoides tipo-cucurbitano são um dos principais constituintes bioativos. Estes compostos e suas agliconas mostraram alguns efeitos biológicos benéficos ao diabetes e à obesidade, além de apresentarem outras atividades farmacológicas e biológicas, incluindo anticâncer, anti-*HIV* e atividade anti-oviposição (BELOIN *et al.*; 2005; GROVER; YADAV; 2004; RAMAN; LAU; 1996).

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivos gerais*

Avaliar atividades biológicas de espécies vegetais utilizadas na medicina popular em Mato Grosso do Sul em busca de substâncias bioativas e avaliar o potencial anti-*Leishmania* da espécie *Momordica charantia* Linn.

3.2 *Objetivos específicos*

- Selecionar espécies de plantas medicinais do Cerrado sul-mato-grossense;
- Preparar os extratos brutos das espécies coletadas;
- Realizar os seguintes testes de avaliação de atividades: antibacteriana, antifúngica, anti-*Leishmania*, antirradicalar e teste de citotoxicidade;
- Selecionar um extrato para fracionamento e isolamento das substâncias, por meio de estudo biomonitorado, caracterizando-as quimicamente;
- Avaliar o perfil anti-*Leishmania* do extrato, frações e substâncias puras de *Momordica charantia* L.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

Inicialmente, baseando-se em estudos etnobotânicos realizados na região do Cerrado/Pantanal, uma relação de plantas utilizadas pela população como medicinais foi pré-selecionada (Tabela 1) em função de serem utilizadas pelas comunidades, com poucos estudos fitoquímicos ou farmacológicos e/ou pertencerem a famílias ricas em metabólitos secundários. Essa relação foi apresentada a um raizeiro da região de Bonito/MS, o Sr. Eugênio Vargas Alves, para ser coletada com auxílio da Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural do Estado de Mato Grosso do Sul – AGRAER/MS, conforme a abundância dessas ou de outras plantas igualmente tidas como medicinais pela população.

Tabela 1 – Lista das espécies vegetais pré-selecionadas para o estudo.

Espécie	Família	Nome Popular	Parte Usada	Indicações
<i>Anemopaegma arvense</i>	Bignoniaceae	Catuaba	Raiz, casca do caule e folha	Esgotamento nervoso, impotência sexual
<i>Austroplenkia populnea</i>	Celastraceae	Marmelinho do campo	Ramos com folhas	Alergias, feridas
<i>Cariniana legalis</i>	Lecythidaceae	Jequitibá		Inflamação da garganta
<i>Clavija nutans</i>	Theophrastaceae	Porangaba		Emagrecedor, inflamações nos rins
<i>Clitoria guianensis</i>	Leguminosae	Vergateza	Raiz	Diurética, nas cistites, laxante
<i>Erythrina dominguezii</i>	Leguminosae	Maleitoso		Infecções do intestino, estômago, emagrecedor, diabete
<i>Eupatorium maximilianii</i>	Asteraceae	Picão-roxo	Folhas	Cura de feridas
<i>Gochnatia barrosii</i>	Asteraceae	Assa-peixe	Ramos com folhas	Debilidade geral, tosse

Tabela 1 – (Cont.)...

Nome Científico	Família	Nome Popular	Parte Usada	Indicações
<i>Hancornia speciosa</i>	Apocynaceae	Mangaba	Látex	Diabetes, obesidade e dermatoses
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Leguminosae	Jatobá	Casca do caule, resina e polpa do fruto	Bronquites, adstringente, afecções da bexiga
<i>Lupha</i> sp	Cucurbitaceae	Buchinha		Sinusite
<i>Macrosiphonia velame</i>	Apocynaceae	Velame-branco	Folha, raiz e látex	Gripe, antisifilítico, depurativo
<i>Palicourea coreacea</i>	Rubiaceae	Douradinha		Depurativo, diurética
<i>Pterodon emarginatus</i>	Leguminosae	Sucupira	Folha, fruto e raiz	Reumatismo, dores na garganta, verrugas
<i>Rotala ramosior</i>	Lythraceae	Sete-sangrias		Pressão alta, arteriosclerose, infecções cutâneas
<i>Rudgea viburnioides</i>	Rubiaceae	Congonha-de-Bugre	Casca, raiz e folha	Antisifilítico, antirreumático, anemia
<i>Trixis divaricata</i>	Asteraceae	Solidônia	Folhas e ramos jovens	Conjuntivite, bronquites, gripes
<i>Vernonia ferruginea</i>	Asteraceae	Assa-peixe-branco	Folhas, raiz e flor	Depurativa, diurética
<i>Vernonia polyanthes</i>	Asteraceae	Assa-peixe	Planta toda	Antifebril, pneumonias, gripes
<i>Zeyheria montana</i>	Bignoniaceae	Bolsa-de-pastor	Casca da raiz	Afecções da pele, antisifilítica

Fonte: Rodrigues (1998); Vila Verde *et al.* (2003) e Nunes *et al.* (2003)

A partir dessa pré-seleção, foram coletadas 14 espécies de plantas (Tabela 2), cujo material botânico foi identificado pelos botânicos da UFMS Dra. Ubirazilda Rezende, Dr. Arnildo Pott e Dra. Vali J. Pott.

4.2 Preparo dos extratos

Todos esses procedimentos foram realizados no laboratório de Química LP1 do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFMS, sob a responsabilidade do Dr. Walmir Silva Garcez.

Reagentes e equipamentos:

Etanol P.A.- Synth

Moinho de facas

Rotaevapovador

Freezer a 20 °C

Procedimentos: As partes selecionadas de cada planta foram separadas, secas ao ar livre e trituradas a pó em moinho. O material pulverizado foi submetido à extração com etanol à temperatura ambiente e submetido ao processo de maceração exaustiva. Após a filtração, o solvente foi eliminado por destilação a pressão reduzida em aparelho rotatório à temperatura de 40 °C, obtendo-se os extratos brutos de cada material vegetal. Esses extratos foram mantidos em freezer a -20 °C até a realização dos ensaios biológicos.

4.3 Avaliação biológica dos extratos

Todos os extratos obtidos foram avaliados em todos os testes de atividades biológicas realizadas neste trabalho. A espécie de planta medicinal que apresentou o melhor perfil de atividade biológica dentre as atividades testadas foi selecionada para ser submetida ao fracionamento biomonitorado pela atividade biológica a qual foi ativa.

4.3.1 Ensaio de atividade antibacteriana

Todos os procedimentos de avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados no laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS, sob a responsabilidade da Dra. Marilene Chang.

Protocolo: Método de microdiluição - CLSI M7-A6.

Reagentes:

Ágar Mueller Hinton

Caldo Mueller Hinton

NaCl

Antimicrobiano: cloranfenicol

Cepas:

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Preparação do inóculo: O inóculo foi preparado fazendo-se uma suspensão direta em solução salina de colônias isoladas e selecionadas numa placa de ágar (meio não seletivo) de 18-24 horas. A suspensão foi ajustada para que sua turbidez equivalesse a uma solução padrão de McFarland 0,5, correspondente a 1 a 2×10^8 UFC/mL e em seguida essa suspensão foi diluída 1:10 em caldo Mueller Hinton para atingir a concentração 10^7 UFC/mL.

Preparação das amostras: A solução estoque das amostra ($20.000 \mu\text{g/mL}$ em DMSO) foi solubilizada em meio de cultura Mueller Hinton, de forma que a concentração final do DMSO não fosse superior a 2%, e diluída nas concentrações finais em série no interior dos poços de 1000 a $7,8125 \mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*; 1982).

Procedimentos: Inicialmente, foram colocados $100 \mu\text{L}$ de meio em todos os poços em placa de 96 poços, exceto nos poços destinados a colocar as amostras em maior concentração. Em seguida, foram colocados $200 \mu\text{L}$ das amostras em uma concentração de $2000 \mu\text{g/mL}$ nos poços de maior concentração, retirando-se $100 \mu\text{L}$ de cada poço e colocando-os no poço seguinte, repetindo-se o procedimento para o próximo poço, e assim sucessivamente, obtendo uma diluição progressiva das amostras. Cada diluição em duplicata. Distribuiu-se $100 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo de concentração final de 5×10^4 UFC/mL em todos os poços, menos nos poços de

controle de esterilidade e poços para o branco, que continha apenas os extratos na maior concentração. As placas foram incubadas a 35 °C por 16 – 20 hs. Fez-se o controle positivo com cloranfenicol, na concentração estabelecida pelo protocolo CLSI M7-A6 e o controle negativo foi constituído de meio e bactéria. Após o período de incubação, fez-se a leitura para determinação da CIM visualmente, por meio da comparação do grau de turvação dos poços com o controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata. Foram considerados ativos as amostras com CIM \leq 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2 Ensaio de atividade antifúngica

Protocolo: Método de microdiluição - CLSI M 27-A2

Reagentes:

Ágar Sabouraud

Meio RPMI 640 com MOPS

NaCl

Antifúngicos: Fluconazol e Anfotericina B

Cepas:

Candida albicans (ATCC 10231)

Candida krusei (ATCC 6258)

Cryptococcus neoformans (ATCC 32264)

Preparação do inóculo: O inóculo foi preparado fazendo-se uma suspensão direta em solução salina de colônias isoladas selecionadas numa placa ágar Sabouraud de 24/h para espécies de *Candida* ou cultura de 48/h para *Cryptococcus neoformans*. A suspensão foi ajustada para que sua turbidez equivalesse a uma solução padrão de McFarland 0,5, correspondente a 1 a 5 x 10⁶ células/mL, em seguida essa suspensão foi diluída 1:100, seguida de uma diluição 1:20 em meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração 5,0 x 10² a 2,5 x 10³ células por mL.

Preparação das amostras: A solução estoque das amostras (20.000 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO) foi solubilizada no meio de cultura RPMI 1640, de forma que a concentração final do DMSO não fosse superior a 2%, e diluídas nas concentrações finais em série no interior dos poços de 1000 a 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*; 1982).

Procedimentos: Inicialmente, foram colocados 100 μL de meio em todos os poços em placa de 96 poços, exceto nos poços destinados a colocar as amostras em maior concentração. Em seguida, foram colocados 200 μL das amostras em uma concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ nos poços de maior concentração, retirando-se 100 μL de cada poço e colocando-os no poço seguinte, repetindo-se o procedimento para o próximo poço, e assim sucessivamente, obtendo uma diluição progressiva das amostras. Cada diluição em duplicata. Distribuiu-se 100 μL da suspensão do inóculo de concentração final de $5,0 \times 10^2$ células/mL em todos os poços, menos nos poços de controle de esterilidade e poços para o branco, que continham apenas os extratos na maior concentração. As placas foram incubadas a 35 °C por 48/h, para as espécies de *Candida* e por 72/h para *Cryptococcus neoformans*. Fez-se o controle positivo com fluconazol ou anfotericina B na concentração estabelecida pelo protocolo CLSI M27-A2 e o controle negativo era constituído de meio e fungo. Após o período de incubação, fez-se a leitura para determinação da CIM, visualmente, por meio da comparação do grau de turvação dos poços com o controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata. Foram considerados ativos as amostras com $\text{CIM} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$.

4.3.3 Ensaio de atividade anti-*Leishmania*

Todos os procedimentos de atividade anti-*Leishmania* foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, sob a responsabilidade do Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos.

4.3.3.1 Ensaio de atividade anti-*Leishmania* em promastigotas

Reagentes e equipamentos:

Meio Schneider – Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA

Soro fetal bovino inativado pelo calor e estéril

MTT (brometo de tetrazólio tiazolil Blue) – Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)

DMSO

Antibióticos: estreptomicina e penicilina

Fármaco anti-*Leishmania*: pentamidina

Leitor μ Quant (Bio-Tek Instruments, Winooski, EUA)

Cepas:

Leishmania amazonensis (MHOM/BR/77/LTB0016)

Manutenção: Promastigotas foram mantidas a 26 °C em meio Schneider, pH - 6,9, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL penicilina. Os parasitos foram mantidos em cultura até a décima passagem. Posteriormente, novas culturas foram obtidas a partir de animais infectados.

Procedimentos: A atividade leishmanicida foi testada *in vitro*, em cultura de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O efeito do extrato sobre a viabilidade de formas extracelulares de *L. amazonensis* foi determinado pelo ensaio do MTT. Células em fase exponencial foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 1×10^6 promastigotas/mL e transferidas para placas de 96 poços. As células foram incubadas por 72h na presença de várias concentrações das amostras, em triplicata, e mantidas a 27 °C. Após a incubação, 22 microlitros de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionadas por poço e as placas foram incubadas por mais 2h. Em seguida, 80 μ L DMSO foram adicionados e a densidade óptica foi lida a 570 nm em um leitor μ Quant. Os extratos brutos a serem testados foram dissolvidos em DMSO e diluídos no próprio meio de cultura, de modo que a concentração de DMSO fosse até 1% (v/v) de DMSO por poço, concentração que não tem nenhum efeito sobre o crescimento do parasito. Os resultados foram expressos como a concentração de inibição de crescimento do parasito em 50% (CI_{50}). A concentração de partida para a seleção foi 50 μ g/mL e a pentamidina foi o composto de referência. Extratos com $CI_{50} \leq 50$ μ g /mL foram considerados ativos (TORRES-SANTOS *et al.*; 2004).

4.3.3.2 Ensaio de atividade anti-*Leishmania* em amastigota

O ensaio para avaliação da atividade anti-*Leishmania* em amastigota foi realizado apenas no extrato que apresentou a melhor atividade em promastigota e sua respectiva subfração.

Reagentes e equipamentos:

Meio RPMI 1640 com HEPES

Soro fetal bovino inativado pelo calor e estéril

Antibióticos: estreptomicina e penicilina

L- glutamina

Piruvato de sódio

Camundongos

Lab-Tek Chamber Slide – Nunc

Panótipo rápido – Instant Prov®

Fixador - Entelan®

Estufa a 5% de CO₂

Procedimentos: Para avaliação da atividade sobre amastigotas, macrófagos peritoneais murinos foram infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos foram retirados por lavagem peritoneal, plaqueados e infectados diretamente pelas formas promastigotas em câmaras LAB-TEK (NUNC). As células foram incubadas com as amostras em concentrações variadas por 72h a 37 °C, com 5% de CO₂. Após o período de incubação, a atividade anti-amastigota foi avaliada microscopicamente, corando-se as câmaras com panótico rápido e contando pelo menos 200 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF), utilizando a fórmula: $IF = \% \text{ células infectadas} \times \text{número de amastigota} / \text{número total macrófagos}$.

4.3.4 Ensaio de a citotoxicidade sobre *Artemia salina*

Todos esses procedimentos foram realizados no laboratório de Química LP1 do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFMS, sob a responsabilidade do Dr. Waldir Silva Garcez.

Reagentes:

Solução salina (3,8 g/L, NaCl)

Ovos de *Artemia salina*

Procedimentos: A uma solução salina (3,8g/L) foram adicionados ovos de *A. salina*, os quais eclodiram em 48 horas. As amostras foram preparadas nas

concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL, todas em triplicata. A cada amostra foram adicionados 5mL de solução salina contendo 10 microcrustáceos (*A. salina*) e após 24 horas registrou-se o número de sobreviventes. O cálculo dos valores de DL₅₀ foi feito utilizando o método de análise Probit. Foram considerados ativos as amostras com DL₅₀ ≤ 1000 µg/mL.

4.3.5 Ensaio de atividade antirradicalar

Todos esses procedimentos foram realizados no laboratório de Química LP1 do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFMS, sob a responsabilidade do Dr. Walmir Silva Garcez.

Reagentes:

DPPH - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA

BHT

Procedimentos: A atividade antirradicalar dos extratos foi determinada pelo método de DPPH de radicais livres. A 100 µL de solução etanólica de DPPH 0,04% foram misturados 100 uL de uma solução de amostra de concentração inicial de 200 µg/mL em etanol e, após 30 minutos de repouso, a absorbância da mistura foi medida em 517 nm, tendo o etanol como o branco. Atividade antioxidante do butil-hidroxitolueno (BHT) foi investigada como controle para comparar com os extratos. Medições foram realizadas em triplicata e a atividade antioxidante foi calculada pela seguinte equação (DICKSON; HOUGHTON; HYLANDS; 2007).

$$\text{Atividade sequestradora de DPPH (\%)} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

onde,

A0 = absorbância do controle (Solução de DPPH);

A1 = absorbância na presença dos extratos.

Um gráfico de porcentagem de inibição em função da faixa de concentração (200 – 6,25 µg/mL) foi desenvolvido e CI₅₀ determinada através de regressão linear pelo programa Excel. Extratos com CI₅₀ ≤ 200 µg/mL foram considerados ativos (DICKSON; HOUGHTON; HYLANDS; 2007).

Em virtude da espécie *Momordica charantia* L. ter mostrado uma atividade bem específica e muito significativa quanto à ação anti-*Leishmania* e considerando a importância das leishmanioses na região Centro-Oeste e em Mato Grosso do Sul, que essa planta foi selecionada para o estudo biomonitorado em busca de substâncias com potencial leishmanicida.

4.4 Determinação quantitativa de taninos

Todos esses procedimentos foram realizados no laboratório de Química LP1 do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFMS, sob a responsabilidade do Dr. Walmir Silva Garcez.

Reagentes:

Reativo de Folin-Denis
Solução de carbonato a 20%
Ácido tânico
Pó de pele cromada (Merck)
Espectrofotômetro

Procedimentos:

Determinação dos polifenóis totais: Uma alíquota do extrato concentrado aquoso foi diluída. A 0,5 mL desta solução diluída adicionou-se 0,5 mL do reativo de Folin-Denis e 5 mL de solução de carbonato de sódio 20%. Após vinte minutos, a medida de absorbância da solução resultante foi determinada em espectrofotômetro a 660 nm. Utilizou-se como padrão uma solução de ácido tânico a 8 mg %. A alíquota retirada do extrato concentrado aquoso foi diluída de modo a se obter uma absorbância na faixa de 0,3 a 0,6.

Determinação dos polifenóis não tanantes: Partiu-se de uma solução cinco vezes mais concentrada que a solução do extrato empregada na determinação dos polifenóis totais. A 5 mL desta solução mais concentrada foram adicionados 50 mg de pó de pele cromada. A mistura permaneceu sob agitação por 1 hora. Após esse período, o material foi filtrado através de papel de filtro. Deste filtrado foram retirados 2 mL e diluídos a 10 mL com água destilada. Esta solução foi utilizada para a

determinação dos polifenóis não adsorvidos no pó de pele (não tanates), de maneira idêntica à descrita para os polifenóis totais.

Teor de taninos da amostra analisada: A diferença entre o teor em polifenóis totais (expresso em g% do peso da planta seca) e o teor em polifenóis não tanantes corresponde aos polifenóis que foram adsorvidos no pó de pele, ou seja, o teor (em g% do peso da planta seca) de substâncias tanantes na espécie analisada (ASQUITH *et al.*; 1985).

4.5 Estudo químico biomonitorado

4.5.1 Partição e fracionamento do extrato bruto de *M. charantia*

Os 53,13 g do extrato bruto etanólico de *Momordica charantia* (EBMC) foram solubilizados em uma solução hidrometanólica (8:2) (Synth) e submetidos ao processo de partição com 3 porções de hexano (Synth), separando a fase hexânica (FHMC). Em seguida, o mesmo processo foi repetido com o acetato de etila (Synth), obtendo-se ao final, as fases acetato de etila (FAcMC) e hidrometanólica (FHMMC) (Figura 26). Essas fases foram concentradas em rotaevaporador e submetidas aos ensaios anti-*Leishmania*, sendo que a fração FAcMC foi a mais ativa, sendo submetida ao processo de fracionamento em coluna de sílica-gel.

Parte da fração FAcMC foi submetida ao processo de fracionamento dissolvendo-a em uma pequena quantidade de metanol e incorporando-a em sílica gel 80-230 mesh, obtendo-se uma pastilha, a qual foi submetida ao processo de fracionamento em coluna de sílica gel 80-230 mesh e eluída com os solventes em gradiente crescente de polaridade, iniciando por hexano:acetato de etila (9:1) até metanol, obtendo-se 29 frações. Essas frações foram analisadas comparativamente por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como eluente hexano:acetato de etila (7:3), reveladas por vanilina (solução a 1% em etanol) e aquecidas em placas de aquecimento – Fisaton – a 100 °C até o aparecimento das manchas. Ao final foram reunidas as semelhantes, resultando em 14 frações (FAcMC-F1 a F14), as quais foram submetidas ao ensaio *anti-Leishmania* (Figura 26).

A fração FAcMC-F7 foi a mais ativa no bioensaio e por esta razão foi submetida a um outro fracionamento em sephadex LH-20 em clorofórmio, obtendo-se 11 frações (FAcMC-F7/F1 a F11); as quais também foram submetidas ao bioensaio anti-*Leishmania*, sendo que 3 frações apresentaram-se mais ativas (Figura 26): FAcMC-F7/F1, FAcMC-F7/F3 e FAcMC-F7/F5.

4.5.2 Fracionamento e purificação da substância CC1

A fração FAcMC-F7/F3 foi submetida a uma cromatografia flash – 200-400 mesh, com eluente hexano:acetato de etila (6:4), obtendo-se 11 frações (MC-F7/F3-F1 a F11), das quais a fração MC-F7/F3-F3 mostrou-se por meio da análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear – RMN – unidimensionais ^1H , ^{13}C e DEPT 135°, registrados no espectrômetro Bruker, modelo DPX-300, operando a 300 MHz para hidrogênio (H) e a 75 MHz para carbono-13, tratar-se de uma substância pura que foi denominada de **CC1** (Figura 27).

4.5.3 Fracionamento e purificação da substância CC2

A fração FAcMC-F7/F5 foi submetida a uma análise em CLAE em coluna analítica C-18 [base sílica derivatizada com grupo octil – 4,6 mm/250, partícula de 15 μ , poro de 100 Å de diâmetro - Shimadzu], fluxo 0,5 mL/min: eluição no modo gradiente exploratório iniciando por acetonitrila:água (50:50) até a proporção de acetonitrila (ACN) 100%, detector UV 210 nm, com alíquotas de 5 μL de cada injeção para determinar a condição mais adequada de separação em coluna semipreparativa. Após várias análises, chegou-se à condição de coluna C8 [base sílica derivatizada com grupo octil – 4,6 mm/250 mm, partícula de 15 μ , poro de 100 Å de diâmetro – Shimadzu], fluxo 0,7 mL: eluente acetonitrila:água (60:40) e detector a 230 nm.

A fração foi então solubilizada em ACN, pré-filtrada em algodão e depois em filtro millipore de 2 μm . No entanto, houve a formação de um resíduo que não se dissolvia, o qual foi separado. O filtrado foi submetida à CLAE em coluna semipreparativa C8 [base sílica derivatizada com grupo octil – 20 mm/250 mm,

partícula de 15 μ , poro de 100 Å de diâmetro – Shimadzu] fluxo 14 mL/min com eluente ACN:H₂O (60:40), detector de UV a 230 nm, com alíquotas de 0,7 mL de cada injeção, obtendo-se 4 frações.

