

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO**  
**TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

**DANIELA DE ARAUJO VILAR**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA BIXINA E FRAÇÃO OLEOSA EXTRAÍDOS DA *BIXA***  
***ORELLANA* BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2015**

DANIELA DE ARAUJO VILAR

ESTUDO FITOQUÍMICO DA BIXINA E FRAÇÃO OLEOSA EXTRAÍDOS DA *BIXA*  
*ORELLANA* BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Desenvolvimento e Inovação  
Tecnológica em Medicamentos, como  
requisito para obtenção do título de Doutor

Orientadores: Prof.Dr.José Maria Barbosa Filho

Prof. Dr. Túlio Flávio Acioly de Lima e Moura

Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup>Márcia Rosa de Oliveira

JOÃO PESSOA - PB

2015

V697e Vilar, Daniela de Araujo.  
Estudo fitoquímico da bixina e fração oleosa extraídos da *bixa orellana* biomonitorado pela atividade leishmanicida / Daniela de Araujo Vilar.-- João Pessoa, 2015.  
71f. : il.  
Orientadores: José Maria Barbosa Filho, Túlio Flávio Acioly de Lima e Moura, Márcia Rosa de Oliveira  
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS  
1. Produtos naturais. 2. Leishmaniose – tratamento.  
3. Plantas medicinais. 4. Toxicidade. 5. Urucum.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

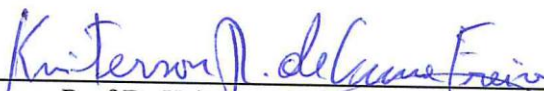
DANIELA DE ARAUJO VILAR

ESTUDO FITOQUÍMICO DA BIXINA E FRAÇÃO OLEOSA EXTRAÍDOS DA *BIXA ORELLANA* BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

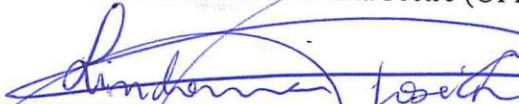
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Túlio Flávio A. Lima e Moura (UFRN)



Prof. Dr. Kristerson R. Luna Freire (UEPB)



Prof. Dr. Lindomar José Pena (UEPB)



Prof. Dr. Raquel de Melo Barbosa (UFRN)



Dr. Camilo Flamarion de Oliveira Franco (EMBRAPA)

Aprovada em, 21 de Maio de 2015

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Francisco de Assis e Marinês**, pelo exemplo constante, apoio e dedicação presentes em toda a minha formação tanto profissional como humana.*

*Dedico também aos meus irmãos **Marina e Thiago César**, pelo incentivo e companheirismo em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

O agradecimento que quero prestar está repleto de uma carga de profundagratidão. Num trabalho como este, a que nos dedicamos durante mais de 4 anos de nossa vida, o resultado que apresentamos não é só nosso. É de todas as pessoas que, de formas diferentes, contribuíram para chegarmos a este ponto.

Por isso, meu reconhecido e emocionado muito obrigada!

Obrigada à **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho** e **Prof. Dr. Túlio Moura Alcioly**, pela excelência na orientação, apoio e confiança.

Obrigada à **Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Rosa de Oliviera**, **Prof<sup>a</sup> Dra. Marianna Vieira Sobral**, **Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia Ortiz** pelo auxílio na realização dos experimentos farmacológicos, toxicológicos e caracterização e quantificação das amostras, respectivamente.

À professora **Dr.<sup>a</sup> Maria Norma Melo** da Universidade Federal de Minas Gérias, por nos ceder à cepa de *Leishmania (Leishmania) major* (MHOM/IL/1980/FN) utilizada nos experimentos.

Obrigada aos amigos de Laboratório **Juliana Rocha**, **Patrícia Nery**, **Monalisa Brito**, **Maciel Araújo**, pelo auxílio na realização de tantas coletas e exames.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro;

A todos vocês também, DEDICO este trabalho.

*"Aprendi que a vida bate sempre sem pudor  
Que nem sempre as coisas são como a gente pensa  
Que nem sempre o mundo gira como a gente quer  
Aprendi que se eu cair devo me levantar  
Que todo mundo vive altos e baixos  
Que não vale a pena esperar  
Viva intensamente  
Desconfie do futuro, siga em frente  
Basta acreditar, vale a pena sonhar  
Nunca desista, vá em frente até acertar  
E nunca deixe que o medo impeça de tentar  
Leve na raça, faça o que o coração mandar  
Não deixe nada para depois, não dá para esperar"  
(Vivo Intensamente - Matheus e Kauan)*