O resíduo obtido e separado foi ressuspenso em metanol e analisado pelas técnicas de RMN unidimensionais ¹H, ¹³C e DEPT 135°. Após essa análise constatou tratar-se de uma substância pura, a qual foi denominada de **CC2** (Figura 27).

4.5.4 Fracionamento e purificação das substâncias CC3 a CC5

A fração FAcMC-F7/F1 foi submetida a uma coluna flash – 200 – 400 mesh, cujo eluente foi hexano:acetato de etila:metanol (6:4:0,5), obtendo-se após a reunião, 9 frações (MC-F7/F1-F1 a F9). Dessas, a fração MC-F7/F1-F2 após a análise pelas técnicas de RMN unidimensionais ¹H, ¹³C e DEPT 135° verificou tratar-se de uma substância pura e foi denominada de **CC3**.

As frações MC-F7/F1-F3 e MC-F7/F1-F4 obtidas deste procedimento foram submetidas a uma purificação por cromatografia preparativa, utilizando-se placas preparativas de 20 x 20 cm, sílica gel 60 PF₂₅₄, eluente: hexano:acetato de etila:metanol (6:4:0,5), corridas duas vezes e visualizadas por irradiação de luz ultravioleta – Monitor UV de mão, modelo UVGL – 25, UVP com lâmpada Black Ray de 254 e 365 nm. Após a demarcação das manchas separadas, a sílica com as substâncias separadas foi raspada para um funil sinterizado e lavada com acetato de etila purificado (Synth). Em seguida, o solvente foi evaporado e obtendo-se de cada fração uma substância isolada, que foram denominadas de **CC4** e **CC5**, respectivamente (Figura 27).

As cinco substâncias isoladas foram submetidas ao ensaio de atividade anti-*Leishmania* em promastigotas.

4.5.5 Identificação estrutural das substâncias isoladas com atividade anti-*Leishmania*

A identificação e/ou elucidação estrutural das cinco substâncias (CC1 a CC5) isoladas durante a investigação fitoquímica monitorada pelo ensaio de atividade anti-

Leishmania da parte aérea de *Momordica charantia* L. e que foram denominadas de CC1 a CC5, foi realizada com base na análise de dados de RMN unidimensionais ^1H , ^{13}C e DEPT, das técnicas de RMN bidimensionais HSQC, HMBC, NOESY e COSY e por comparação com dados da literatura.

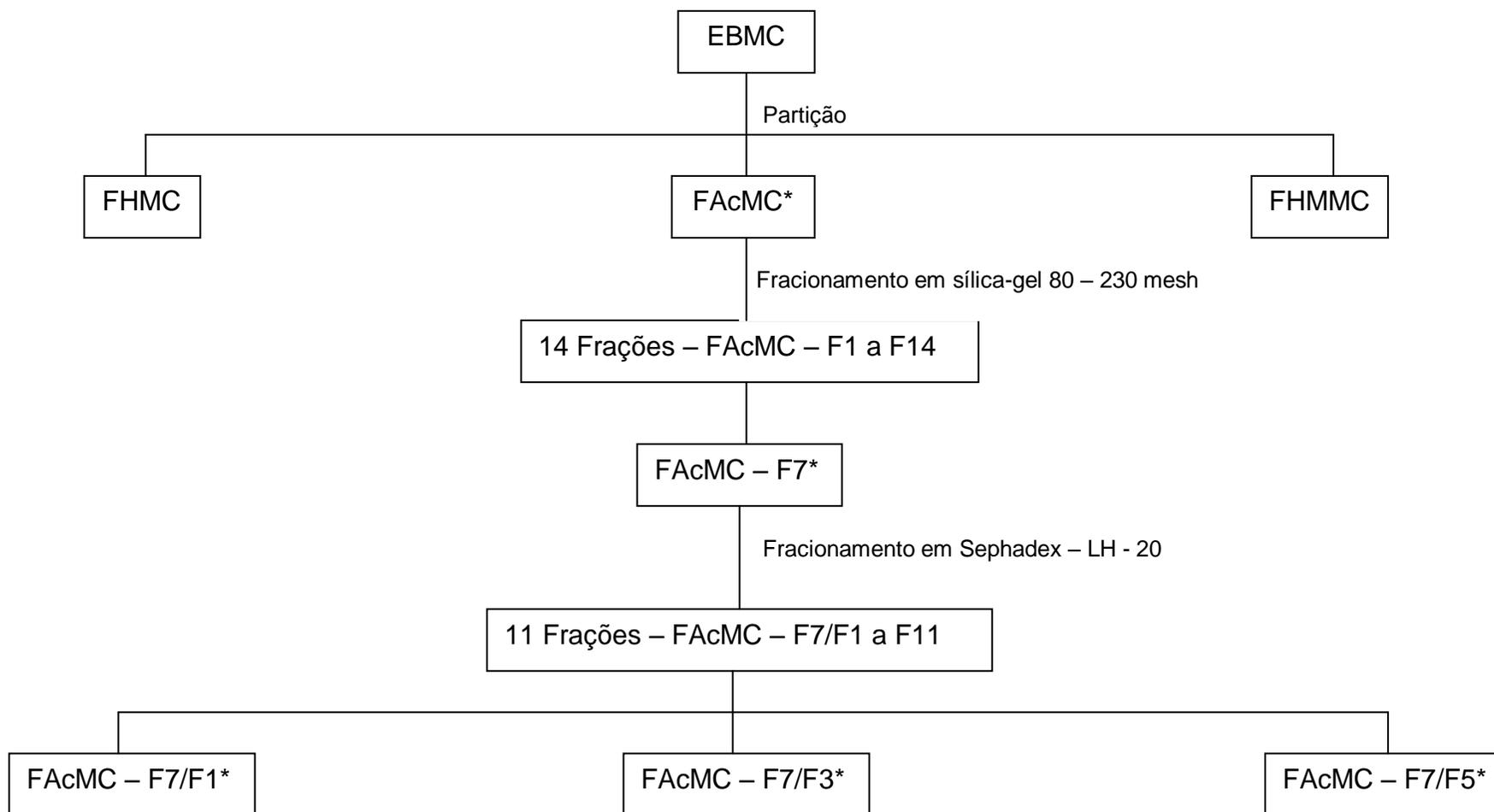


Figura 26 – Fracionamento biomonitorado por ensaio antileishmania do extrato bruto etanólico de *Momordica charantia* (EBMC) para obtenção de substância bioativa

* Frações ativas selecionadas para posterior fracionamento

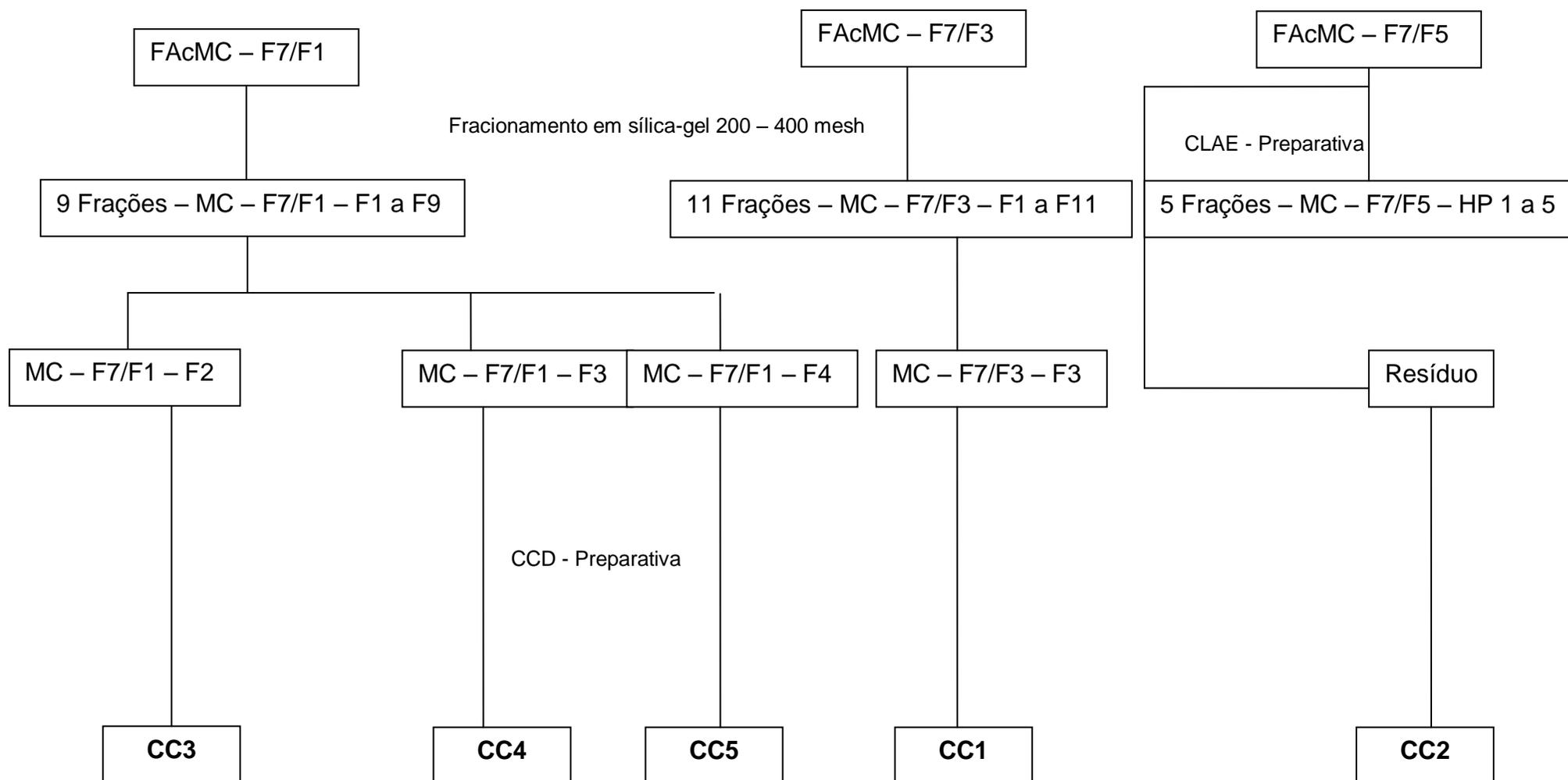


Figura 27 – Fracionamento e obtenção de substâncias puras de *Momordica charantia*, denominadas de CC1 a CC5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho trata do estudo de plantas medicinais utilizadas em Mato Grosso do Sul, visando investigar suas atividades biológicas e a caracterização dos princípios ativos. Nesta etapa, foram coletadas catorze espécies e preparados seus extratos, os quais foram avaliados quanto às atividades antibacteriana, antifúngica, anti-*Leishmania*, antirradicalar e citotóxica. Desta etapa inicial, foi selecionada uma espécie para a investigação biomonitorada pelo teste anti-*Leishmania* e caracterização do(s) seu(s) princípio(s) ativo(s).

A seguir são discutidos os resultados deste trabalho.

5.1 Coleta e identificação do material vegetal

As catorze espécies de plantas que foram coletadas estão discriminadas na Tabela 2.

Houve uma pré-seleção de vinte plantas tidas como medicinais pela população da região circunscrita pelo Cerrado, o que inclui o estado de Mato Grosso do Sul, pois o objetivo deste trabalho foi centrado na busca de substâncias bioativas em plantas, utilizando-se a etnofarmacologia como ferramenta. No entanto, em função da urbanização e do desmatamento, encontra-se cada vez mais difícil o acesso a essas plantas no seu habitat natural, sendo necessário percorrer longas distâncias, em locais de difícil acesso, para poder encontrá-las. Salienta-se que a questão da abundância das espécies na região de coleta foi o fator decisivo para a seleção das plantas a serem coletadas. Muitas espécies podem estar escassas devido à invasão de plantações ou de espécies exóticas, algumas já como colonizadoras. Por isso, embora tenha sido previsto 20 espécies, apenas 14 foram coletadas.

Outro aspecto a considerar é que a medicina popular continua sendo exercida pelos raízeiros, que são pessoas que detêm o conhecimento das plantas, seus nomes comuns, suas utilizações, suas formas de usos, bem como onde e como coletá-las. Assim sendo, um raízeiro da região de Bonito-MS foi escolhido para fazer a coleta das plantas pré-selecionadas, o qual se baseou no seu conhecimento a

partir dos nomes comuns das plantas, o que ocasionou alterações quanto às espécies pré-selecionadas e as que efetivamente foram coletadas.

Os problemas decorrentes do uso dos nomes comuns das plantas em detrimento dos nomes científicos são perfeitamente compreensíveis e se constitui num dos fatores que muitos autores consideram o grande problema em pesquisas que envolvem os conhecimentos etnobotânicos. A dificuldade está no fato de que dificilmente os pesquisadores ou botânicos participam da coleta das plantas medicinais e disto resultam incertezas na identificação das mesmas. Por isso, reforçam-se o cuidado, a interpretação das informações que todo pesquisador que esteja trabalhando com essa área deve ter e a averiguação das informações coletadas, confrontando em livros e outras bibliografias especializadas (HEDBERG; 1993; RATES; 2001; WALLER; 1993).

Assim, apenas quatro espécies pré-selecionadas foram coletadas, a *Anemopaegma arvense* (catuaba), *Clavija nutans* (porangaba/congonha de bugre), *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá) e *Vernonia ferruginea* (assa-peixe); que são espécies muito comuns na região, não tendo outras espécies relacionadas aos respectivos nomes populares.

Outras quatro plantas foram coletadas de acordo com a pré-seleção, mas que foram posteriormente identificadas como espécies diferentes das previstas inicialmente. Foram: a sucupira, coletada a espécie *Bowdichia virgilioides* em vez de *Pterodon emarginatus*; o marmelinho do campo como *Alibertia edulis* no lugar de *Austroplenkia polunea*; a sete-sangria, cuja espécie foi identificada como *Centratherum punctatum*, no lugar de *Rotala ramosior* e velame branco como sendo *Macrosiphonia petraea* e não a espécie *Macrosiphonia velame*.

Essas confusões, como já foi dito, são comuns quando se faz um estudo etnobotânico. A explicação para essas alterações pode ser em função de que a pré-seleção foi baseada em vários estudos etnobotânicos realizados em diferentes regiões que compõem o bioma cerrado, como Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, entre outros, o que pode explicar uma diferença de distribuição geográfica das espécies, na qual uma espécie pode predominar em uma região; além disso devido à ampla utilização de algumas espécies pelas populações locais, pode ter ocasionado sua escassez em detrimento da expansão de outras.

As outras seis espécies coletadas não foram previstas, como é o caso de *Momordica charantia*, que é na verdade uma planta colonizadora do Cerrado.

Tabela 2 – Identificação botânica das espécies coletadas e suas respectivas famílias, parte do material vegetal coletado e rendimento do extrato bruto etanólico.

Espécie	Família	Nome comum	Indicações	Parte	Peso (seco)	Extrato	Rendimento (%)
<i>Alibertia edulis</i>	Rubiaceae	Marmelinho do campo	Afecções da pele, calmante	Folha	44,18g	1,94g	4,4
				Galhos	104,44g	1,86g	1,8
<i>Anemopaegma arvense</i>	Bignoniaceae	Catuaba	Esgotamento nervoso, impotência sexual, doença venérea	Parte aérea	173,93g	16,87g	9,7
				Raiz	136,46g	5,24g	3,8
<i>Bowdichia virgilioides</i>	Leguminosae/ Faboideae	Sucupira	Adstringente e na diabetes	Folha	146,03g	24,18g	16,6
				Semente	20,15g	4,25g	21,1
				Tronco	205,50g	29,43g	14,3
<i>Celtis pubescens</i>	Ulmaceae	Taleira	Tosse	Folha	21,34g	0,93g	4,6
<i>Centratherum punctatum</i>	Asteraceae	Sete sangria	Febre, depurativo, doenças venéreas	Parte aérea	37,80g	2,77g	7,3
<i>Clavija nutans</i>	Teophrastaceae	Porangaba/Congonha de bugre	Emagrecedor, inflamações nos rins e bexiga, disenteria	Folha	165,67g	24,17g	14,6

Tabela 2 – (Cont.)...

Espécie	Família	Nome comum	Indicações	Parte	Peso (seco)	Extrato	Rendimento(%)
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Leguminosae/	Jatobá	Bronquites, tosses, afecções da bexiga, próstata	Folha	43,12g	9,09g	21,1
	Cesalpiridoideae			Casca	299,97g	53,03g	17,7
<i>Luehea paniculata</i>	Tiliaceae	Açoita-cavalo	Tumores	Folha	39,48g	2,55g	6,4
				Casca	210,30g	35,62g	16,9
<i>Macrosiphonia petraea</i>	Apocynaceae	Velame branco	Contra coceira	Parte aérea	9,91g	1,26g	12,7
				Raiz	42,10g	3,71g	8,8
<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	Melão de São Caetano	Antileucorreica, nas dermatoses, sarnas, diabetes	Parte aérea	38,29g	5,26g	13,7
<i>Maprounea guianensis</i>	Euphorbiaceae	Capitão		Folha	37,25g	8,93g	24,0
				Casca	209,98g	59,96g	28,6
<i>Melancium campestre</i>	Cucurbitaceae	Melancia do campo	Vermífugo e dores do ventre	Parte aérea	172,10g	47,19	27,4
<i>Vernonia ferruginea</i>	Asteraceae	Assa-peixe branco	Afecções pulmonares	Folha	33,19g	2,24g	6,7
				Galhos	85,45g	3,53g	4,1
Não Identificada	Não Identificada	Douradinha	-	Folha	130,75g	19,87g	15,2

5.2 Preparo dos extratos

Foram preparados 23 extratos de 14 espécies de plantas, considerando que mais de uma parte da planta de algumas espécies foi utilizada. A quantidade de material pulverizado disponível para a extração e o seu respectivo rendimento em extrato bruto encontram-se discriminados na Tabela 2.

Verifica-se que o rendimento de extrato em percentuais é muito variável, dependendo do órgão da planta e da espécie. Mas de maneira geral, a parte que menos rende são os galhos e a que mais rende são as cascas. Fatores como teor de água e a função que exerce na planta, podem determinar maior ou menor teor de substâncias nesses materiais.

As partes que mais foram coletadas foram as folhas, seguidas das partes aéreas. Se considerarmos que essas últimas são galhos com folhas, estas perfazem mais de 60% do material vegetal coletado. O fator determinante é a facilidade de coleta e a abundância desse material, pois quase toda planta o terá. A coleta de raiz sempre envolve o problema de se coletar a planta toda, por isso o estudo das raízes se restringe às ervas. Além disso há sempre o risco de levar à morte da planta quando se coleta raízes, caules e cascas, já que o dano causado pode ser irreversível.

Observando a Tabela 2, verifica-se que as folhas (24,0) e as cascas (28,6) da espécie *Maprounea guianensis* e as partes aéreas (27,4) de *Melancium campestre* foram os que tiveram o maior rendimento em termos de extrato em relação ao peso seco da planta. Fatores como a textura do órgão em questão podem influenciar o rendimento.

5.3 Avaliação biológica dos extratos

Todos os 23 extratos foram testados em todas as atividades biológicas propostas e o resumo dos resultados estão disponíveis na Tabela 3.

Para a atividade antibacteriana verifica-se que quatro espécies (28,6%), *Bowdichia virgilioides*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Luehea paniculata* e *Maprounea guianensis*; e seis extratos (26,1%), folha de *B. virgilioides*, casca de *H.*

stigonocarpa, folha e casca de *L. paniculata* e folha e casca de *M. guianensis* apresentaram atividade menor/igual a 500 µg/mL contra a cepa de *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva e nenhuma das espécies mostrou-se ativa para *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negativa. Essa variação de sensibilidade pode ser explicada pela diferença de membranas celulares entre os dois tipos de bactérias. As bactérias Gram-positivas têm apenas uma membrana celular, enquanto que as Gram-negativas têm duas, dificultando a penetração de extratos e substâncias aumentando, portanto, a resistência dessas bactérias (KONEMAN *et al.*; 1999).

Nove espécies (64,3%), *Alibertia sp*, *Anemopaegma arvense*, *Bowdichia virgilioides*, *Clavija nutans*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Luehea paniculata*, *Macrosiphonia petraea*, *Maprounea guianensis*, *Vernonia ferruginea*, apresentaram atividade para pelo menos uma cepa de fungo, na concentração menor/igual a 500 µg/mL. Destacam-se as atividades das folhas de *Bowdichia virgilioides*, sucupira ou sucupira-preta, e das folhas e cascas de *Maprounea guianensis*, capitão, que mostraram um CI_{50} de 31,25, 62,5 e 62,5 µg/mL, respectivamente. Diversos estudos fitoquímicos já foram realizados com a sucupira-preta, os quais demonstraram a presença de alcaloides (TORRENEGRA; BAUEREISS; ACHENBACH; 1989), flavonoides (VELOZO *et al.*; 1999), benzofuranoides e triterpenoides (MELO *et al.*; 2001); assim como o potencial antifúngico das folhas desta já havia sido demonstrado, mas para o fungo *Cladosporium sphaerospermum* (ALVES *et al.*; 2000).

O melhor potencial antifúngico foi apresentado pela *M. guianensis* que foi capaz de atuar nas três espécies de fungos testadas, com uma CIM bastante significativa. Um estudo indicou nessa espécie a presença de triterpenos e ferulatos de alquila (DAVID *et al.*; 2004). Esse gênero tem despertado interesse, pois trabalhos com *M. africana* revelaram a presença de triterpenos com forte atividade anti-*HIV* por meio da ação inibitória da transcriptase reversa (BEUTLER *et al.*; 1995) e um diterpeno novo denominado de maprouneacina, com atividade anti-hiperglicemiante (CARNEY *et al.*; 1999).

A descoberta de plantas com atividade antibacteriana e antifúngica são dados de grande importância se considerar que nas últimas décadas tem ocorrido rápido aparecimento e disseminação global de patógenos resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis. Além do mais tem havido uma diminuição na

velocidade de desenvolvimento de novas drogas, devido ao alto custo e também a diminuição dos recursos para a vigilância, controle e diagnóstico das doenças, em parte em função de uma equivocada percepção de que certas doenças transmissíveis têm sido controladas (MEMISH; VENKATESH; SHIBL; 2003).

Quanto à atividade anti-*Leishmania*, observa-se que 35,7% das espécies, *Bowdichia virgilioides*, *Centratherum punctatum*, *Momordica charantia*, *Melancium campestre*, *Vernonia ferruginea* e 26,1% dos extratos apresentaram atividade com $CI_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$. A planta que se destacou foi a *Momordica charantia* (MC), o melão-de-são-caetano, com uma CI_{50} de $6,25 \mu\text{g/mL}$. Essa planta apresenta vários estudos fitoquímicos que relatam a presença de morcharinas, charantina, cucurbitacinas, goyaglicosídeos, entre outros que foram isolados de todas as partes da planta. O seu potencial farmacológico também tem sido bastante investigado, principalmente o seu papel como agente anti-hiperglicemiante (GROVER; YADAV; 2004), além de alguns trabalhos que demonstraram sua ação anti-*Plasmodium falciparum* (KOHLENER *et al.*; 2002), antitripanosoma tanto para *Trypanosoma cruzi* quanto para *T. brucei brucei* (MESIA *et al.*; 2008) e antileishmania para as formas promastigotas de *L. donovani* e ação *in vivo* da substância isolada dos frutos de MC, a momordicatina (GUPTA *et al.*; 2010).

A avaliação da citotoxicidade pelo ensaio sobre a letalidade de *Artemia salina* apresentou um alto índice de plantas ativas, correspondendo a 42,8%. Algumas espécies apresentaram alto índice de letalidade como é o caso das sementes de *Bowdichia virgilioides*, com DL_{50} de $3,53 \mu\text{g/mL}$ e da raiz de *Macrosiphonia petraea*, com o valor de $16,6 \mu\text{g/mL}$. Existem vários estudos sobre a composição química de diferentes partes de *B. virgilioides* (MELO *et al.*; 2001; TORRENEGRA; BAUEREISS; ACHENBACH; 1989; VELOZO *et al.*; 1999), contudo, sobre a semente consta apenas um trabalho que trata da composição do óleo essencial e seu potencial antibacteriano (RODRIGUES *et al.*; 2009). Por outro lado, em relação a *M. petraea* não há trabalho fitoquímico e/ou farmacológico, mostrando ser um potencial a ser investigado.

A última atividade a ser considerada é quanto à capacidade sequestradora de radical livre, o DPPH, como atividade antirradicalar. Nesse trabalho, do total de espécies estudadas, quatro (28,6%) apresentaram um ótimo perfil, com os valores de CI_{50} na faixa de $16,85$ a $7,54 \mu\text{g/mL}$. Foram as espécies *Hymenaea stigonocarpa*,

Luehea paniculata, *Maprounea guianensis* e a planta denominada de douradinha. As folhas e as cascas foram as partes que apresentaram atividade, fato explicável, possivelmente, por serem os órgãos que mais comumente detêm a presença de substâncias fenólicas, compostos naturalmente antioxidantes (ALI *et al.*; 2008). A planta que se destacou mais uma vez foi a *Maprounea guianensis*, já que tanto as folhas quanto as cascas mostraram forte atividade antirradicalar.

Maprounea guianensis foi investigada no decorrer desse trabalho quanto à presença de taninos, em virtude da alta polaridade das substâncias nela presentes e do perfil de atividade biológica apresentado. Essa investigação foi feita por meio da técnica baseada na adsorção dos taninos em pó de pele. Os resultados confirmaram que os taninos estão presentes nos extratos das folhas (34,6%) e das cascas (30%). Essas frações tanantes e não tanantes foram submetidas ao teste antifúngico contra a cepa de *Candida krusei*, confirmando que os taninos são responsáveis pela atividade antifúngica tão significativa dessa espécie: fração tanante da folha e casca – CIM = 15,625 µg/mL cada uma, e a fração não tanante de ambas partes – CIM = 1000 µg/mL.

Diante do exposto, pode-se confirmar que o estudo na busca de substâncias bioativas utilizando a etnofarmacologia como ferramenta de seleção de plantas é bastante contundente, pois nesse trabalho das 14 espécies testadas, 12, isto é, 85,7% das mesmas apresentaram de moderada a alta atividade em pelo menos uma das atividades biológicas.

Tabela 3 – Atividades biológicas e antirradicalar dos 23 extratos das plantas coletadas.

Espécie	Parte ¹	Ativ. Antib. –		Ativ. Antifung – CIM			Ativ. Anti- <i>Leish</i>	Ens. Cit. <i>A. salina</i> –	DPPH –
		CIM (µg/mL)		(µg/mL)			– CI ₅₀ (µg/mL)	DL ₅₀ (µg/mL) ⁸	CI ₅₀ (µg/mL) ⁹
		<i>S.a.</i> ²	<i>P.a.</i> ³	<i>C.a.</i> ⁴	<i>C.k.</i> ⁵	<i>C.n.</i> ⁶	<i>L.a.</i> ⁷		
<i>Alibertia sp</i>	F	I	1000	500	1000	I	I	I	I
	G	I	1000	I	1000	I	I	I	I
<i>Anemopaegma arvense</i>	PA	I	1000	I	I	250	I	I	I
	R	I	I	1000	I	I	I	I	I
<i>Bowdichia virgilioides</i>	F	250	1000	500	500	31,25	I	I	I
	S	1000	1000	I	I	1000	20	3,53	I
	T	I	1000	1000	1000	1000	I	610,1	I
<i>Celtis pubescens</i>	F	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Centratherum punctatum</i>	PA	1000	I	I	1000	1000	25	352,9	I
<i>Clavija nutans</i>	F	I	I	500	1000	I	I	129,8	I
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	F	1000	1000	1000	250	250	I	885,4	I
	C	250	1000	1000	250	1000	I	I	10,11
<i>Luehea paniculata</i>	F	500	1000	I	125	1000	I	I	12,88
	C	250	1000	I	125	1000	I	I	10,09

Tabela 3 – (Cont.)...

Espécie	Parte ¹	Ativ. Antib. – CIM (µg/mL)		Ativ. Antifung – CIM (µg/mL)			Ativ. Anti- <i>Leish</i> – CI ₅₀ (µg/mL)	Ens. Cit. <i>A. salina</i> – DL ₅₀ (µg/mL)	DPPH – CI ₅₀ (µg/mL)
		S.a. ²	P.a. ³	C.a. ⁴	C.k. ⁵	C.n. ⁶	L.a. ⁷		
<i>Macrosiphonia petraea</i>	PA	I	I	500	250	250	I	I	I
	R	I	I	500	I	1000	I	16,62	I
<i>Momordica charantia</i>	PA	1000	1000	1000	1000	1000	6,25	114,6	I
<i>Maprounea guianensis</i>	F	250	1000	125	15,625	62,5	I	I	7,54
	C	500	1000	125	15,625	62,5	I	I	9,62
<i>Melancium campestre</i>	PA	1000	I	I	1000	1000	50	I	I
<i>Vernonia ferruginea</i>	F	I	I	I	1000	1000	45	I	I
	G	I	I	1000	500	500	18	I	I
(douradinha)	F	1000	1000	I	1000	I	I	I	16,85
Controles Positivos ⁸		0,5	8	1,0	0,25	0,25	1,6	33,80	104,9

1 – Parte da planta: C – casca; F – folha; G – galhos; PA – parte aérea; R – raiz; S – semente; T – tronco. 2 – S.a. – *Staphylococcus aureus*. 3 – P.a. – *Pseudomonas aeruginosa*. 4 – C.a. – *Candida albicans*. 5 – C. k. – *Candida krusei*. 6 – C.n. – *Cryptococcus neoformans*. 7 – *Leishmania amazonensis*.

8 – Controles Positivos: S.a. e P.a. – Cloranfenicol; C.a., C.k. e C.n. – Anfotericina B; L.a. – Pentamidina; *A. salina* – sulfato de quinidina; DPPH - BHT

* I – Inativo: Atividades antibacteriana e antifúngica >1000 µg/mL; Atividade anti-*Leishmania* >50 µg/mL; Citotóxica >1000 µg/mL e DPPH >200 µg/mL.

5.4 Estudo químico biomonitorado

5.4.1 Fracionamento e avaliação da atividade anti-*Leishmania* das frações obtidas do extrato de *Momordica charantia*

O extrato etanólico das partes aéreas da espécie *Momordica charantia* mostrou-se o mais ativo no ensaio anti-*Leishmania*. Devido a pouca quantidade de seu extrato, uma nova coleta foi realizada para obtenção final de 53,13 g de extrato. Uma parte desse extrato foi particionado em três frações: hexânica (FHMC), acetato de etila (FACMC) e hidrometanólica (FHMMC), conforme mostrado na Figura 26 e cujas massas obtidas encontram-se na Tabela 4 e a outra parte para a realização dos ensaios biológicos.

Tabela 4 – Massas do extrato bruto etanólico de *Momordica charantia* e das frações.

Amostras	Massa (g)
Extrato bruto – EBMC	53,13
Partição hexânica – FHMC	11,73
Partição acetato de Etila - FACMC	19,50
Partição hidrometanólica – FHMMC	12,07

O material obtido dessas partições foi submetido ao ensaio anti-*Leishmania*, evidenciando que a fração acetato de etila foi a mais ativa, conforme pode ser observado na Figura 28, indicando que a(s) substância(s) leishmanicida(s) concentra(m)-se nessa fase. Por essa razão, 18,25 g dessa fração foram submetidos ao fracionamento em sílica gel 80-230 mesh com eluição inicial de hexano:acetato de etila (9:1), obtendo-se as 14 frações discriminadas na Tabela 5.

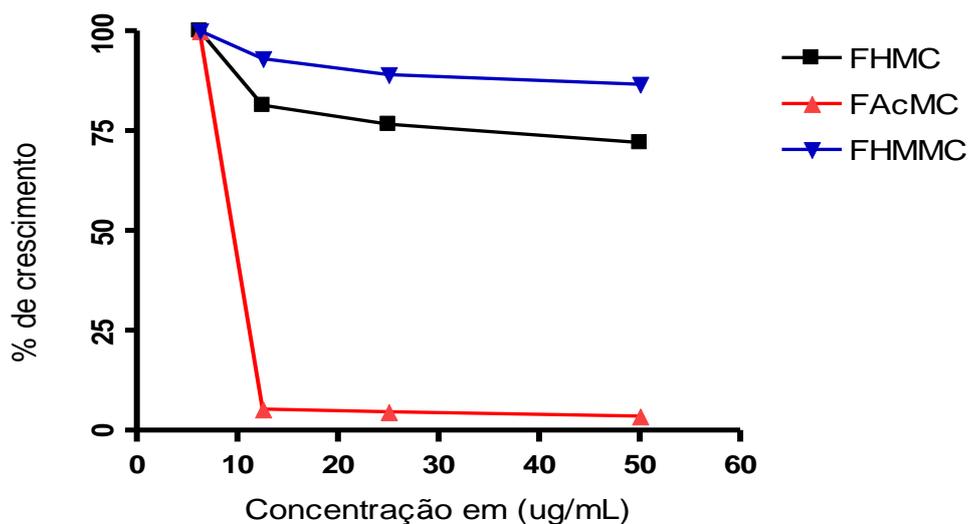


Figura 28 – Atividade anti-*Leishmania* das partições do extrato bruto etanólico de *Momordica charantia*

FHMC – partição hexânica; FAcMC – partição acetato de etila e FHMMC – partição hidrometanólica

Tabela 5 – Frações da partição acetato de etila de *Momordica charantia* (FAcMC) em Sílica gel 80-230 mesh com eluição inicial de hexano:acetato de Etila (9:1) e as correspondentes massas

Frações	Massa (g)
FAcMC	18,2500
FAcMC-F1	0,0135
FAcMC-F2	0,0479
FAcMC-F3	0,0984
FAcMC-F4	0,0726
FAcMC-F5	0,4189
FAcMC-F6	0,2510
FAcMC-F7	2,1155
FAcMC-F8	1,7008
FAcMC-F9	0,2547
FAcMC-F10	0,5307
FAcMC-F11	4,4202
FAcMC-F12	1,7458
FAcMC-F13	6,1987
FAcMC-F14	0,3030

Essas 14 frações foram também submetidas ao ensaio anti-*Leishmania* e os resultados encontram-se na Figuras 29.

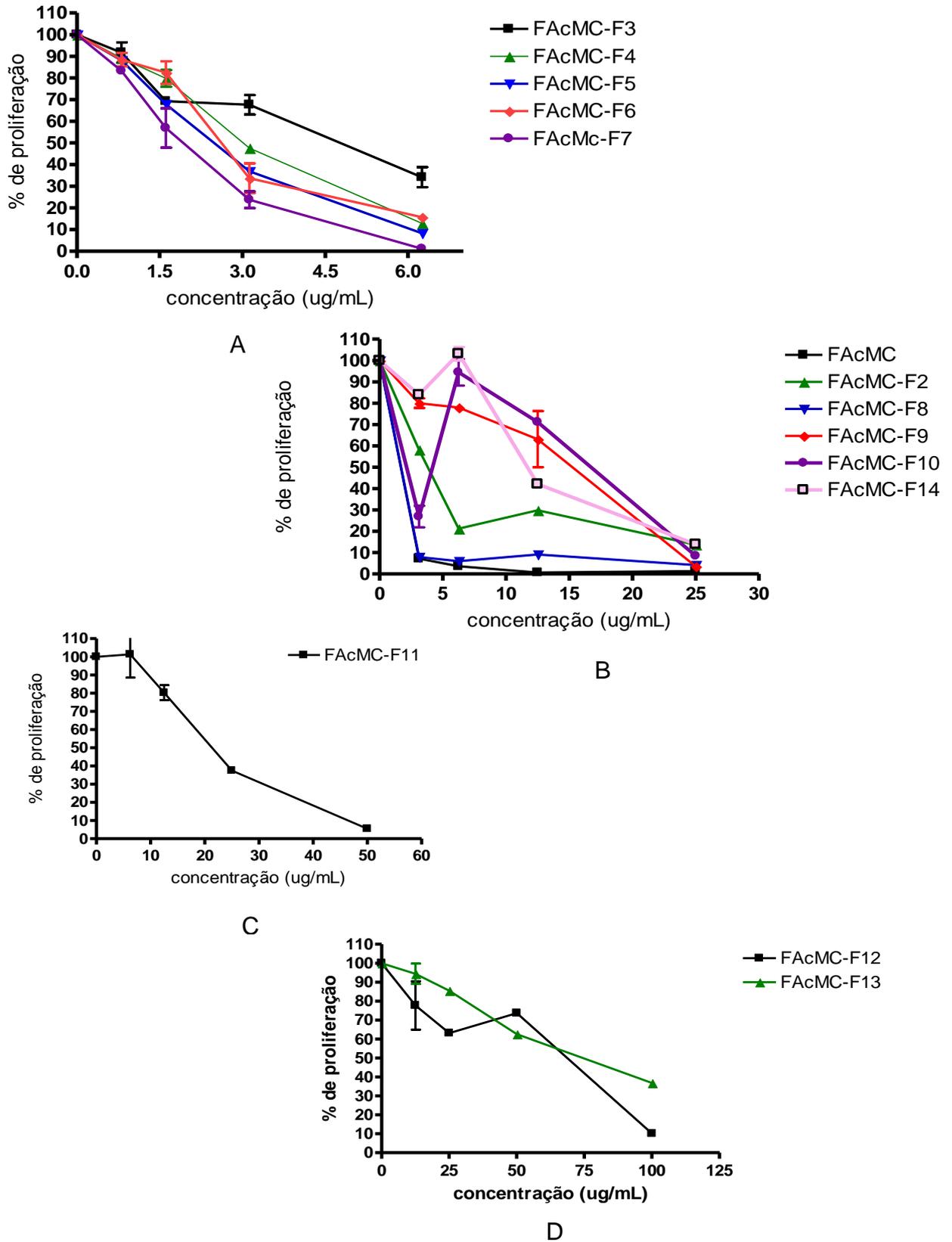


Figura 29 – Atividade anti-*Leishmania* das frações obtidas da partição acetato de etila (FAcMC) de *Momordica charantia*.

A – Frações FAcMC-F3, F4, F5, F6 e F7; B – Frações FAcMC, FAcMC-F2, F8, F9, F10 e F14; C – Frações FAcMC-F11 e D – Frações FAcMC-F12 e F13

Tabela 6 – Porcentagem de inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* das frações obtidas da partição acetato de etila de *Momordica charantia* – FAcMC na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$

Frações	Porcentagem de inibição
FAcMC	96,0
FAcMC-F2	79,0
FAcMC-F3	66,0
FAcMC-F4	87,0
FAcMC-F5	92,0
FAcMC-F6	84,0
FAcMC-F7	99,0
FAcMC-F8	94,0
FAcMC-F9	22,0
FAcMC-F10	6,0
FAcMC-F11	0,0
FAcMC-F12	0,0
FAcMC-F13	0,0
FAcMC-F14	0,0

Pela análise da Tabela 6 e do gráfico de dispersão dessas frações (Figura 30), verifica-se que as primeiras frações mostraram maior atividade que as últimas, sugerindo que mais de uma substância pode estar sendo responsável pela atividade anti-*Leishmania* e que essas devem se encontrar nas frações entre FAcMC-F2 e FAcMC-F8, embora a fração FAcMC-F7 se destaque, com uma pequena margem de diferença.

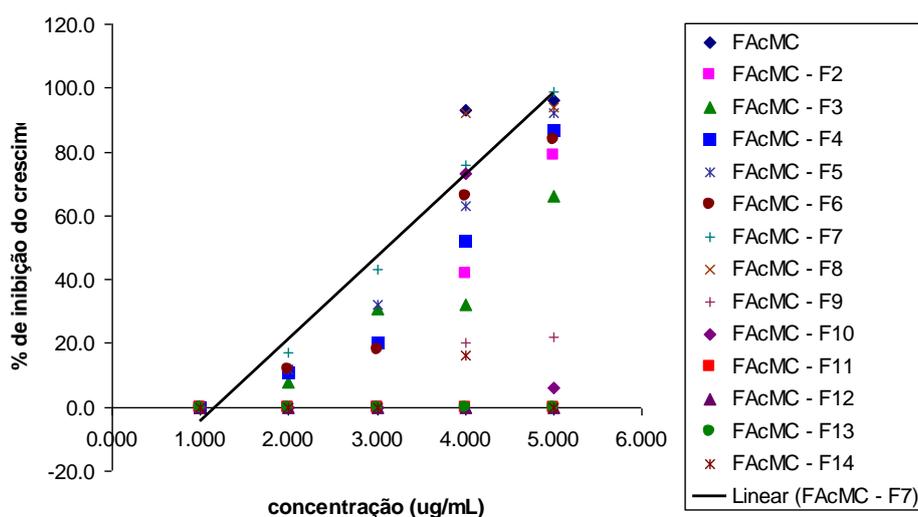


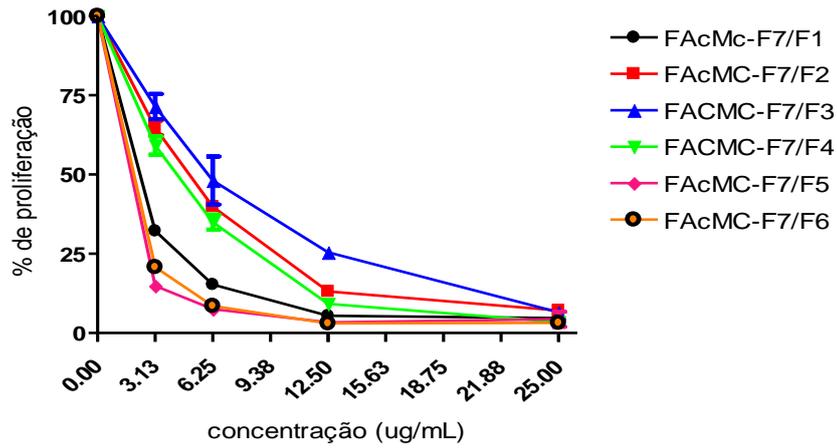
Figura 30 – Gráfico de dispersão das frações FAcMC-F1 a F14 da fração acetato de etila de *Momordica charantia*

Pelo fato da fração FAcMC-F7 ter mostrado um bom rendimento em termos de massa e um perfil de atividade muito bom, essa fração foi selecionada para dar continuidade ao fracionamento biomonitorado. Uma quantidade de 510,8 mg dessa fração foi submetida em uma coluna de Sephadex LH 20 em clorofórmio, obtendo-se 11 frações, cujos rendimentos em massa encontram-se na Tabela 7. Salienta-se, no entanto, que esse procedimento corresponde a uma segunda tentativa, pois na primeira, aproximadamente 500 mg da FAcMC-F7 foram fracionados nas mesmas condições, mas algumas subfrações depois de algum tempo sofreram degradação.

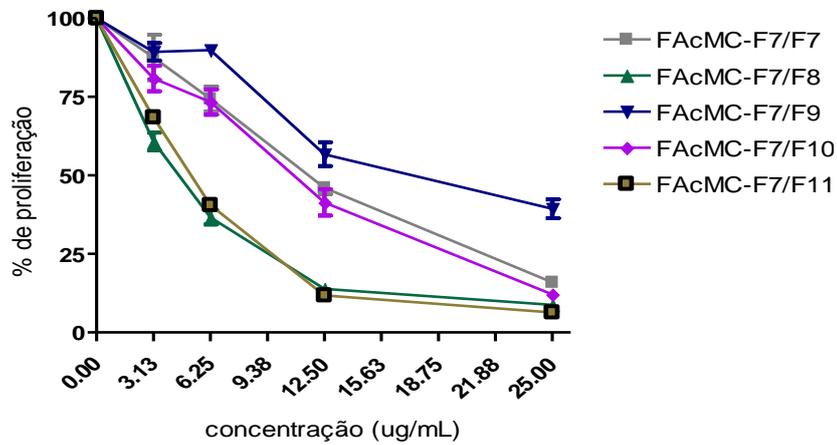
Tabela 7 – Massas das subfrações obtidas do fracionamento da fração FAcMC-F7

Frações	Massa (mg)
FAcMC-F7	510,8
FAcMC-F7/F1	44,8
FAcMC-F7/F2	34,8
FAcMC-F7/F3	92,3
FAcMC-F7/F4	9,6
FAcMC-F7/F5	176,6
FAcMC-F7/F6	56,7
FAcMC-F7/F7	16,1
FAcMC-F7/F8	4,9
FAcMC-F7/F9	5,1
FAcMC-F7/F10	38,4
FAcMC-F7/F11	24,6

Essas 11 frações foram testadas no ensaio anti-*Leishmania* e seus resultados encontram-se na Figura 31.



A



B

Figura 31 – Atividade anti-*Leishmania* das subfrações obtidas do fracionamento de Fração FAcMC-F7

A – Frações FAcMC-F7/F1, F2, F3, F4, F5 e F6; B – Frações FAcMC-F7/F7, F8, F9, F10 e F11

Tabela 8 – Porcentagem de inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* das frações FAcMC-F7/F1 a F11 de *Momordica charantia* na concentração de 6,25 µg/mL

Frações	Porcentagem de inibição
FAcMC-F7/F1	84,68
FAcMC-F7/F2	60,09
FAcMC-F7/F3	51,86
FAcMC-F7/F4	65,00
FAcMC-F7/F5	92,49
FAcMC-F7/F6	91,50
FAcMC-F7/F7	25,66
FAcMC-F7/F8	63,36
FAcMC-F7/F9	10,10
FAcMC-F7/F10	26,65
FAcMC-F7/F11	59,47

Mais uma vez a análise da Tabela 8 e do gráfico de dispersão dessas frações (Figura 32) confirma que não há uma única substância, pois várias subfrações apresentaram de boa a ótima atividade; encontrando-se nas primeiras subfrações obtidas. Em função disso e do perfil espectroscópico apresentado por RMN, as subfrações FAcMC-F7/F1, FAcMC-F7/F3 e FAcMC-F7/F5 foram submetidas a posteriores fracionamentos e isolamento das possíveis substâncias bioativas, conforme o esquema apresentado na Figura 27.