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença transmitida por protozoários do gênero *Leishmania*. Numerosas espécies são responsáveis pela infecção em humanos, resultando em três fenótipos clínicos. A OMS as classificam como doenças negligenciadas, e incentiva a busca de novos fármacos ou formulações que sejam eficazes e que tenham baixa toxicidade ao homem. Todos os fármacos atualmente em uso para o tratamento da leishmaniose apresentam restrições, como toxicidade, graves efeitos colaterais, custo elevado, administração parenteral ou teratogenicidade. Desta forma, o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seletivos é de suma importância, e a identificação de vias metabólicas exclusivas do parasita que possam ser usadas como alvo pode ser um ponto de partida interessante. As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente. A *Bixa orellana* L. popularmente conhecido como “urucum” apresenta diversas atividades farmacológicas comprovadas. O objetivo do presente estudo foi verificar o potencial antileishmania e a toxicidade dos fitoconstituintes da fração oleosa da semente de *B. orellana* L. e da bixina, visando comprovar sua atividade biológica, seguranças e eficácia terapêutica. A bixina foi caracterizada através de espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e a fração oleosa por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. Pode-se inferir que a bixina e a fração oleosa apresentam-se como tóxicos para *Artemia salina* por apresentar valor de  $\text{DL}_{50}$ , respectivamente, de  $353,64 \pm 67,54$  e  $285,41 \pm 35,81 \mu\text{g/mL}$ , baixa toxicidade frente eritrócitos de camundongos suíços e baixa toxicidade após administração aguda na dose de  $2000 \text{ mg/mL}$ . A bixina e a fração oleosa inibiram o crescimento das formas promastigotas, gerando uma  $\text{IC}_{50}$  de  $2,16 \mu\text{g/mL}$  e  $1,26 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, para *Leishmania major*. O teste de exclusão do azul de Trypan demonstrou uma significativa citotoxicidade das substâncias em estudo sobre macrófagos murinos. A  $\text{CC}_{50}$  calculada para os macrófagos murinos foi de  $59,51 \mu\text{g/mL}$  e  $111,41 \mu\text{g/mL}$ , para a bixina e fração oleosa, respectivamente, portanto, são mais tóxicas para os parasitos que para os macrófagos avaliados. A bixina e a fração oleosa não apresentaram um efeito antileishmania *in vivo* em camundongos suíços infectados com *L. major*. Pode-se concluir que a bixina e a fração oleosa apresentaram atividade antileishmania (leishmaniostática e leishmanicida) sobre formas promastigotas de *L. major*.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmania. Toxicidade. Urucum.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease transmitted by protozoans of the *Leishmania* gender. A huge number of species are responsible for the infection in human beings, resulting in three clinical phenotypes. The World Health Organization – WHO classify them as neglected diseases, and encourages the search of new medical drugs or formulations that are effective and that have low toxicity to humans. All the medical drugs actually used for the treatment of the leishmaniasis present some kind of restriction such as high toxicity, severe side effects, elevated cost, parenteral administration or teratogenicity. That being said, the development of more effective and selective drugs is very important, and the identification of exclusive metabolic pathways of the parasites that can be targeted might be an interesting starting point. Medicinal plants have been a rich source to the obtaining of molecules to be therapeutically explored. The *Bixa Orellana* L., popularly know as “annatto”, presents different pharmacological activities that are already proven. The objective of this work was to verify the anti-leishmaniasis potential and the toxicity of the phytochemicals of the oily fraction of *Bixa Orellana* and bixin extracted of its seeds, aiming to verify and prove its biological activity, security and therapeutic effectiveness in order to develop a phytotherapeutic drug. The bixin was characterized through a nuclear magnetic resonance spectrum of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , and the oily fraction by a gas chromatography within a mass spectrometer. It can be inferred that the bixin and the oily fraction are presented as toxic because they have shown values of  $\text{LD}_{50}$  of  $353,64 \pm 67,54$  and  $285,41 \pm 35,81 \mu\text{g/mL}$ , respectively, and present low toxicity against swiss mouse erythrocytes and low toxicity after acute administration of the 2000 mg/mL doses. The bixin and the oily fraction inhibited the growth of promastigote forms, generating an  $\text{IC}_{50}$  of 2,16  $\mu\text{g/mL}$  and 1,26  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, for the *Leishmania major*. The Trypan blue exclusion test has shown a significant cytotoxicity of the studied substances over murine macrophages. The calculated  $\text{CC}_{50}$  for the murine macrophages was 59,51  $\mu\text{g/mL}$  and 111,41  $\mu\text{g/mL}$ , for the bixin and oily fraction, respectively, so, they are more toxic for the parasites than for the relieved macrophages. The bixin and the oily fraction did not present an *in vivo* anti-*Leishmaniasis* effect in swiss mice infected with the *L. major*. It can be concluded that both bixin and oily fraction presented anti-*Leishmaniasis* activity (leishmaniostatic and leishmanicide) against promastigote forms of *L. major*.