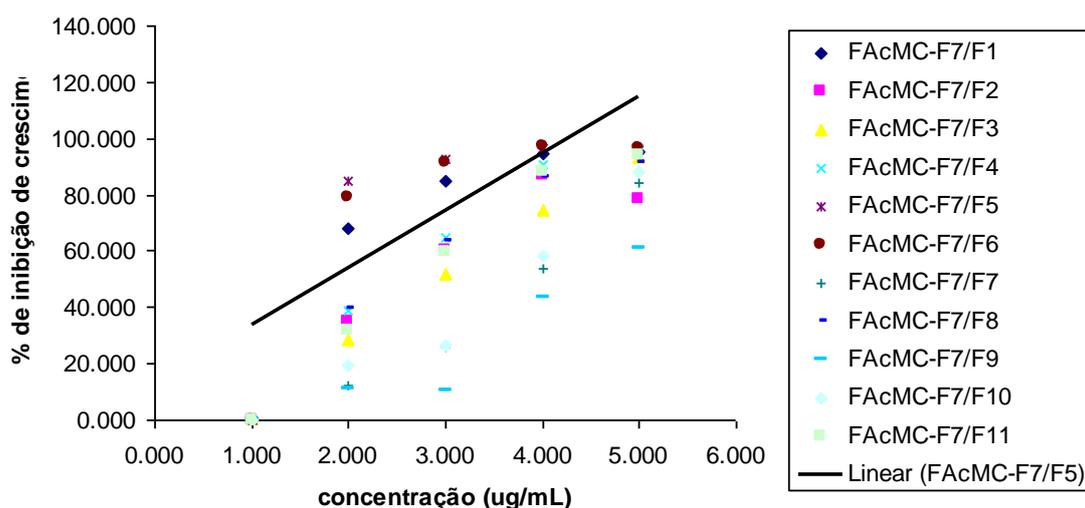


Figura 32 – Gráfico de dispersão das frações FAcMC-F7/F1 a F11

Da subfração FAcMC-F7/F3 após a submissão em coluna flash (200-400 mesh) com o eluente hexano:acetato de etila(6:4), a fração MC-F7/F3-F3 mostrou-se

com alto grau de pureza pela análise dos espectros de RMN e foi denominada de **CC1**.

A subfração FAcMC-F7/F5 após análise em CLAE analítico, foi purificada por CLAE semipreparativo; no entanto, dos 170 mg submetidos, 90 mg foram insolúveis em acetonitrila (ACN), o eluente para a coluna. Esse resíduo insolúvel, depois de solubilizado em metanol e analisado por RMN, mostrou-se ser uma substância pura que foi denominada **CC2**. A subfração FAcMC-F7/F6 também foi submetida a CLAE semipreparativo, formando um resíduo espectrometricamente semelhante a CC2.

A subfração FAcMC-F7/F1 também foi submetida a uma coluna flash (200-400 mesh) com o eluente hexano:acetato de etila:metanol (6:4:0,5), obtendo-se 9 frações, das quais a fração MC-F7/F1-F2 desta última coluna mostrou ser uma substância purificada e foi denominada de **CC3**. De outras duas frações, MC-F7/F1-F3 e MC-F7/F1-F4 foram purificadas por cromatografia preparativa e isoladas as substâncias **CC4** e **CC5**, respectivamente.

5.4.2 Avaliação da atividade anti-amastigota

Em função da quantidade de material e do custo do experimento em amastigota, foi realizado o teste para avaliar a atividade anti-amastigota da fração acetato de etila (FAcMC) e da subfração F7 dessa fração (FAcMC-F7) de *Momordica charantia*. Ambas apresentaram forte atividade anti-amastigota, conforme resultado que se encontra na Figura 33.

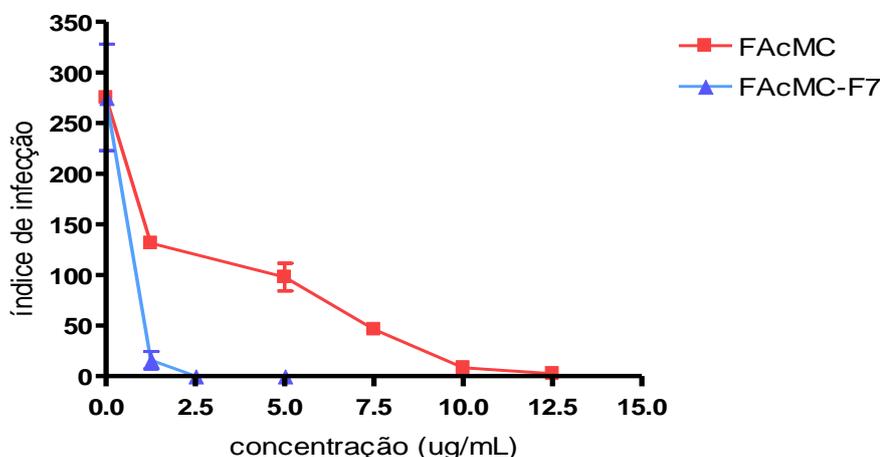


Figura 33 – Atividade anti-amastigota da fração acetato de etila (FAcMC) e sua subfração F7 (FAcMC-F7) de *Momordica charantia*

Esse dado demonstra que o extrato de *Momordica charantia* e suas frações apresentam o mesmo perfil de atividade tanto para promastigota quanto para amastigota, o que possibilita inferir que as substâncias isoladas CC1 a CC5 também terão atividade anti-amastigota. Estudos mostram que as promastigotas são geralmente menos sensíveis para drogas que as amastigotas, indicando que os ensaios *in vitro* sobre amastigotas intracelulares se correlacionam melhor com a resposta *in vivo* ao tratamento do que os ensaios em promastigotas (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO; 2004). Portanto, está evidente o potencial de *Momordica charantia*, seja extrato, frações purificadas ou substâncias isoladas para o tratamento de leishmaniose.

5.4.3 Identificação estrutural das substâncias isoladas com atividade anti-*Leishmania*

5.4.3.1 Identificação estrutural da substância CC1

O espectro de RMN ^1H de CC1 (Figura 34, Tabela 9) mostra: um singlete em δ 9,87 característico de hidrogênio de aldeído; um singlete referente a três hidrogênios em δ 3,52, típico de metoxila; três sinais na região de hidrogênios olefínicos, sendo um dubleto em δ 5,87 ($J = 3,5$ Hz), provavelmente de uma ligação dupla $\text{C} = \text{C}$ trissubstituída; um dubleto largo em δ 5,39 ($J = 15,8$ Hz) e duplo-duplo-dubleto em δ 5,53 ($J = 5,4; 9,1$ e $15,7$ Hz). Os dois últimos sinais indicam a presença de uma dupla $\text{C} = \text{C}$ *trans* dissubstituída ao lado de um metileno.

Ainda são observados seis sinais entre δ 0,80 e 1,40, sendo um dubleto em δ 0,94 com $J = 5,0$ Hz referente a três hidrogênios, indicando a presença de uma metila ligada a um grupo CH; um singlete referente a seis hidrogênios ou seja, duas metilas cujos sinais coincidem, e quatro singletos referentes a três hidrogênios cada, indicando a presença de outras quatro metilas na molécula.

O seu espectro de RMN ^{13}C (Figura 35) caracteriza-se por 31 sinais e, com auxílio das informações obtidas do espectro DEPT 135° (Figura 34), foi possível confirmar a presença da carbonila de aldeído (δ 207,6), das duas ligações duplas mencionadas (δ 146,0 – C; 124,3 – CH; 137,9 – CH; 128,8 – CH); e três carbonos carbinólicos, sendo dois metínicos e um não ligado a hidrogênio.

Consta na molécula sete metilas, sete metilenos, dez carbonos como CH, incluindo o grupo aldeídico, dois carbinólicos e um de ligação dupla, e seis carbonos não ligados a hidrogênio, incluindo um de ligação dupla e um carbinólico. Tais dados são compatíveis com a estrutura de um triterpeno tetracíclico. A partir desses dados (Figuras 34, 35 e 36) conclui-se que CC1 possui um esqueleto carbônico com 30 carbonos e mais uma metoxila (δ_H 3,52 e δ_C 50,3).

A literatura mostra que das folhas de *Momordica charantia* foram obtidos triterpenos tetracíclicos com esqueleto rearranjado, tipo cucurbitano. Comparando os dados de RMN de CC1 ao esqueleto cucurbitano verificou-se que estes dados eram compatíveis com os de uma substância já isolada anteriormente de *M. charantia*, a 25-metóxi-3 β ,7 β -dihidroxicucurbita-5,23(E)-dien-19-al (Figura 37) (FATOPE *et al.*; 1990).

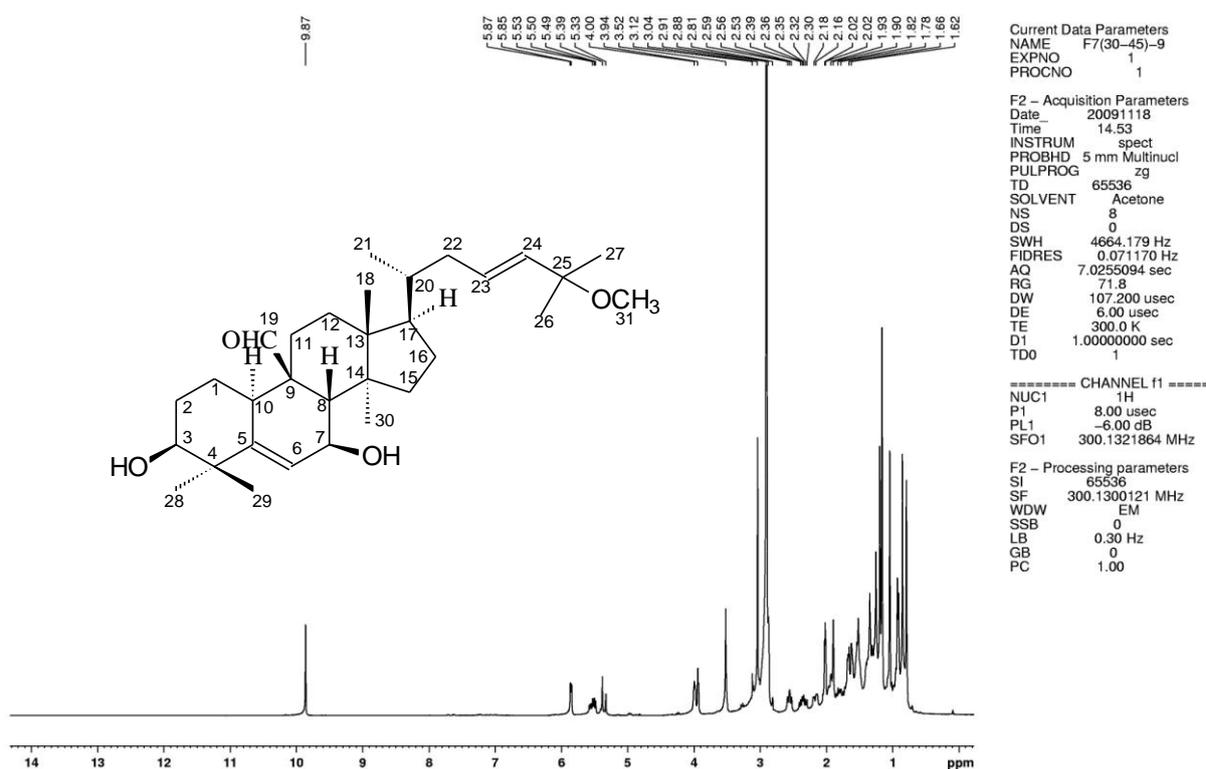


Figura 34 – Espectro de RMN ¹H (300 MHz – Acetona-d₆) da substância CC1

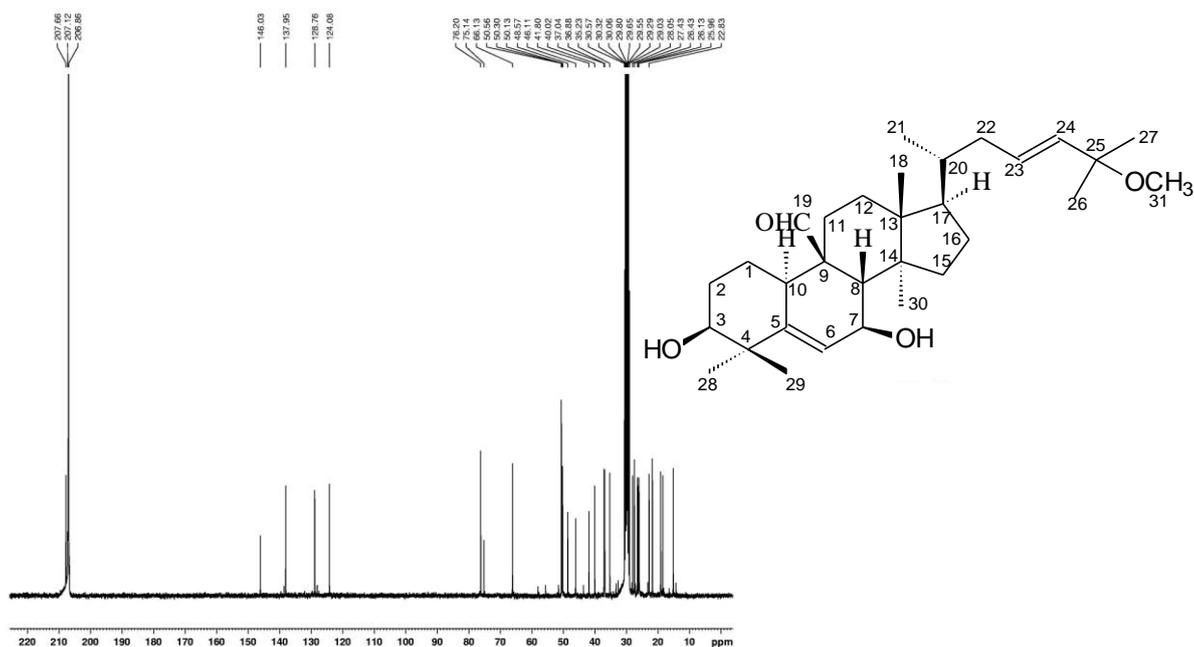


Figura 35 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz – Acetona-d₆) da substância CC1

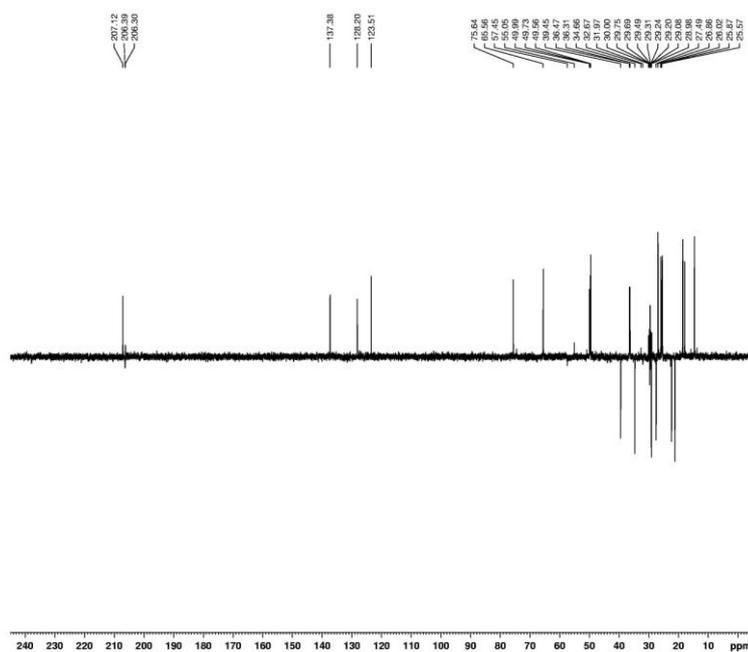


Figura 36 – Espectro de DEPT 135° (75 MHz – Acetona-d₆) da substância CC1

Tabela 9 – Dados experimentais de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) em acetona- d_6 da substância CC1 e da substância 25-metóxi- $3\beta,7\beta$ -diidroxicucurbita-5,23(*E*)-dien-19-al em piridina- d_5 (FATOPE *et al.*; 1990).

Posição	CC1		25-metóxi- $3\beta,7\beta$ - diidroxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-19- al ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ – 400 MHz)	
	δ_{H} , multiplicidade (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} , multiplicidade (J, Hz)	δ_{C}
1		21,4		21,8
2		30,6		29,9
3	3,12 <i>m</i>	76,2	3,83 <i>m</i>	75,7
4		41,8		41,8
5		146,0		145,7
6	5,88 <i>dd</i> (3,5)	124,3	6,28 <i>dl</i> (5,2)	124,3
7	4,0	66,1	4,38 <i>dl</i> (5,2)	65,7
8		50,6	2,39 <i>sl</i>	50,6
9		50,6		50,6
10	2,57 <i>dd</i> (9,2)	37,0	2,72 <i>m</i>	36,9
11		22,8		22,7
12		29,2		29,5
13		46,1		45,8
14		48,6		48,3
15		35,2		35,0
16		28,0		27,8
17		50,1		50,1
18	0,87 <i>s</i>	15,2	0,90 <i>s</i>	15,0
19	9,88 <i>s</i>	207,6	10,65 <i>s</i>	207,8
20		36,8		36,4
21	0,94 <i>d</i> (5,0)	19,0	0,99 <i>d</i> (5,8)	19,0
22		40,0	3,22 <i>m</i>	39,7
23	5,56 <i>ddd</i> (5,5; 9,0 e 15,7)	128,8	5,63 <i>m</i>	128,4
24	5,38 <i>dd</i> (15,8 e 1,1)	137,9	5,55 <i>d</i> (15,7)	137,7
25		75,1		74,8
26	1,19 <i>s</i>	26,1	1,33 <i>s</i>	26,5
27	1,19 <i>s</i>	26,4	1,33 <i>s</i>	26,0
28	1,27 <i>s</i>	27,4	1,48 <i>s</i>	27,4
29	1,06 <i>s</i>	26,0	1,18 <i>s</i>	26,2
30	0,81 <i>s</i>	18,4	0,88 <i>s</i>	18,1
OCH ₃	3,52 <i>s</i>	50,3	3,22 <i>s</i>	50,2

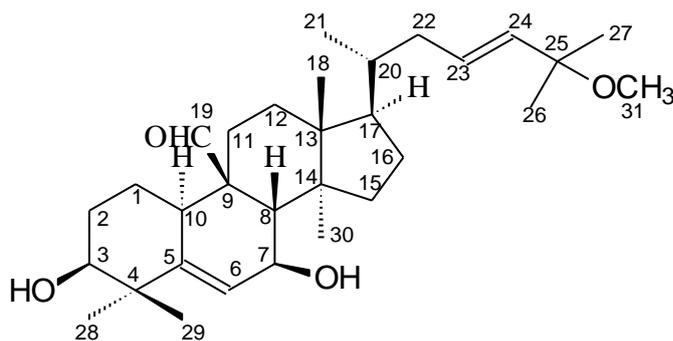


Figura 37 – Estrutura química da CC1

5.4.3.2 Identificação estrutural da substância CC2

Os dados de RMN de ^1H (Figura 39) e ^{13}C da substância CC2 (Figuras 38) são bastante semelhantes aos da substância CC1, diferenciando-se no espectro de RMN ^{13}C (Figura 40) pela ausência do sinal em $\delta \sim 50$ referente a uma metoxila e a presença do sinal do carbono quaternário carbinólico em 71,2, aproximadamente 4 ppm a menos do que em CC1. Esses dados indicam que CC2 possui o mesmo esqueleto carbônico de CC1 com uma hidroxila ligada no C25, além das já existentes em C3 e C7 (Tabela 10). Outro fato que corrobora com esta proposta é a diminuição de deslocamento de C23 (δ 125,8) e aumento de C24 (δ 141,0), em relação aos mesmos carbonos de CC1 (FATOPE *et al.*; 1990). Assim CC2 trata-se de 3 β ,7 β ,25-triidroxicucurbita-5,23(*E*)-dien-19-al, também obtido anteriormente de *M. charantia* (FATOPE *et al.*; 1990).

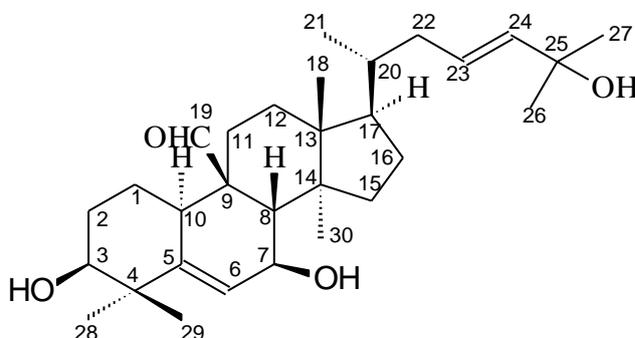


Figura 38 – Estrutura química da CC2

Tabela 10 – Dados experimentais de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) em metanol- d_4 da substância CC2 e da substância $3\beta,7\beta,25$ -triidroxicucurbita-5,23(*E*)-dien-19-al em piridina- d_5 (FATOPE *et al.*; 1990).

Posição	CC2		3 $\beta,7\beta,25$ -triidroxicucurbita-5,23(<i>E</i>)-dien-19-al (piridina- d_5)	
	δ_{H} , multiplicidade (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		21,2		21,8
2		28,9		29,6
3		77,2		76,8
4		41,2		42,0
5		147,3		146,0
6	5,89 <i>d</i> (4,6)	124,0		124,4
7	3,98 (5,37)	66,9		66,7
8	2,42	47,7	2,39	48,2
9		50,2		50,5
10	2,68	36,6	2,69	37,2
11		23,4		24,0
12		28,4		29,6
13		45,2		46,0
14		48,1		48,6
15		34,7		35,3
16		27,4		28,2
17		49,9		50,7
18		15,4		15,5
19	9,86 <i>s</i>	209,6		208,7
20		36,1		36,2
21		17,9		18,7
22		39,0	1,85	39,7
23	5,85; 5,56	125,8	5,93	125,0
24	5,72; 5,55	141,0	5,91	139,6
25		71,2		70,7
26		29,9	1,55	30,0
27		29,9	1,55	29,9
28		27,8	1,19	27,6
29		28,5	1,49	26,0
30		18,8		18,6

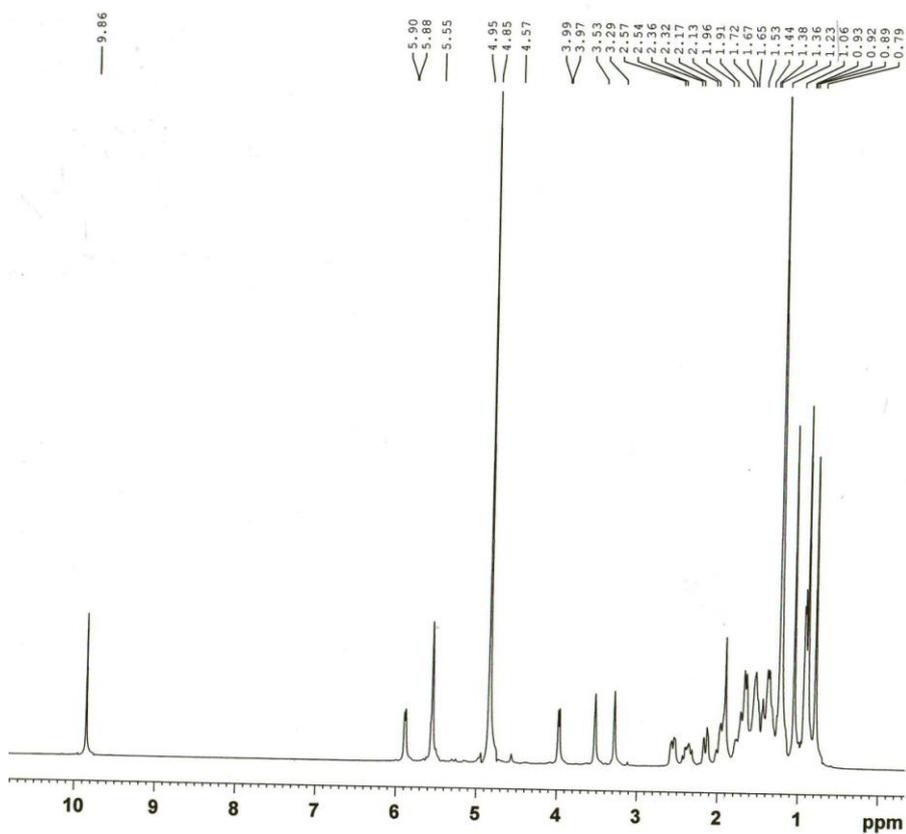


Figura 39 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz – Metanol- d_4) da substância CC2

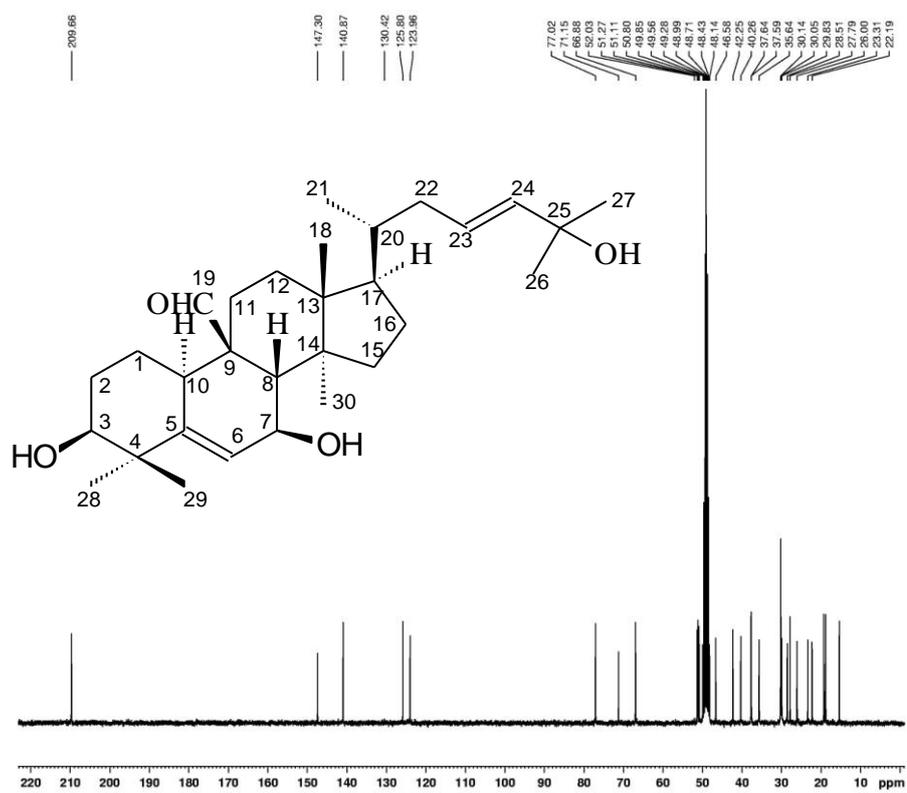


Figura 40 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz – Metanol- d_4) da substância CC2

5.4.3.3 Identificação estrutural da substância CC3

A análise espectroscópica preliminar da amostra CC3 demonstrou não se tratar de uma substância pura, co-ocorrendo uma mistura de dois compostos numa proporção de 2:1, considerando a relação entre os valores das integrações dos sinais em δ 5,18 (H-19, majoritário) e em δ 4,91 (H-19, minoritário), Figura 41.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C revelaram que CC3 pertence à mesma classe de CC1 e CC2, distinguindo-se pela ausência do sinal referente ao grupo funcional aldeído (Figura 41). A comparação dos dados de RMN ^{13}C de CC3 (Figura 42) com os de CC1 e CC2 mostra que a cadeia lateral de CC3 é igual à da CC1 (Tabela 9). Além dos sinais da ligação dupla C23-C24 (δ 128,7/128,7 e δ 138,1/138,1 ppm), observa-se mais três sinais de carbonos metínicos na região típica de ligação dupla para cada componente da mistura: δ 112,5/115,4; 132,0/130,8 e 133,0/134,1; entretanto, não é possível haver um número ímpar de carbonos de ligação dupla. O valor de δ 112,5/115,4 está abaixo do esperado para um CH_2 de dupla ligação sendo mais condizente com um carbono ligado a dois oxigênios, apesar de estar acima da faixa mais comum para acetais ou hemiacetais (δ 90-110 ppm). Assim admitiu-se a possibilidade de CC3 possuir um destes grupos funcionais. Buscando na literatura, encontrou-se um composto já isolado das folhas de *Momordica foetida* (MULHOLLAND *et al.*; 1997) com estas características e cujos dados de RMN ^{13}C apresentavam uma boa correlação com os de CC3 (Tabela 11). Desta forma, foi possível definir que os constituintes de CC3 possuem estrutura base 5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol, mostrada na Figura 43.

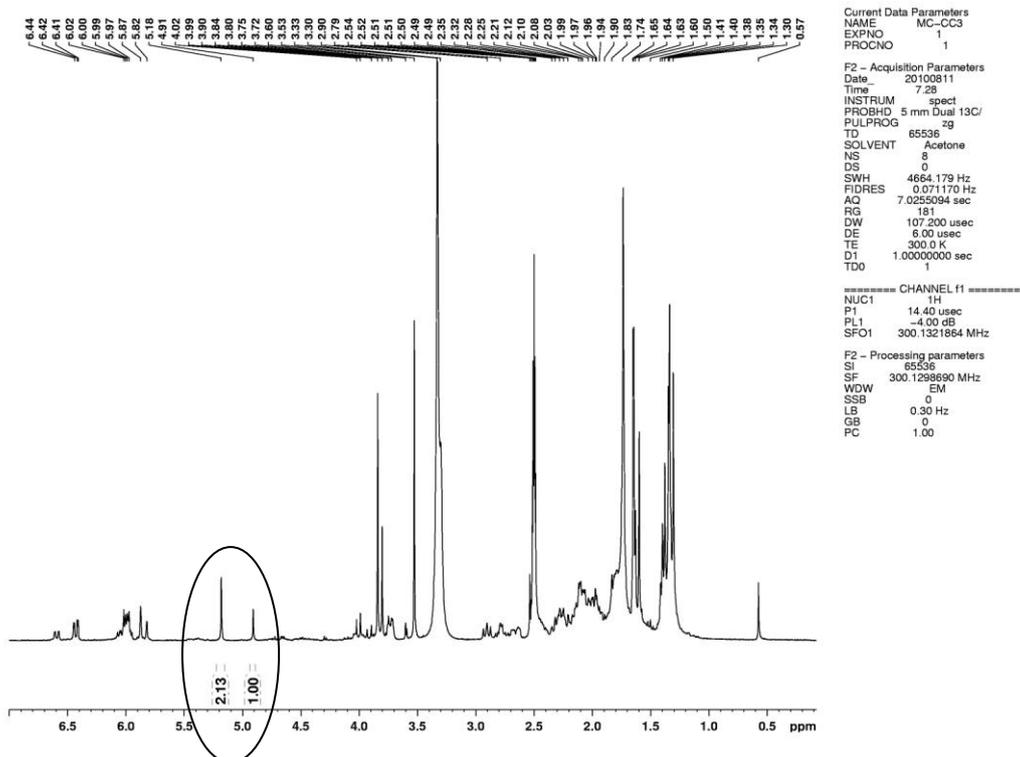


Figura 41 - Integrações dos sinais em δ 5,18 (H-19, majoritário) e em δ 4,91 (H-19, minoritário) da amostra CC3

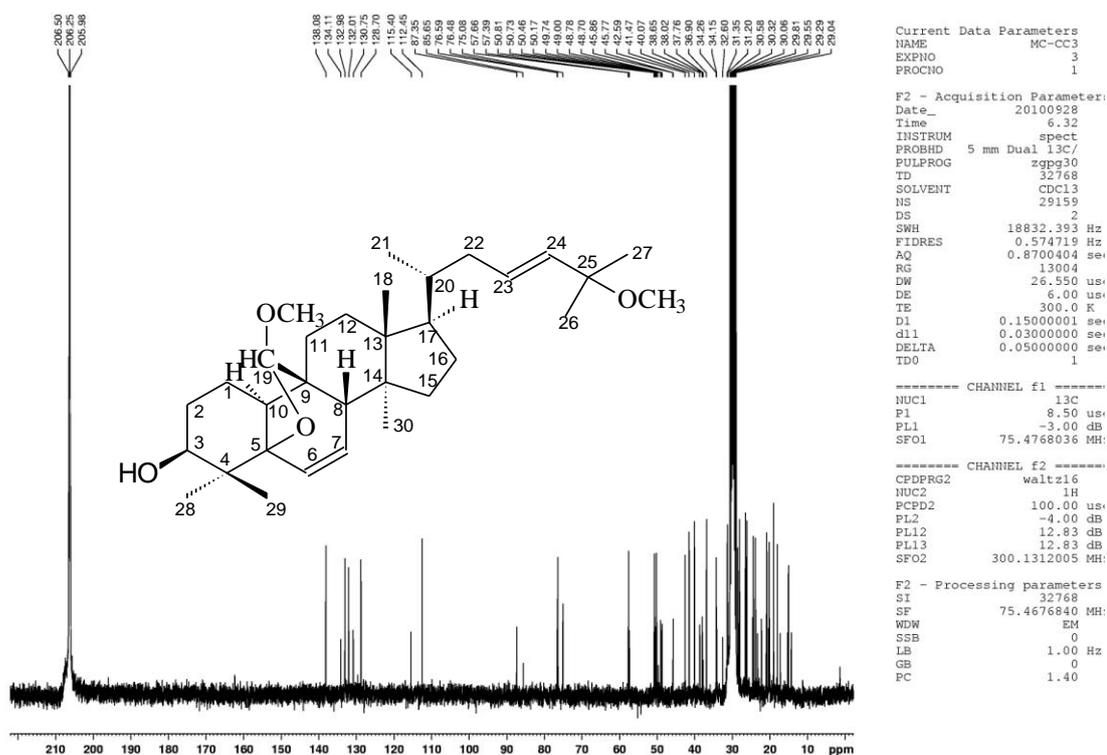


Figura 42 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz - Acetona- d_6) da amostra CC3

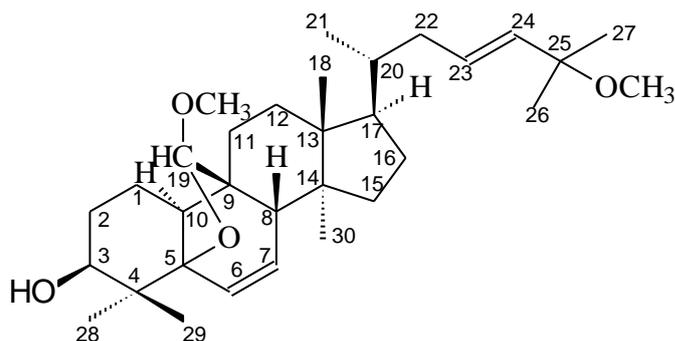
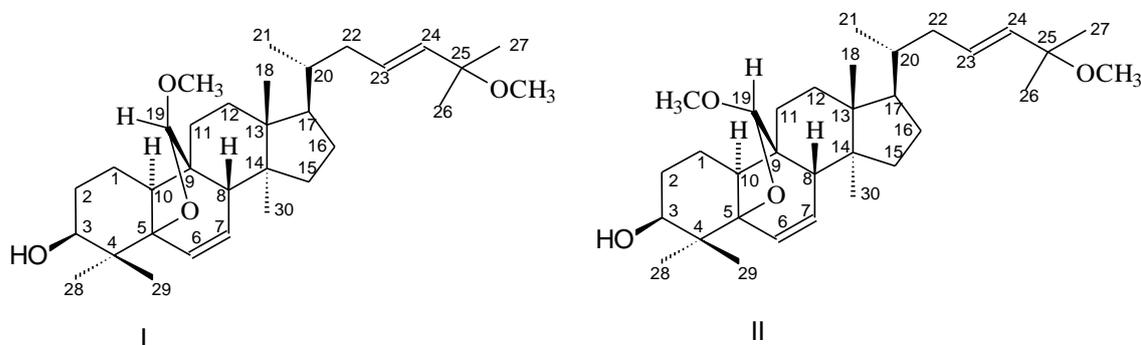


Figura 43 – Estrutura química de CC3

Comparando-se os dados de RMN ^{13}C dos dois constituintes de CC3, infere-se que sejam substâncias que têm o núcleo básico das cucurbitacinas e estrutura base mencionada. Observam-se sinais de valores muito próximos, com variação de até 1 ppm, e com o mesmo padrão de substituição; embora os sinais de C5 (δ 87,5/85,6) e C19 (δ 112,5/115,4), referentes aos grupos funcionais acetal, apresentem uma maior variação nos seus valores de deslocamentos. Esses dados sugerem que os compostos possam ser estereoisômeros, apresentando diferença na configuração do carbono C19. Assim, a amostra CC3, seria uma mistura de dois estereoisômeros que se diferenciam pela configuração no carbono C19, indo ao encontro dos dados da literatura (OKABE; MIYAHARA; YAMAUCHI; 1982). Foi possível definir que o isômero majoritário apresenta a configuração C19-*R* e o outro, o minoritário, apresenta a configuração C19-*S*, conforme Figura 44 e Tabela 11. Portanto, os componentes da mistura CC3 são (19*R*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol e (19*S*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol.



I - (19*R*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol

II - (19*S*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol

Figura 44 – Estruturas dos diastereoisômeros 19-*R* e 19-*S* de CC3

Tabela 11 – Dados experimentais de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) em acetona- d_6 dos dois estereoisômeros de CC3 e dos isômeros (19*R*,23*E*) e (19*S*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol (KIMURA *et al.*; 2005; MURAKAMI *et al.*; 2001; OKABE; MIYAHARA; YAMAUCHI; 1982)

Posição	CC3				5 β ,19-epóxi-19,25-dimetoxicucurbita-6,23-dien-3 β -ol (piridina- d_5)			
	majoritário – 19 <i>R</i>		minoritário – 19 <i>S</i>		(19 <i>R</i> ,23 <i>E</i>)		(19 <i>S</i> ,23 <i>E</i>)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		18,0		17,3	1,49/1,53 β	17,4		
2		28,1		28,0	1,78	27,2		
3		76,5		76,6	3,41	76,2		
4		38,0		37,8		37,3		
5		87,5		85,6		86,8		
6	5,97 <i>dd</i> (9,7; 2,2)	133,0	6,13 <i>dd</i> (9,7; 2,1)	134,1	5,99	131,0		
7		132,0		130,8	5,65	132,8		
8	2,90	42,6	1,90	38,7	2,89	41,7		
9		49,0		49,7		48,0		
10		41,5		41,5	2,41	40,5		
11		23,8		23,3	1,60/1,76	23,2		
12		30,3		30,4	1,62	30,6		
13		45,8		45,9		45,1		
14		48,7		48,8		48,3		
15		34,3		34,2	1,34/1,40	33,5		
16		28,5		28,4	1,39/1,97	28,1		
17		50,7		50,8	1,46	50,3		
18		15,0		15,3	0,88	14,7		
19	5,18	112,5	4,91	115,4	4,65	112,1		114,9
20		36,9		36,9		36,3		
21		19,0		19,1	0,97	18,8		
22		40,0		40,1		39,6		
23	5,48 *	128,7		128,7	5,92	128,3		
24	5,38 <i>dl</i> (15,9)	138,1		138,1	5,92	137,6		
25		75,1		75,1		74,7		
26		26,2		26,2	1,54	26,0		
27		26,5		26,5	1,54	26,4		
28		20,2		20,3	0,85	21,1		
29		24,4		24,6	1,22	24,8		
30		20,8		21,0	0,86	19,9		
19-OCH ₃	3,30	57,7	3,33	57,4	3,38	57,2	3,40	57,6
25-OCH ₃	2,90	50,2	2,90	50,4	3,22	50,0		

* Sobrepostos

O trabalho de Okabe *et al.* (1982) relata a presença de uma mistura de dois metilacetais que foi obtida por meio de uma metanólise, em condições brandas de

reação da substância momordicosídeo K, isolada dos frutos imaturos de *Momordica charantia*, que é um derivado com estrutura semelhante à de CC1, mas com a presença de um grupo glucopiranosil em C7 do esqueleto básico das cucurbitacinas. A separação e purificação destas substâncias foram feitas após a acetilação, obtendo os correspondentes acetatos. Os metilacetais se caracterizaram por ter os sinais em RMN ^{13}C a δ 57,2 e 57,6 para os dois carbonos metoxílicos do acetal e δ 112,1, dubleto e 114,9, dubleto, para os dois carbonos acetálicos, respectivamente. Nesse trabalho, os autores, baseando-se nos dados espectrais dos acetais obtidos, presumiram ser um deles um composto que deveria ter a cadeia lateral original, um anel metilacetal em “ponte” com os carbonos C5, sem hidrogênio e C19, metínico, e um dupla ligação dissustituída no núcleo, denominando-o de 5,19-epóxi-19,25-dimetóxi-5 β -cucurbita-6,23-dien-3 β -ol. O produto minoritário obtido apresentou espectro de RMN ^1H similar ao primeiro acetal, embora os sinais do próton do acetal e de um dos prótons olefínicos da dupla ligação ocorreram a um campo um pouco mais alto a δ 4,62 (versus δ 4,83) e a δ 5,53 (versus δ 5,63), respectivamente, indicando ser o outro acetal o isômero no qual a configuração do C19 do acetal diferia. Assim, segundo esses autores, pelo fato do composto minoritário requerer condições mais drásticas para acetilação, indicaria que o grupo hidroxila desse composto seria mais estericamente impedido que o majoritário, conseqüentemente, a configuração relativa do C19 do minoritário seria S, enquanto que o outro seria o R-isômero.

Buscando, então, a confirmação da relação espacial dos substituintes ao redor do C19 dos compostos encontrados em CC3, utilizou-se os experimentos bidimensionais NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) e COSY (Correlation Spectroscopy). Os experimentos NOESY têm grande aplicação na resolução de problemas de atribuição estereoquímica e tem como objetivo fornecer informações sobre os prótons que estão a cinco Angstroms ou menos de distância no espaço (GIL; GERALDES; 2002) apresentando correlação direta ou espacial entre as nuvens eletrônicas; já o COSY é utilizado para indicar que núcleos estão sendo correlacionados, indiretamente via ligação química, isto é, baseia-se na constante de acoplamento J , para fornecer a correlação *spin-spin* (SILVERSTEIN; WESTER; 2000).

Assim, observando o espectro COSY de CC3 (Figuras 45 e 46) foi possível estabelecer que o próton H6 em δ 5,95 (considerado do isômero 19-*R*) está acoplado com o próton H7 em δ 5,50 e com o próton referente H8 em 2,86; enquanto que o próton H6 em 6,09 do isômero 19*S* também acopla com o próton do H7 em δ 5,50 e com o próton H8 em δ 1,91; indicando desta forma que a alteração na configuração ao redor do C19 afeta os deslocamentos químicos do próton H8, conforme indicado na Tabela 11.

Outra correlação possível de se estabelecer pela análise dos espectros de COSY de CC3 é a do próton do H19 tido como *R* em δ 4,68 com o próton H10 em δ 2,45, sendo um acoplamento a longa distância do tipo 4J , o que, no entanto, não ocorre com o próton H19 considerado *S*. A partir da análise do espectro NOESY (Figuras 47 e 48), constata-se que o próton do H19 *R* está próximo dos prótons H1, (a δ 1,58), H11 (a δ 1,67) e H12 (a δ 1,83); demonstrando que a disposição espacial ao redor do carbono C19 está de acordo com a proposta, como indicado na Figura 49.

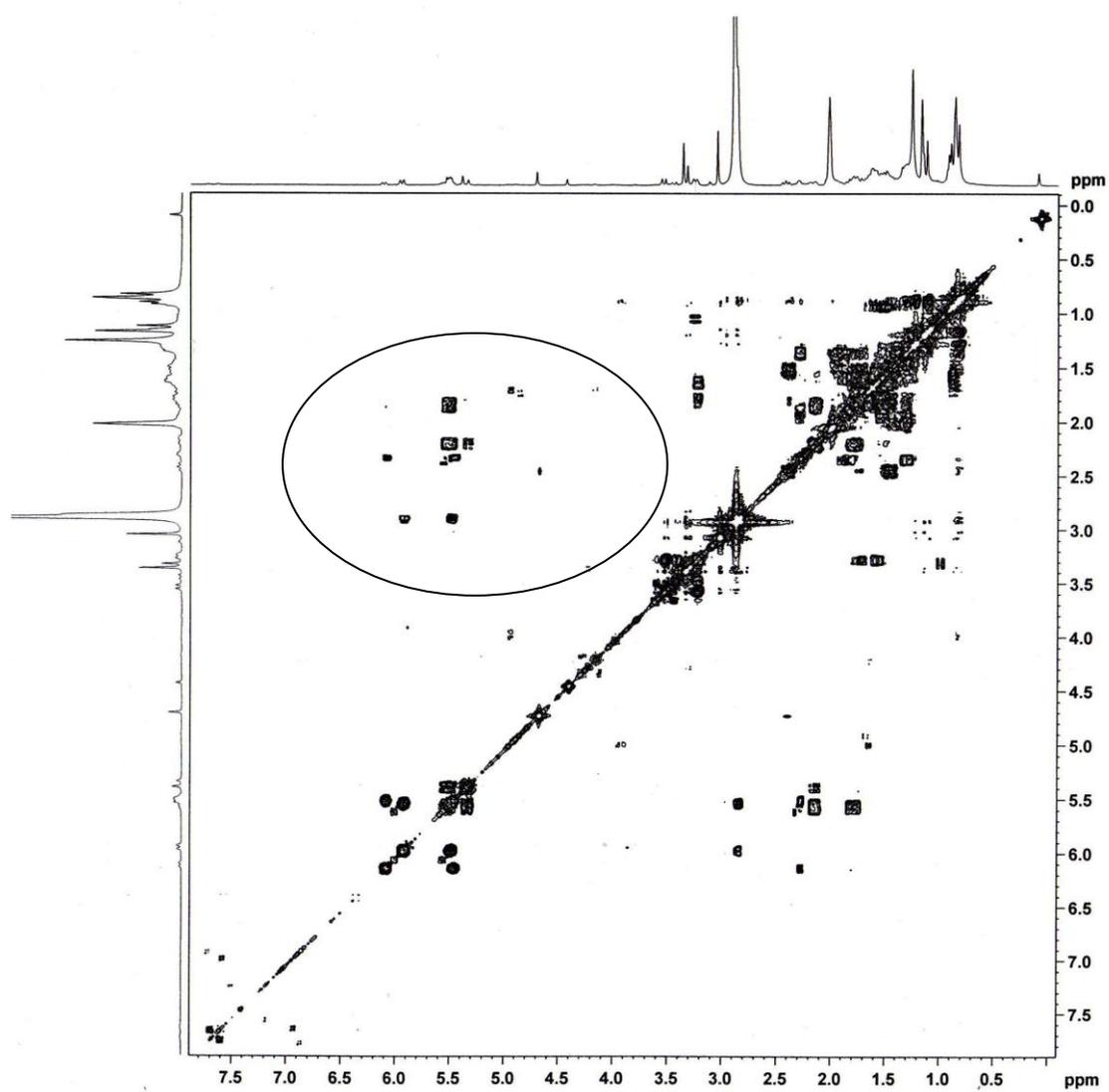


Figura 45 – Espectro ^1H – ^1H COSY, 300 MHz, da CC3 (visão geral)

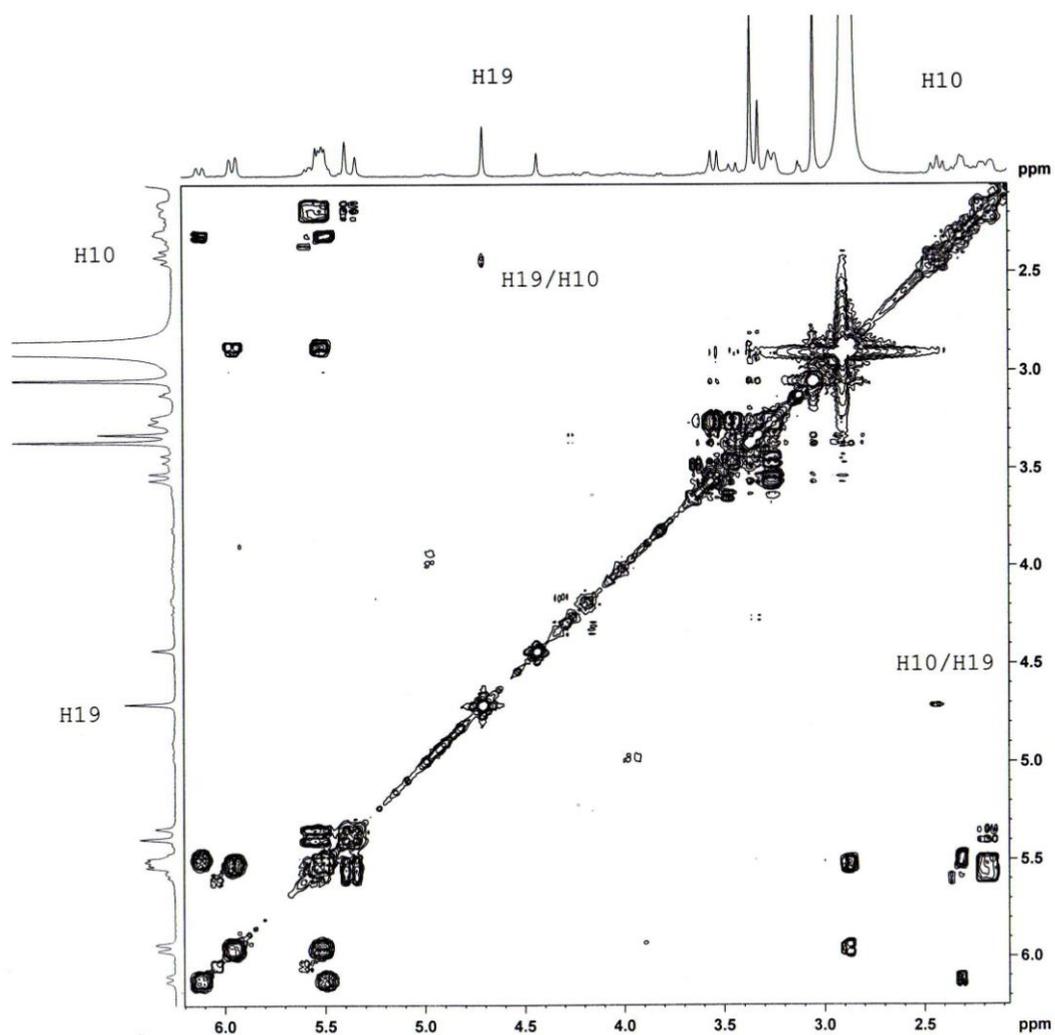


Figura 46 – Espectro $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY, 300 MHz, da CC3 (ampliação da região em destaque da Figura 45)

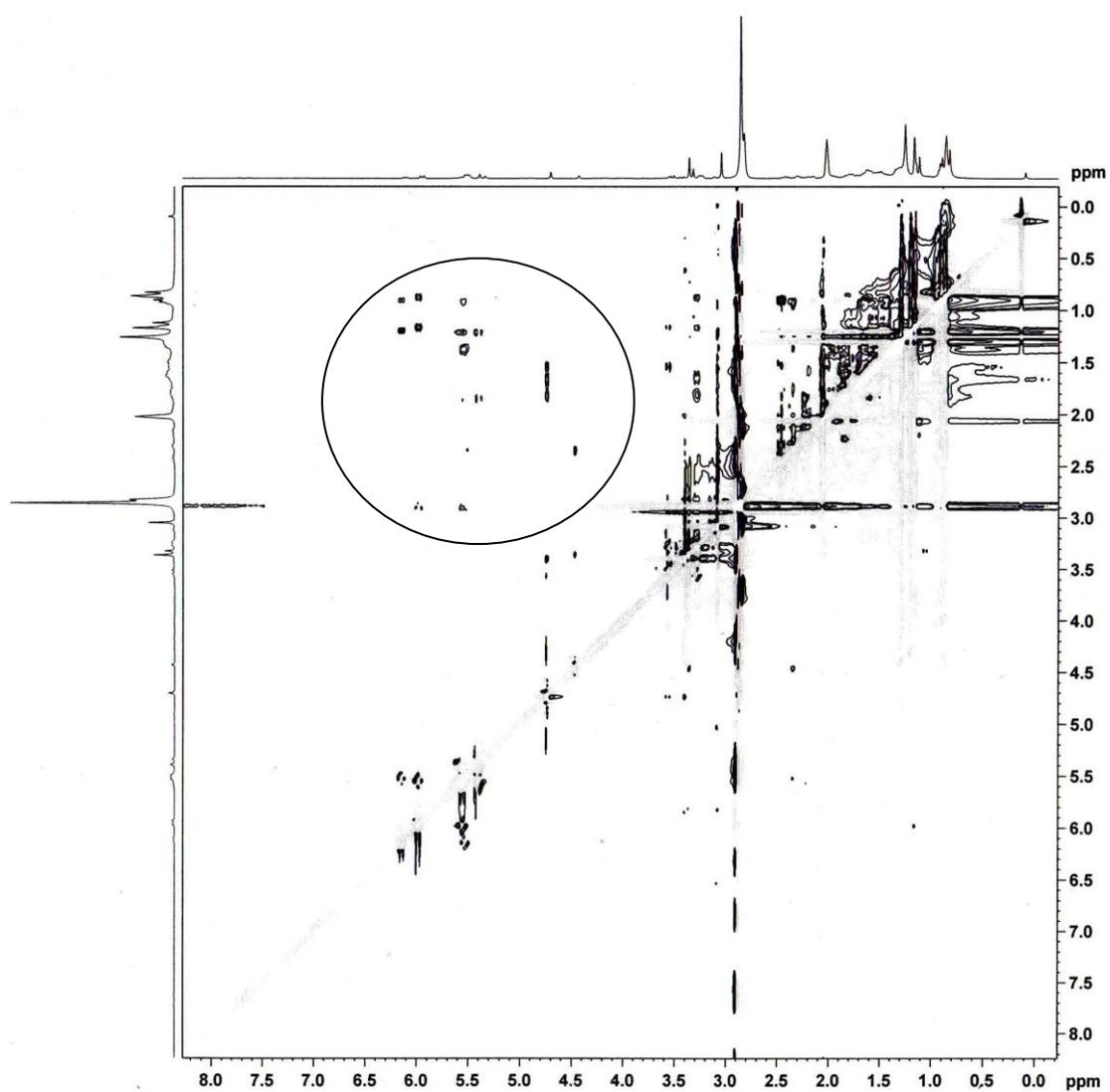


Figura 47 – Espectro ^1H – ^1H NOESY, 300 MHz, da CC3 (visão geral)

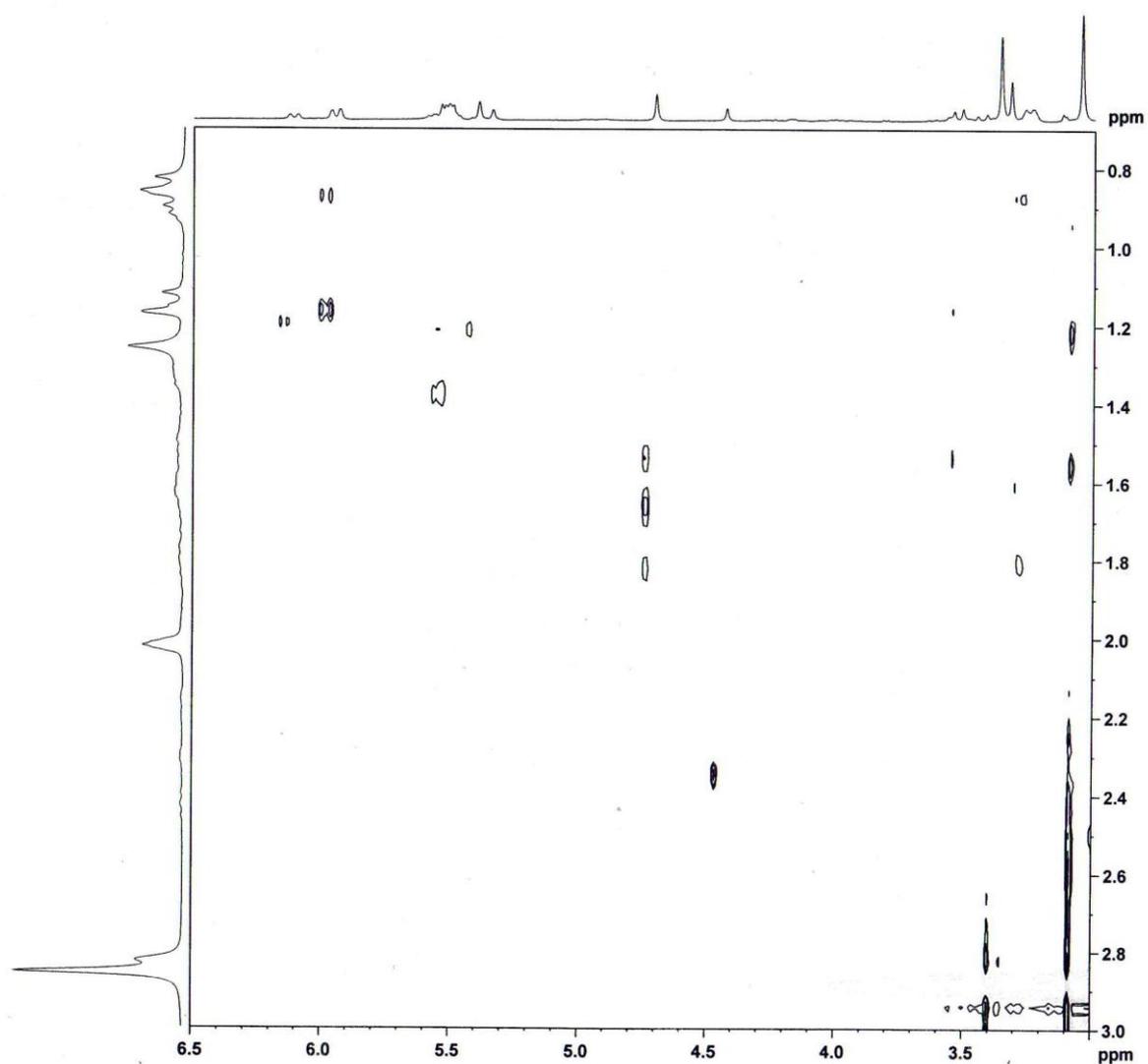


Figura 48 – Espectro $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NOESY, 300 MHz, da CC3 (ampliação da região em destaque da Figura 47)

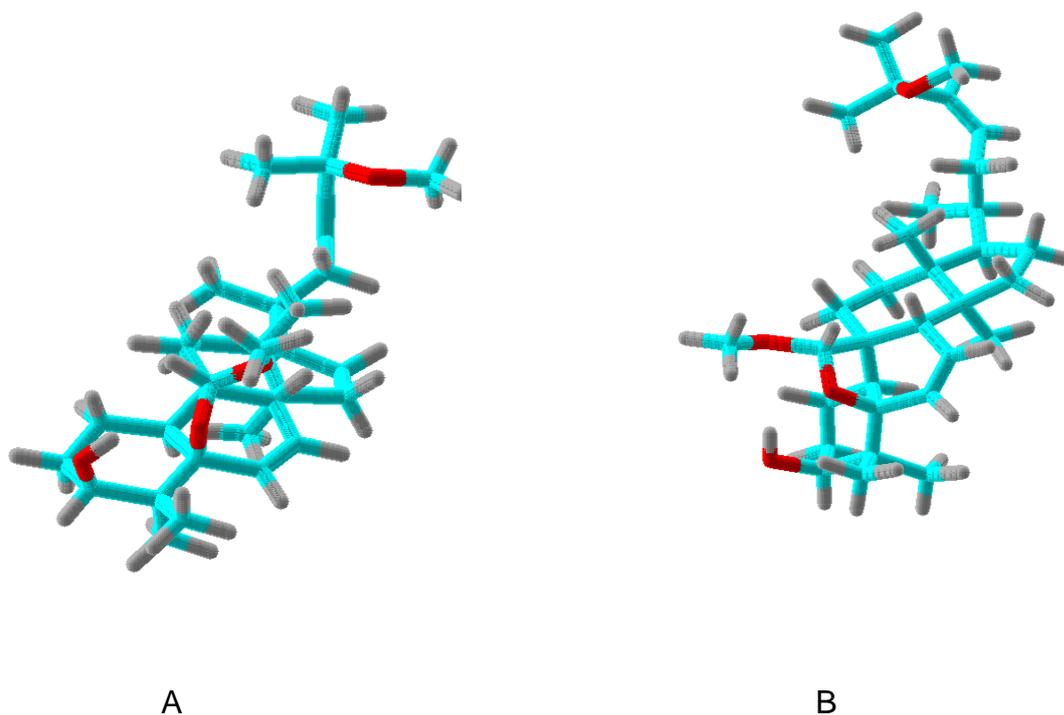


Figura 49 – Visão tridimensional dos estereoisômeros 19-*R* (A) e 19-*S* (B) de CC3
 Fonte: Estruturas desenhadas pela Dra. Edilene Delphino Rodrigues, utilizando o programa PCMODEL 7.0

5.4.3.4 Identificação estrutural da substância CC5

Outra substância analisada foi a denominada de CC5, obtida da mesma fração da CC3. Pela análise do seu espectro de RMN ^1H foi possível verificar que se trata também de uma mistura de dois compostos, em proporção de 2:1, considerando a relação entre os valores das integrações dos sinais em δ 4,70 (H-19, majoritário) e em δ 4,42 (H-19, minoritário), Figura 50. O seu espectro de RMN de ^{13}C (Figura 51) apresenta sinais com os deslocamentos próximos dos dois estereoisômeros metilacetais encontrados na amostra CC3, com a diferença nos picos ao redor dos carbonos olefínicos C23 e C24, semelhante ao relatado na substância CC2 (página 101), e ausência do sinal do grupamento metóxi em C25, mas com o surgimento do sinal de carbono tetrasubstituído carbinólico a δ 70,16.

Essa amostra foi submetida às técnicas bidimensionais heteronucleares HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) e HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) que se caracterizam por correlacionar os ^1H e ^{13}C , permitindo

determinar quais hidrogênios estão ligados a quais carbonos. Assim, o HSQC indica que próton está diretamente ligado ao carbono, enquanto que HMBC o acoplamento do próton com seu carbono vizinho (SILVERSTEIN; WESTER; 2000). Por essas análises foi possível estabelecer todos os deslocamentos de ^1H e seus respectivos ^{13}C apresentados na Tabela 11, demonstrando que CC5 trata-se de uma mistura dos estereoisômeros do epímero monometoxilado da CC3 (Figura 50). Essas análises possibilitaram, também, confirmar as observações feitas sobre as configurações dos estereoisômeros de CC3, conseqüentemente, de CC5.

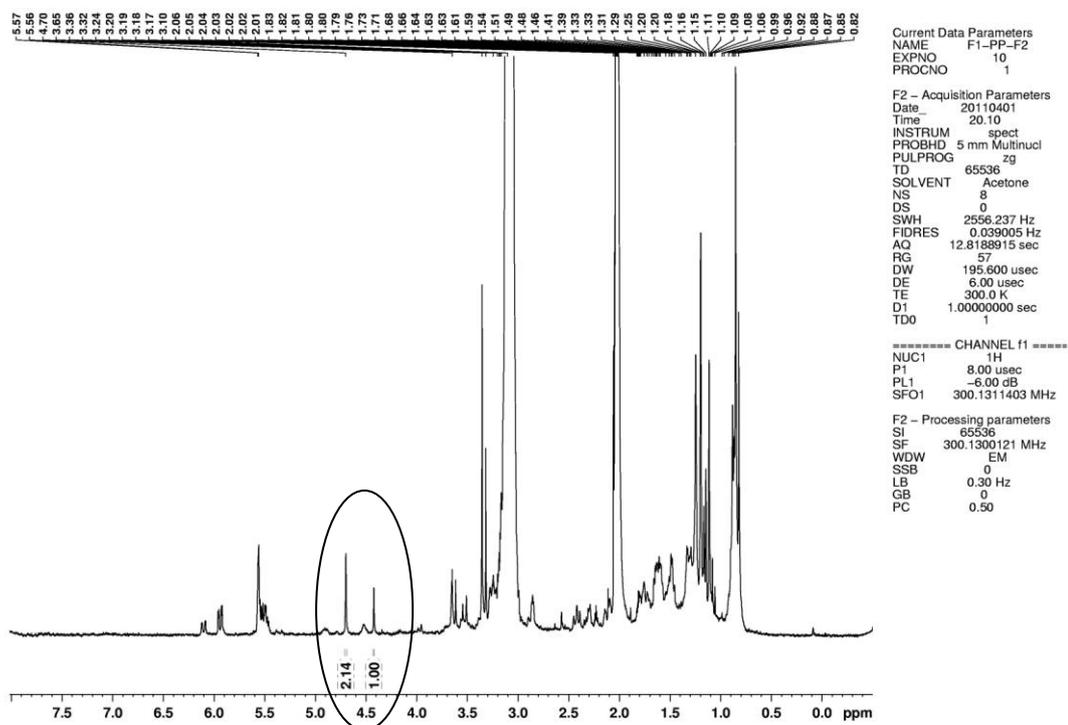


Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H de CC5, destacando as integrações dos sinais em δ 4,70 (H-19, majoritário) e em δ 4,42 (H-19, minoritário) da amostra CC5

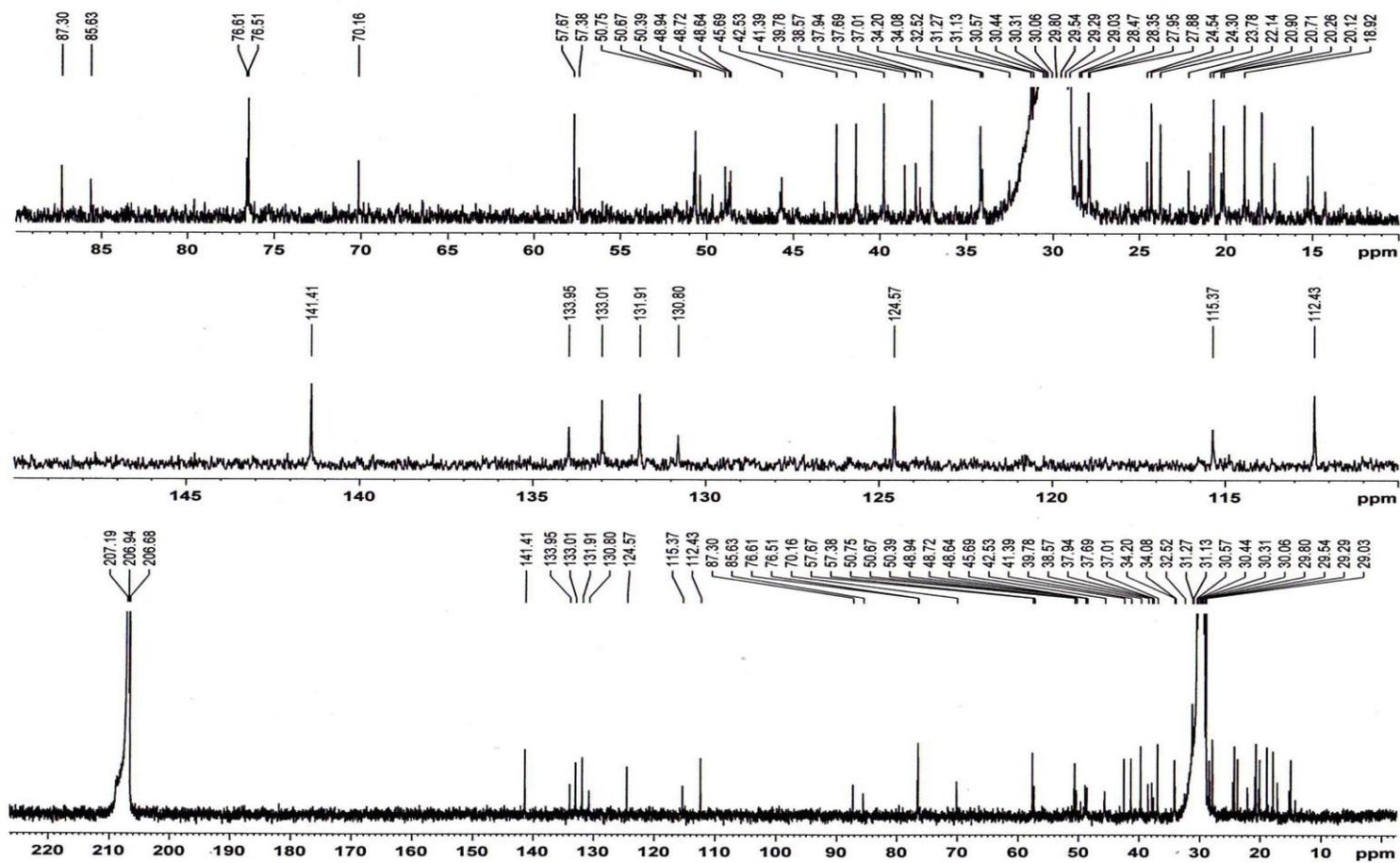
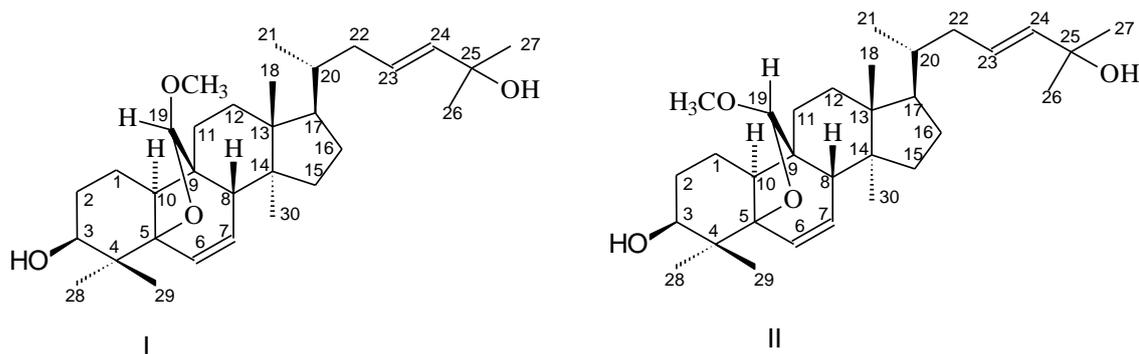


Figura 51 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz – acetona d₆) da amostra CC5

Tabela 12 – Dados experimentais de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) em acetona- d_6 dos dois estereoisômeros de CC5 e do isômero (19*R*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19,-metoxicucurbita-6,23-dien-3,25-diol (KIMURA *et al.*; 2005; MURAKAMI *et al.*; 2001; OKABE; MIYAHARA; YAMAUCHI; 1982).

Posição	CC5		(19 <i>R</i> ,23 <i>E</i>)-5 β ,19-epóxi-19-metoxicucurbita-6,23-dien-3,25-diol (piridina- d_5)		
	Majoritário – 19 <i>R</i>		minoritário – 19 <i>S</i>		
	δH	δC	δH	δC	δC
1	1,47	17,9	1,29	17,2	18,7
2	1,75	27,9	1,59	27,9	27,4
3	3,24 <i>dd</i> (10,1; 3,1)	76,5	3,27	76,6	76,2
4		37,9		37,7	39,1
5		87,3		85,6	85,6
6	5,94 <i>dd</i> (8,0; 2,2)	133,0	6,10 <i>dd</i> (9,8; 2,1)	133,9	133,2
7	5,53 <i>dd</i> (9,8; 3,5)	131,9	5,47 <i>dd</i> (9,8; 3,5)	130,8	131,6
8	2,87	42,5	1,91	38,6	42,3
9		48,6		48,7	48,3
10	2,45	41,4	2,41	41,34	41,7
11	1,61	23,8	1,65	22,1	23,4
12	1,20	30,6	1,26	30,4	30,9
13		45,7		45,7	45,3
14		48,9		48,9	48,4
15	1,36;1,28	34,2	1,36;1,28		33,9
16	1,31;1,27	28,5	1,32;1,16	28,3	28,2
17	1,48	50,7	1,45	50,8	50,4
18	0,86	15,0	0,89	15,3	14,9
19	4,70	112,5	4,42	115,4	112,5
20	1,48	37,0	1,48	37,0	36,6
21	0,89	18,8	0,89	18,8	18,9
22	2,1; 1,71	39,8	2,1; 1,71	39,8	39,6
23	5,59 *	124,6	5,59	124,6	124,4
24	5,58*	141,4	5,58	141,4	141,7
25		70,2		70,2	69,7
26	1,58; 1,0	31,3	1,58;1,0	31,1	30,8
27	1,58; 1,0	31,3	1,58; 1,0	31,1	30,8
28	1,11	20,7	1,15	20,9	21,2
29	0,82	24,3	0,85	24,5	24,9
30	0,86	20,1	0,86	20,3	20,0
19-OCH ₃	3,36	57,7	3,32	57,4	57,7

* Sobrepostos – 5,59 – 5,55



I - (19*R*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19-metoxicucurbita-6,23-dien-3,25-diol

II - (19*S*,23*E*)-5 β ,19-epóxi-19-metoxicucurbita-6,23-dien-3,25-diol

Figura 52 – Estruturas dos diastereoisômeros 19-*R* e 19-*S* de CC5

A substância CC4 não foi possível analisar em virtude da pequena quantidade disponível.

As quantidades obtidas dessas cinco substâncias isoladas e suas atividades no ensaio em promastigotas de *L. amazonensis* encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Substâncias isoladas do fracionamento biomonitorado por atividade antileishmania de *Momordica charantia* L., suas respectivas massas e CI_{50} das atividades antipromastigotas de *L. amazonensis*

Substância	Massa (mg)	CI_{50} (μ g/mL)
CC1	10,1	5,21
CC2	90,0	4,79
CC3	4,1	4,68
CC4	1,7	4,64
CC5	2,6	5,05

O principal aspecto detectado ao analisar a Tabela 13 é que não há diferença significativa no perfil de atividade antileishmania das cinco substâncias isoladas. Esse fato vem corroborar com o que vinha sendo encontrado nas análises de perfil de atividade biológica das frações obtidas, de que não é uma substância específica responsável pela atividade e, sim, um conjunto de substâncias, podendo inferir que atuam em conjunto, potencializando umas às outras, já que a atividade delas isoladas foram menores do que quando juntas nas frações.

Portanto, foram caracterizadas seis substâncias, sendo que quatro delas correspondem a dois pares de estereoisômeros. Estas substâncias pertencem ao grupo dos triterpenos, os quais, segundo Rocha *et al.* (2005), é considerado o segundo grupo de metabólitos secundários com atividade antileishmania (12,1%). Pode-se relacionar cinco fatores que provavelmente estão determinando a atividade antileishmania destas substâncias em promastigotas: 1^o – todas têm o núcleo cucurbitano; 2^o – todas têm o mesmo grau de oxigenação que é 4; 3^o – todas têm a posição C3 hidroxilada, fator que Torres-Santos *et al.* (2004) sugeriram ser importante para a atividade antipromastigota; 4^o – apresentam a cadeia lateral semelhante, com uma função metoxila ou álcool em C25 e 5^o – C19 oxigenado, com função aldeído ou acetal, um aldeído disfarçado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo primário deste trabalho foi a descoberta de substâncias bioativas a partir de plantas medicinais usadas pela população desta região do Cerrado, em especial princípios ativos que possam ser úteis no combate às leishmanioses; considerando as drásticas consequências a que estão sujeitas as pessoas acometidas por essa doença, um problema de saúde pública nesta região e no Brasil como um todo.

O uso dos extratos ou frações mais purificadas das partes aéreas da espécie *Momordica charantia* L. no combate ao parasito *Leishmania* pode ser uma possibilidade realizável, já que os resultados apresentados nesse estudo está mostrando que não há uma substância bioativa, mas sim um complexo de princípios ativos e que o seu extrato e fração mais purificada apresentaram atividade anti-mastigota. Alguns aspectos podem corroborar a necessidade de continuidade desses estudos: a maioria dos estudos tem sido conduzida usando preparações dos extratos brutos de *M. charantia* (GROVER; YADAV; 2004); como o extrato etanólico dos frutos que tem sido considerado seguro por não apresentar nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e nem alterações nos parâmetros hematológicos (PLATEL; SHURPALEKAR; SRINIVASAN; 1993; VIRDI *et al.*; 2003); os frutos e sementes têm demonstrado serem mais tóxicos que as folhas ou partes aéreas, que foram as partes estudadas nesse trabalho (GROVER; YADAV; 2004).

Outros estudos salientam alguns efeitos tóxicos da planta toda e dos frutos da *Momordica charantia*, como hipoglicemia, especialmente em crianças e convulsões, redução da fertilidade em camundongos (BASCH; GABARDI; ULBRICHT; 2003); ação abortiva das sementes (CHAN *et al.*; 1985; TAM; CHAN; YEUNG; 1984); efeitos genotóxicos do extrato de toda a planta (RUIZ *et al.*; 1996) e inibição do complexo enzimático CYP2C9 e da glutathione-S-Transferase, o que pode ter implicações com interações entre drogas (APPIAH-OPONG *et al.*; 2008). Outro trabalho, porém, ao avaliar essas enzimas nos frutos de MC, considerou-os com potencial protetivo (KUSAMRAN; RATANAVILA; TEPSUWAN; 1998).

Todos esses trabalhos mostram que essa planta já tem muitos dados sobre sua eficácia e segurança, o que facilitaria o direcionamento para os estudos de fase pré-clínica e clínica, podendo se tornar um bom candidato a fitoterápico. Porém,

todos esses estudos foram conduzidos em centros de pesquisa em outros países, especialmente em países da Ásia, por isso a necessidade de desenvolver estudos com os espécimes do Brasil, principalmente porque há indicações da existência de variedades botânicas (LORENZI; MATOS; 2002).

Assim, considerando o potencial anti-*Leishmania* apresentado pelo extrato, fração purificada e substâncias isoladas de *Momordica charantia*; que essa planta faz parte da relação de 74 plantas selecionadas no Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais do Ministério da Saúde para implantação da fitoterapia no SUS (BRASIL; 2006b) e que o segmento de fitoterápicos no Brasil faturou de novembro de 2003 a outubro de 2006 mais de 1 milhão e 840 mil reais com a venda de mais de 122 mil unidades farmacêuticas (FREITAS; 2007), fica evidente a necessidade de mais estudos e pesquisas com essas substâncias e em especial com o extrato de *Momordica charantia* L. com o objetivo de avaliar melhor o mecanismo de ação dessas substâncias, suas possibilidades de utilização *in vivo*, toxicidade e segurança.

6 CONCLUSÃO

Ao estudar 14 espécies de plantas utilizadas como medicinais pela população, na região de cerrado de Bonito/MS e avaliar suas atividades biológicas e antirradicalar, concluiu-se que:

- A etnofarmacologia é uma ferramenta importante e produtiva para a busca de substâncias bioativas, pois das catorze espécies testadas, 85,7% apresentaram atividade de moderada a alta em pelo menos uma das atividades avaliadas;
- as espécies *Bowdichia virgilioides*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Luehea paniculata* e *Maprounea guianensis* apresentaram atividade anti-*Staphylococcus aureus* com um CIM variando de 250 a 500 µg/mL.
- nove espécies apresentaram atividade em pelo menos uma das cepas fúngicas testadas, destacando as folhas de *Bowdichia virgilioides* e folhas e cascas de *Maprounea guianensis* com CIM de 31,25; 62,5 e 62,5 µg/mL, respectivamente contra *Cryptococcus neoformans*.
- duas espécies, *Bowdichia virgilioides* e *Macrosiphonia petraea*, apresentaram uma alta citotoxicidade sobre *Artemia salina* com DL₅₀ de 3,53 e 16,6 µg/mL, respectivamente.
- as espécies *Hymenaea stigonocarpa*, *Luehea paniculata*, *Maprounea guianensis* e a planta conhecida como douradinha apresentaram uma ótima capacidade sequestradora de radical livre com CI₅₀ variando de 9,62 a 16,85 µg/mL.
- o potencial de investigação fitoquímica e biológica das espécies *Luehea paniculata*, *Macrosiphonia petraea* e *Maprounea guianensis*, por apresentarem pouquíssimos a nenhum estudo quanto à composição química e atividades biológicas.
- a espécie *Momordica charantia* L., conhecida como melão-de-são-caetano, revelou ação antileishmania, ao apresentar atividade para formas promastigotas com uma CI₅₀ = 6,25 µg/mL; bem como a forte atividade anti-amastigota da fração acetato de etila e sua subfração F7;
- o potencial antileishmania foi expresso tanto no extrato quanto nas substâncias isoladas;
- cinco substâncias foram isoladas do extrato bruto etanólico de *Momordica charantia* L. com o mesmo perfil de atividade antipromastigotas;

- seis substâncias tiveram suas estruturas elucidadas: são triterpenos do tipo cucurbitano (cucurbitacinas);
- este é o primeiro relato de ação antileishmania das cucurbitacinas.

REFERÊNCIAS

Albuquerque U P D, Andrade L D H C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 2002;16:273-85.

Alho C, Martins E. De grão em grão o Cerrado perde espaço (Cerrado - impactos do processo de ocupação). Brasília-DF: WWF - Fundo Mundial para a Natureza; 1995.

Ali S S, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A *et al*. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. 2008;41(1):1-15.

Almeida S P, Silva J A. Piqui e buriti - importância alimentar para a população dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 1994.

Almeida S P, Silva J A, Ribeiro J F. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. 2 ed. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 1990.

Almeida S P D, Proença C E B, Sano S M, Ribeiro J F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 1998.

Altmann K H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001;5(4):424-31.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet J P *et al*. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(2):334-59.

Alves E O, Mota J H, Soares T S, Vieira M D C, Silva C B D. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciência e Agrotecnologia*. 2008;32:651-8.

Alves T M D, Silva A F, Brandao M, Grandi T S M, Smania E D A, Junior A S *et al*. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(3):367-73

Alves W A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil [on line]. 2009; [Acesso em 20/10/2010]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/outros/bepa71_lva.pdf.

Appiah-Opong R, Commandeur J N, Axson C, Vermeulen N P. Interactions between cytochromes P450, glutathione S-transferases and Ghanaian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(12):3598-603.

Asquith T, Mehansho H, Rogler J, Butler L, Carlson D M. Induction of Proline-Rich Protein-Biosynthesis in Salivary-Glands by Tannins. *Federation Proceedings*. 1985;44(4):1097-.

Balunas M J, Kinghorn A D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 2005;78(5):431-41.

Barbosa A S, Schmitz P I. Ocupação indígena no cerrado: esboço de uma história. In: Sano S, Almeida S, editors. *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 1998. p. 3-45.

Barreiro E J, Fraga C A M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.

Basano S D A, Camargo L S M A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004;7:328-37.

Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2003;60(4):356-9.

Basselin M, Badetdenisot M A, Lawrence F, Robertgero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Experimental Parasitology*. 1997;85(3):274-82.

Basselin M, Lawrence F, Robertgero M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Biochemical Journal*. 1996;315:631-4.

Begossi A, Hanazaki N, Tamashiro J Y. Medicinal plants in the Atlantic Forest (Brazil): Knowledge, use, and conservation. *Human Ecology*. 2002;30(3):281-99.

Begum S, Ahmed M, Siddiqui B S, Khan A, Saify Z S, Arif M. Triterpenes, a sterol and a monocyclic alcohol from *Momordica charantia*. *Phytochemistry*. 1997;44(7):1313-20.

Beloin N, Gbeassor M, Akpagana K, Hudson J, De Soussa K, Koumaglo K *et al*. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;96(1-2):49-55.

Berman J D. Chemotherapy for Leishmaniasis - Biochemical-Mechanisms, Clinical Efficacy, and Future Strategies. *Reviews of Infectious Diseases*. 1988;10(3):560-86.

Berman J D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;24(4):684-703.

Beutler J A, Kashman Y, Tischler M, Cardellina J H, Gray G N, Currens M J *et al*. Hiv-Inhibitory Natural-Products .23. A Reinvestigation of *Maprounea* Triterpenes. *Journal of Natural Products-Lloydia*. 1995;58(7):1039-46.

Boldi A M. Libraries from natural product-like scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2004;8(3):281-6.

Bolton J L, Trush M A, Penning T M, Dryhurst G, Monks T J. Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*. 2000;13(3):135-60.

Borlaug N E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: Bailey R, editor. *Global warming and other eco-myths*. Roseville, EUA: Competitive Enterprise Institute; 2002. p. 29-60.

Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug-resistance in parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology*. 1995;49:427-60.

Braca A, Siciliano T, D'arrigo M, Gennano M P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*. 2008;79(2):123-5.

Brandão M, Laca-Buendia J P. Folhas, flores, frutos e sementes do Cerrado e sua utilização em arranjos ornamentais. *Informe Agropecuário*. 1991;6(61):4-8.

Brandwilliams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1995;28(1):25-30.

Brasil M-S-. Guia de vigilância epidemiológica/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6 ed. [on line]. Brasília-DF: Ministério da Saúde; 2005; [Acesso em 15 jan 2010]. Disponível em: http://prosaude.org/publicacoes/guia/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf.

Brasil M-S-. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial [on line]. Brasília: Ministério da Saúde; 2006a; [Acesso em 01/07/2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/atlas_lta.pdf.

Brasil M-S-. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. - 2. ed. atual [on line]. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007; [Acesso em 15 Jan 2011]. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_lta_2ed.pdf >.

Brasil M-S-. Guia de Vigilância Epidemiológica - 7. ed. [on line]. Brasília: Ministério da Saúde; 2009; [Acesso em 01/08/2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vigilancia_epidemiologia_2010_web.pdf.

Brasil M-S-. Boletim Eletrônico Epidemiológico: Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública [on line]. Ministério da Saúde; 2010; [Acesso em 25/01/2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemiol_zoonoses_br.pdf.

Brasil M D S S D C E T E I E D D a F. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos [on line]. Brasília: Ministério da Saúde; 2006b; [Acesso em 25 Fev 2011]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf.

Bryceson A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Tropical Medicine & International Health*. 2001;6(11):928-34.

Butler M S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*. 2004;67(12):2141-53.

Cardoso Da Silva J M, Bates J M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. *BioScience*. 2002;52(3):225-34.

Carney J R, Krenisky J M, Williamson R T, Luo J, Carlson T J, Hsu V L *et al.* Maprouneacin, a new daphnane diterpenoid with potent antihyperglycemic activity from *Maprounea africana*. *Journal of Natural Products*. 1999;62(2):345-7.

Chan-Bacab M J, Pena-Rodriguez L M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*. 2001;18(6):674-88.

Chan W Y, Tam P P, So K C, Yeung H W. The inhibitory effects of beta-momorcharin on endometrial cells in the mouse. *Contraception*. 1985;31(1):83-90.

Chan W Y, Tam P P, Yeung H W. The termination of early pregnancy in the mouse by beta-momorcharin. *Contraception*. 1984;29(1):91-100.

Chen J C, Chiu M H, Nie R L, Cordell G A, Qiu S X. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Natural Product Reports*. 2005;22(3):386-99.

Chowdhury a R, Mandal S, Goswami A, Ghosh M, Mandal L, Chakraborty D *et al.* Dihydrobetulinic acid, induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: Implications in antileishmanial therapy. *Molecular Medicine*. 2003;9(1-2):26-36.

Christensen S B, Ming C, Andersen L, Hjerne U, Olsen C E, Cornett C *et al.* An antileishmanial chalcone from Chinese licorice roots. *Planta Medica*. 1994;60(2):121-3.

Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature*. 2004;432(7019):829-37.

Cos P, Vlietinck a J, Vanden Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;106(3):290-302.

Costa E V, Pinheiro M L B, Xavier C M, Silva J R A, Amaral A C F, Souza A D L *et al.* A pyrimidine-beta-carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*. 2006;69(2):292-4.

Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Pina E, Roux P *et al.* Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of Cell Science*. 2002;115(11):2303-16.

Croft S L, Coombs G H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*. 2003;19(11):502-8.

Croft S L, Seifert K, Duchene M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003;126(2):165-72.

Croft S L, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*. 2006;123(3):399-410.

Cunnick J M, Hurt D, Oppert B, Sakamoto K, Takemoto D J. Binding of the Gamma-Subunit of Retinal Rod-Outer-Segment Phosphodiesterase with Both Transducin and the Catalytic Subunits of Phosphodiesterase. *Biochemical Journal*. 1990;271(3):721-7.

David J P, Meira M, David J M, Guedes M L D S. Triterpenos e ferulatos de alquila de *Maprounea guianensis*. *Química Nova*. 2004;27:62-5.

De Carvalho P B, Ferreira E I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*. 2001;72(6):599-618.

De Oliveira J P, Fernandes F, Cruz A K, Trombela V, Monteiro E, Camargo A A *et al.* Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2007;6:5.

Delorenzi J C, Attias M, Gattass C R, Andrade M, Rezende C, Da Cunha Pinto A *et al.* Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2001;45(5):1349-54.

Delorenzi J C, Freire-De-Lima L, Gattass C R, De Andrade Costa D, He L, Kuehne M E *et al.* In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2002;46(7):2111-5.

Dermarderosian A, Beutler J A. *The Review of Natural Products*. 4.ed ed. St. Louis, Missouri: Facts & Comparisons; 2005.

Desjeux P. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clinics in Dermatology*. 1999;17(3):317-25.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;27(5):305-18.

Dewick P M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 2 ed. West Sussex, England: John Wiley & Sons, LTD; 2002.

Dias B F S. A conservação da natureza. In: Pinto Mn, editor. Cerrado. Brasília: Editora da Universidade de Brasília; 1993. p. 607-64.

Dickson R A, Houghton P J, Hylands P J. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*. *Phytochemistry*. 2007;68(10):1436-41.

Dorval M E, Alves T P, Cristaldo G, Rocha H C, Alves M A, Oshiro E T *et al*. Sand fly captures with Disney traps in area of occurrence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010;43(5):491-5.

Dorval M E, Oshiro E T, Cupollilo E, Castro A C, Alves T P. [Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006;39(1):43-6.

Dutfield G. Opinion: Why traditional knowledge is important in drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*. 2010;2(9):1405-9.

Eiten G. Vegetação. In: Pinto Mn, editor. Cerrado. Brasília: Editora da Unibversidade de Brasília; 1993. p. 17-73.

Elisabetsky E, Wannmacher L. The Status of Ethnopharmacology in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 1993;38(2-3):137-43.

Estomba D, Ladio A, Lozada M. Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;103(1):109-19.

Etkin N L, Elisabetsky E. Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: The future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):23-6.

Fairlamb A H, Cerami A. Metabolism and Functions of Trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*. 1992;46:695-729.

Farnsworth N R, Akerele O, Bingel A S, Soejarto D D, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organiztion*. 1985;63(6):965-81.

Fatope M O, Takeda Y, Yamashita H, Okabe H, Yamauchi T. New Cucurbitane Triterpenoids from *Momordica charantia*. *Journal of Natural Products*. 1990;53(6):1491-7.

Feldman S. From Poison Arrows to Prozac: How deadly toxins changed our lives forever. London: Metro Books; 2009.

Fournet A, Ferreira M E, Dearias a R, Deortiz S T, Fuentes S, Nakayama H *et al.* In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996;40(11):2447-51.

Freitas A D. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira [on line]. Ministério da Saúde/Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento; 2007; [Acesso em 01 mar 2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf.

Fumaral F, Garchitorena M. *Artemia salina*. Recolección, descapsulación y desarrollo. *Revista Aquamar*. 1996;Año4(3):22-4.

Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*. 2004;155(4):224-30.

Ganguly C, De S, Das S. Prevention of carcinogen-induced mouse skin papilloma by whole fruit aqueous extract of *Momordica charantia*. *European Journal of Cancer Prevention*. 2000;9(4):283-8.

Gavilanes M L, Brandão M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. *Informe Agropecuário*. 1992;16(173):40-4.

Gazzaneo L R, De Lucena R F, De Albuquerque U P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2005;1:9.

Germonprez N, Maes L, Van Puyvelde L, Van Tri M, Tuan D A, De Kimpe N. In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005;48(1):32-7.

Gil V M S, Geraldês C F G C. Ressonância magnética nuclear: Fundamentos, métodos e aplicações. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2002.

Gottlieb O R, Borin M R M B. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*. 1994;66(Suplemento 1 - Parte 1):205-10.

Grimaldi G, Jr., Tesh R B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Review*. 1993;6(3):230-50.

Grogl M, Thomason T N, Franke E D. Drug-Resistance in Leishmaniasis - Its Implication in Systemic Chemotherapy of Cutaneous and Mucocutaneous Disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;47(1):117-26.

Grover J K, Yadav S P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;93(1):123-32.

Guarim Neto G, Morais R G D. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasílica*. 2003;17:561-84.

Guidi I, Galimberti D, Lonati S, Novembrino C, Bamonti F, Tiriticco Met al. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2006;27(2):262-9.

Gupta S, Raychaudhuri B, Banerjee S, Das B, Mukhopadhaya S, Datta S C. Momordicatin purified from fruits of *Momordica charantia* is effective to act as a potent antileishmania agent. *Parasitology International*. 2010;59(2):192-7.

Gurbuz I, Akyuz C, Yesilada E, Sener B. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71(1-2):77-82.

Harinantenaina L, Tanaka M, Takaoka S, Oda M, Mogami O, Uchida M *et al.* *Momordica charantia* constituents and antidiabetic screening of the isolated major compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2006;54(7):1017-21.

Hedberg I. Botanical Methods in Ethnopharmacology and the Need for Conservation of Medicinal-Plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1993;38(2-3):121-8.

Heinrich M, Bremner P. Ethnobotany and Ethnopharmacy - Their Role for Anti-Cancer Drug Development. *Current Drug Targets: Bentham Science Publishers Ltd.*; 2006. p. 239-45.

Heinrich M, Teoh H L. Galanthamine from snowdrop - the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;92(2-3):147-62.

Henriques A T, Kerber V A, Moreno P R H. Alcaloides: Generalidades e Aspectos Básicos. In: Simões Cmo, Schenkel Ep, Gosmann G, Melo Jcpd, Mentz La, Petrovick Pr, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC; 1999. p. 641-56.

Houghton P J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. *Phytotherapy Research*. 2000;14(6):419-23.

Houghton P J, Hylands P J, Mensah A Y, Hensel A, Deters A M. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):100-7.

Kaplan M A C, Gottlieb O R. The Rational Search for Active Principles in Plants. *Interciencia*. 1990;15(1):26-9.

Khan M R, Al. E. *Momordica charantia* and *Allium sativum*: broadspectrum antibacterial activity. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 1998;29:155-8.

Kimura Y, Akihisa T, Yuasa N, Ukiya M, Suzuki T, Toriyama M *et al.* Cucurbitane-type triterpenoids from the fruit of *Momordica charantia*. *Journal of Natural Products*. 2005;68(5):807-9.

Kinghorn A D. Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001;53(2):135-48.

Klink C A, Machado R B. A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade [serial on the Internet]. 2005; 1(1): Available from: http://www.conservacao.org/publicacoes/files/20_Klink_Machado.pdf.

Kohler I, Jenett-Siems K, Siems K, Hernandez M A, Ibarra R A, Berendsohn W G *et al.* In vitro antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*. 2002;57(3-4):277-81.

Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen A F, Ito H, Hatano T, Yoshida T *et al.* Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor-alpha release in macrophages in vitro. *Planta Medica*. 2001;67(9):825-32.

Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W C. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido*. 5 ed. São Paulo: Panamericana; 1999.

Kusamran W R, Ratanavila A, Tepsuwan A. Effects of neem flowers, Thai and Chinese bitter gourd fruits and sweet basil leaves on hepatic monooxygenases and glutathione S-transferase activities, and in vitro metabolic activation of chemical carcinogens in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 1998;36(6):475-84.

Law L K, Tam P P, Yeung H W. Effects of alpha-trichosanthin and alpha-momorcharin on the development of peri-implantation mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1983;69(2):597-604.

Leung S O, Yeung H W, Leung K N. The Immunosuppressive Activities of 2 Abortifacient Proteins Isolated from the Seeds of Bitter-Melon (*Momordica charantia*). *Immunopharmacology*. 1987;13(3):159-71.

Levine N D, Corliss J O, Cox F E G, Deroux G, Grain J, Honigberg B M *et al.* A Newly Revised Classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*. 1980;27(1):37-58.

Lewan L, Anderson M, Morales-Gomez P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *Alternatives To Laboratory Animals*. 1992;20:297-301.

Lopez-Velez R, Perez-Molina J A, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L *et al.* Clinico epidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfectd with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;58(4):436-43.

Lorenzi H, Matos F J A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum; 2002.

Machado R B, Ramos-Neto M B, Harris M B, Lourival R, Aguiar L M S. Análise de lacunas de proteção da biodiversidade no cerrado. Anais IV Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação; 17-21 Out 2004; Curitiba-PR: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza; 2004. p. 29-38.

Maes L, Vanden Berghe D, Germonprez N, Quirijnen L, Cos P, De Kimpe N *et al.* In vitro and in vivo activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. Antimicrobiology Agents Chemotherapy. 2004;48(1):130-6.

Marzochi M C, Marzochi K B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. Cadernos de Saúde Pública. 1994;10 Suppl 2:359-75.

Matsuda H, Li Y, Yamahara J, Yoshikawa M. Inhibition of gastric emptying by triterpene saponin, momordin Ic, in mice: roles of blood glucose, capsaicin-sensitive sensory nerves, and central nervous system. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1999;289(2):729-34.

Matthews R S. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. Free Radical Biology and Medicine. 1995;18(5):919-22.

Medeiros A R, Silva W A, Jr., Roselino A M. DNA sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil. Clinics (Sao Paulo). 2008;63(4):451-6.

Melo F N, Navarro V R, Da Silva M S, Da-Cunha E V L, Barbosa J M, Braz R. Bowdenol, a new 2,3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*. Natural Product Letters. 2001;15(4):261-6.

Memish Z A, Venkatesh S, Shibl A M. Impact of travel on international spread of antimicrobial resistance. International Journal of Antimicrobial Agents. 2003;21(2):135-42.

Mendonça R C, Felfili M J, Walter B M T, Silva-Júnior M C, Rezende A, Filgueiras T S *et al.* Flora Vascular do Cerrado. In: Sano Sm, Almeida Sp, editors. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 1998. p. 289-556.

Mendonça R C, Felfili M J, Walter B M T, Silva-Júnior M C, Rezende A, Filgueiras T S *et al.* Flora Vascular do Cerrado. In: Sano Sm, Almeida Sp, editors. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 2006. p. 289-556.

Mesia G K, Tona G L, Nanga T H, Cimanga R K, Apers S, Cos P *et al.* Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology. 2008;115(3):409-15.

Meyer B N, Ferrigni N R, Putnam J E, Jacobsen L B, Nichols D E, Mclaughlin J L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982;45(5):31-4.

Michalick M S M. Gênero *Leishmania*. In: Neves Dp, Melo Ald, Linardi Pm, Vitor Rwa, editors. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 41-46.

Ministério Do Meio Ambiente D R H E D A L-M. Primeiro Relatório Nacional para a Conservação sobre Diversidade Biológica: Brasil. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal - MMA; 1998.

Mishra B B, Kale R R, Singh R K, Tiwari V K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*. 2009;80(2):81-90.

Mulholland D A, Sewram V, Osborne R, Pegel K H, Connolly J D. Cucurbitane triterpenoids from the leaves of *Momordica foetida*. *Phytochemistry*. 1997;45(2):391-5.

Munoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Bergeron S, Rojas L *et al*. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;69(2):127-37.

Murakami T, Emoto A, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XXI. Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides, goyaglycosides-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, and -h, and new oleanane-type triterpene saponins, goyasaponins I, II, and III, from the fresh fruit of Japanese *Momordica charantia* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2001;49(1):54-63.

Myers N, Mittermeier R A, Mittermeier C G, Da Fonseca G A B, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000;403(6772):853-8.

Naseem M Z, Patil S R, Ravindra, Patil R S. Antispermatic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;61(1):9-16.

Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 2007;70(3):461-77.

Newman D J, Cragg G M, Snader K M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*. 2000;17(3):215-34.

Newman D J, Cragg G M, Snader K M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*. 2003;66(7):1022-37.

Ng T B, Chan W Y, Yeung H W. Proteins with Abortifacient, Ribosome Inactivating, Immunomodulatory, Antitumor and Anti-Aids Activities from Cucurbitaceae Plants. *General Pharmacology*. 1992;23(4):575-90.

Nunes G P, Silva M F D, Resende U M, Siqueira J M D. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003;13:83-92.

Ogata F, Miyata T, Fujii N, Yoshida N, Noda K, Makisumi S *et al.* Purification and Amino-Acid-Sequence of a Bitter Gourd Inhibitor against an Acidic Amino Acid-Specific Endopeptidase of *Streptomyces-Griseus*. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16715-21.

Okabe H, Miyahara Y, Yamauchi T. Studies on the Constituents of *Momordica charantia* L .3. Characterization of New Cucurbitacin Glycosides of the Immature Fruits .1. Structures of Momordicoside-G, Momordicoside-F1, Momordicoside-F2 and Momordicoside-I. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1982;30(11):3977-86.

Olivier M, Badaro R, Medrano F J, Moreno J. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Annual of Tropical Medicine and Parasitology*. 2003;97 Suppl 1:79-98.

Olliaro P L, Bryceson A D M. Practical Progress and New Drugs for Changing Patterns of Leishmaniasis. *Parasitology Today*. 1993;9(9):323-8.

Omeregbe R E, Ikuebe O M, Ihimire I G. Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* and *Shigella dysenteriae*. *African Journal of Medicine and Medical Science* 1996;25:373-5.

Ouellette M, Papadopoulou B. Mechanisms of Drug-Resistance in *Leishmania*. *Parasitology Today*. 1993;9(5):150-3.

Papadopoulou B, Kündig C, Singh A, Ouellette M. Drug resistance in *Leishmania*: similarities and differences to other organisms. *Drug Resistance Updates*. 1998;1(4):266-78.

Parra A L, Yhebra R S, Sardinias I G, Buela L I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001;8(5):395-400.

Patrick G L. An introduction to medicinal chemistry. New York: Oxford; 2001.

Patwardhan B. Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):50-2.

Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera M L, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80(1):54-73.

Pires M O. Cerrado: Sociedade e Biodiversidade. In: Ioris E, editor. *Plantas Medicinais do Cerrado: Perspectivas Comunitárias para a Saúde, o Meio Ambiente e o Meio Sustentável*. Anais do Workshop Plantas Medicinais do Cerrado. Mineiros-GO: Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior - FIMES; 1999. p. 155-73.

Pitipanapong J, Chitprasert S, Goto M, Jiratchariyakul W, Sasaki M, Shotipruk A. New approach for extraction of charantin from *Momordica charantia* with pressurized liquid extraction. *Separation and Purification Technology*. 2007;52(3):416-22.

Platel K, Shurpalekar K S, Srinivasan K. Influence of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) on Growth and Blood-Constituents in Albino-Rats. *Nahrung-Food*. 1993;37(2):156-60.

Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2008;22(3):277-86.

Raju T N K. The Nobel chronicles. *The Lancet*. 2000;356(9223):81-.

Raman A, Lau C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L (Cucurbitaceae). *Phytomedicine*. 1996;2(4):349-62.

Rates S M. Plants as source of drugs. *Toxicon: official journal of the international society on toxicology*. 2001;39(5):603-13.

Rath S, Trivelin L A, Imbrunite T R, Tomazela D M, Jesão S M N D, Marzal P C *et al*. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*. 2003;26:550-5.

Ratter J A, Bridgewater S, Ribeiro J F. ANALYSIS OF THE FLORISTIC COMPOSITION OF THE BRAZILIAN CERRADO VEGETATION III: COMPARISON OF THE WOODY VEGETATION OF 376 AREAS. *Edinburgh Journal of Botany*. 2003;60(01):57-109.

Rey L. *Parasitologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. cap. 15.

Ribeiro J F, Silva J A D, Fonseca C E I. Espécies frutíferas da Região do Cerrado. In: Donadio Lc, Martins Abg, Valente Jp, editors. *Fruticultura tropical*. FUNEO/FCAV/Jaboticabal: UNESP; 1992. p. 159-89.

Ribeiro J F, Walter B M T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Sano Sm, Almeida Sp, editors. *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC; 1998. p. 87-166.

Ribeiro R F. A medicina do sertão: uma "garrafada" de ervas e tradições. In: Ioris E, editor. *Plantas medicinais do cerrado: perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o meio sustentável*. Anais dos workshop plantas medicinais do cerrado. Mineiros-GO: Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior - Projeto Centro Comunitário de Plantas Medicinais; 1999. p. 174-207.

Ritter L M O, Ribeiro M C, Moro R S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil - limite austral do bioma [on line]. 2010; [Acesso em 31/11/2011]. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n3/pt/fullpaper?bn04010032010+pt>.

Rizzini C T, Mors W B. *Botânica econômica brasileira*. São Paulo: USP; 1976.

Rocha L G, Almeida J R G S, Macedo R O, Barbosa-Filho J M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 2005;12(6-7):514-35.

Rodrigues M O, Alves P B, Nogueira P C L, Machado S M F, Moraes V R S, Ribeiro A D *et al*. Volatile Constituents and Antibacterial Activity From Seeds of *Bowdichia virgilioides* Kunt. *Journal of Essential Oil Research*. 2009;21(3):286-8.

Rodrigues V E G. Levantamento Florístico e Etnobotânico de Plantas Medicinais dos Cerrados na Região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. Lavras: UFLA; 1998.

Rodrigues V E G, Carvalho D A D. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Ciência & Agrotecnologia*. 2001;25(1):102-23.

Ruiz A R, De La Torre R A, Alonso N, Villaescusa A, Betancourt J, Vizoso A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996;52(3):123-7.

Sacks D L, Perkins P V. Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes. *Science*. 1984;223(4643):1417-9.

Sanchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998;76(2):270-6.

São Paulo (Estado) S D E D S, Superintendência De Controle De Endemias - SUCEN E Controladoria De Controle De Doenças - CCD - São Paulo (Estado). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo [on line]. São Paulo: A Secretaria; 2006; [Acesso em 26 Jan 2011]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/lva06_manual.pdf.

Seifert K, Matu S, Perez-Victoria F J, Castanys S, Gamarro F, Croft S L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003;22(4):380-7.

Sereno D, Lemesre J L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(5):972-6.

Shu Y Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*. 1998;61(8):1053-71.

Silva J C S, Almeida S P. Botanical resources from neotropical savannas. In: Sarmiento G, editor. *Las sabanas americans: aspectos de su biogeografía, ecología y utilización*. Mérida, Venezuela: ULA; 1990. p. 126-40.

Silverstein R M, Wester F X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.; 2000.

Singh S, Kumar J, Singh R, Dwivedi S N. Hepatitis B and C viral infections in Indian kala-azar patients receiving injectable anti-leishmanial drugs: a community-based study. *International Journal of Infectious Diseases*. 2000;4(4):203-8.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2004;10(6):307-15.

Siqueira J C D. Utilização popular das plantas do Cerrado. São Paulo: Loyola; 1981.

Smith M A, Perry G, Richey P L, Sayre L M, Anderson V E, Beal M F *et al*. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*. 1996;382(6587):120-1.

Smith M A, Rottkamp C A, Nunomura A, Raina A K, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2000;1502(1):139-44.

Souza C D D, Felfili J M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 2006;20:135-42.

Spreafico F, Malfiore C, Moras M L, Marmonti L, Filippeschi S, Barbieri L *et al*. The Immunomodulatory Activity of the Plant-Proteins *Momordica charantia* Inhibitor and Pokeweed Antiviral Protein. *International Journal of Immunopharmacology*. 1983;5(4):335-43.

Stuart K. Kinetoplast DNA, Mitochondrial-DNA with a Difference. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1983;9(2):93-104.

Sun Y, Huang P L, Li J J, Huang Y Q, Zhang L, Lee-Huang S. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma-associated virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;287(4):983-94.

Takemoto D J, Dunford C, McMurray M M. The Cyto-Toxic and Cytostatic Effects of the Bitter Melon (*Momordica charantia*) on Human-Lymphocytes. *Toxicol: official journal of the international society on toxicology*. 1982;20(3):593-9.

Takemoto D J, Dunford C, Vaughn D, Kramer K J, Smith A, Powell R G. Guanylate-Cyclase Activity in Human-Leukemic and Normal Lymphocytes - Enzyme-Inhibition and Cyto-Toxicity of Plant-Extracts. *Enzyme*. 1982;27(3):179-88.

Tam P P, Chan W Y, Yeung H W. Viability of alpha-momorcharin-treated mouse blastocysts in the pseudopregnant uterus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1984;71(2):567-72.

Tan M J, Ye J M, Turner N, Hohnen-Behrens C, Ke C Q, Tang C P *et al*. Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway (vol 15, pg 263, 2008). *Chemistry & Biology*. 2008;15(5):520-.

Teixeira M C A, Santos R D, Sampaio R B, Pontes-De-Carvalho L, Dos-Santos W L C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitology Research*. 2002;88(11):963-8.

Thakur C P, Kumar M, Pandey A K. Comparison of Regimes of Treatment of Antimony-Resistant Kala-Azar Patients - a Randomized Study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991;45(4):435-41.

Torrenegra R, Bauereiss P, Achenbach H. Constituents of Tropical Medicinal-Plants .36. Homoomosanine-Type Alkaloids from *Bowdichia-Virgilioides*. *Phytochemistry*. 1989;28(8):2219-21.

Torres-Santos E C, Lopes D, Oliveira R R, Carauta J P P, Falcao C A B, Kaplan A A C *et al.* Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*. 2004;11(2-3):114-20.

Tremblay M, Olivier M, Bernier R. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitology Today*. 1996;12(7):257-61.

Us-Gao U S G A O-. New Drug Development: Science, business, regulatory, and intellectual property issues cited as hampering drug development efforts [on line]. 2006; [Acesso em 10 Jan 2011]. Disponível em: <http://gao.gov/new.items/d0749.pdf>.

Valente L M M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. *Química Nova*. 2004;27:944-8.

Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160(1):1-40.

Vanden-Berghe D A, Vlietinck A J. Screening for antibacterial and antiviral agensts. In: Hostettman K, editor. *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press; 1991. p. 47-53.

Veloza L S M, Da Silva B P, Da Silva E M B, Parente J P. Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*. *Fitoterapia*. 1999;70(5):532-5.

Verkman A S. Drug discovery in academia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;286(3):C465-C74.

Vermeersch M, Da Luz R I, Tote K, Timmermans J P, Cos P, Maes L. In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(9):3855-9.

Vieira R F. Coleta e conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. I Congresso Brasileiro de Medicina e Terapias Naturais; Brasília-DF: São Paulo: Instituto Médico Seraphis; 1994. p. 44-9.

Vila Verde G M, Paula J R, Caneiro D M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003;13:64-6.

Virdi J, Sivakami S, Shahani S, Suthar A C, Banavalikar M M, Biyani M K. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;88(1):107-11.

Waller D P. Methods in Ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 1993;38(2-3):189-95.

Who W H O-. Control of the leishmaniase. In: Report of a Who Expert Committee Trs, 793, editor. Geneva: WHO; 1990.

Who W H O. Control of leishmaniasis [on line]. World Health Organization - WHO; 2007; [Acesso em 10/12/2010]. Disponível em: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA60/A60_10-en.pdf.

Who W H O. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases [on line]. World Health Organization - WHO; 2010; [Acesso em 31/10/2011]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/WHO_NTD_report_update_2011.pdf.

Who/Oms W H O-. Removing obstacles to healthy development: report on infectious diseases [on line]. WHO; 1999; [Acesso em 23 Dez 2009]. Disponível em: <http://www.who.int/infectious-disease-report/pages/ch1text.html>.

Williamson E M, Okpako D T, Evans F J. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. New York: J. Wiley in Chichester; 1996.

Xie H, Huang S, Deng H, Wu Z, Ji A. [Study on chemical components of *Momordica charantia*]. *Zhong Yao Cai*. 1998;21(9):458-9.

Yasuda M, Iwamoto M, Okabe H, Yamauchi T. Structures of Momordicine-I, Momordicine-II and Momordicine-III the Bitter Principles in the Leaves and Vines of *Momordica charantia* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1984;32(5):2044-7.

Zhang M, Hettiarachchy N S, Horax R, Chen P, Over K F. Effect of Maturity Stages and Drying Methods on the Retention of Selected Nutrients and Phytochemicals in Bitter Melon (*Momordica charantia*) Leaf. *Journal of Food Science*. 2009;74(6):C441-C8.

Zheng Y T, Ben K L, Jin S W. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*. 1999;20(3):239-43.