KEY WORDS: Leishmaniasis. Toxicity. Anatto.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Insetos vetores das leishmanioses. A: <i>Lutzomia longipalpus</i> ; B: <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	16
<b>Figura 2</b> - (A) Forma aflagelada ou amastigota; (B) Forma flagelada ou promastigota.....	17
<b>Figura 3</b> - Formas clínicas das leishmanioses. A: cutânea localizada; B: cutânea difusa; C: mucocutânea; D: cutânea disseminada .....	18
<b>Figura 4</b> - Forma clínica da <i>Leishmaniose Visceral</i> .....	18
<b>Figura 5</b> - Ciclo biológico do parasita do gênero <i>Leishmania</i> .....	19
<b>Figura 6</b> - Mapa de distribuição das leishmanioses no Mundo: 6A - casos de leishmaniose visceral; 6B- casos de leishmaniose cutânea.....	22
<b>Figura 7</b> - 7A- arbusto; 7B – flores e 7C – fruto aberto contendo as sementes de <i>Bixa orellana</i> .....	27
<b>Figura 8</b> - Estrutura química: 8A - bixina; 8B – isobixina; 8C – norbixina. ....	28
<b>Figura 9</b> - Esquema do experimento da atividade antileishmania sobre formas promastigotas de <i>Leishmania major</i> .....	34
<b>Figura 10</b> - Ensaio de exclusão do azul de Trypan .....	36
<b>Figura 11</b> - Estrutura química do cristal de bixina .....	41
<b>Figura 12</b> - Cromatograma de íons totais da amostra do óleo das sementes de urucum esterificada realizada em CG-MS .....	41
<b>Figura 13</b> - Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos suíços após tratamento com bixina ( $\mu\text{g/mL}$ ) .....	43
<b>Figura 14</b> - Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania major</i> na presença de diferentes concentrações do concentrado de bixina, fração oleosa, Anfotericina B e Glucantime® .....	50
<b>Figura 15</b> -Citotoxicidade da bixina (A) e da fração oleosa (B) para macrófagos peritoneais de camundongos suíços .....	52
<b>Figura 16</b> -Efeito do tratamento com a bixina e fração oleosa no tamanho de lesão de camundongos suíços infectados com <i>L. major</i> .....	54
<b>Figuras 17</b> - Carga parasitária do linfonodo poplíteo (A) e do baço (B) dos camundongos suíços infectados <i>L. major</i> .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do cristal de bixina .....	40
Tabela 2 - Composição dos ácidos graxos das sementes de urucum ( <i>Bixa orellana</i> L.) .....	42
Tabela 3 - Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com bixina com dose máxima, via oral .....	44
Tabela 4 - Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com fração oleosa com dose máxima, via oral .....	45
Tabela 5 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa sobre o consumo de água e ração e evolução ponderal dos camundongos fêmeas .....	46
Tabela 6 - Efeitos do tratamento agudo (v.o.) com bixina e fração oleosa nos índices dos órgãos de camundongos fêmeas .....	46
Tabela 7 - Efeitos do tratamento agudo com bixina ou fração oleosa nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos fêmeas .....	47
Tabela 8 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas .....	48
Tabela 9 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas. (continuação) .....	48
Tabela 10 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas (continuação) .....	49
Tabela 11 - Concentração inibitória de 50% do crescimento ( $\text{IC}_{50}$ ) de promastigotas de <i>Leishmania major</i> na presença da bixina, fração oleosa, Anfotericina B e Glucantime <sup>®</sup> .....	50
Tabela 12 - Índice terapêutico <i>in vitro</i> da bixina e da fração oleosa para <i>L. major</i> . .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Artemia
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>B</i>	Bixa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-DIC	Cromatógrafo Gasoso com Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatógrafo a Gás Acoplado a Espectrômetro de Massas
DMC	29,69-Diidroxi-49-Methoxychalcone
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	Food and Drugs Administration
GHS	Globally Harmonized Classification System
GTP	Guanosina Trifosfato
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
IM	Intramuscular
L	Leishmania
LV	Leishmaniose Visceral
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Muco-Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutâneo-Difusa
LDL	Lipoproteínas De Baixa Densidade
LTA	Forma mucosa localizada
MØs	Macrófagos
OECD	Guidelines for testing of chemicals
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)
PF	Ponto de Fusão
PLA	Poli (D, L ácido láctico)
SBV	Antimoniais Pentavalentes
SE	Semente

SFB	Soro fetal bovino
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Tripanossoma
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
V.O.	Via Oral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1	LEISHMANIOSES, PARASITOS E SUA CARACTERIZAÇÃO.....	16
3.2	CICLO BIOLÓGICO .....	18
3.3	EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES.....	21
3.4	TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES .....	23
3.5	PRODUTOS NATURAIS E A <i>BIXA orellana</i> L.....	25
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	MATÉRIA PRIMA .....	29
<b>4.1.1</b>	<b>Obtenção da matéria prima</b> .....	29
<b>4.1.2</b>	<b>Método de extração</b> .....	29
<b>4.1.3</b>	<b>Caracterização das substâncias avaliadas</b> .....	29
<b>4.1.3.1</b>	<b>Caracterização do concentrado de bixina</b> .....	29
<b>4.1.3.2</b>	<b>Caracterização da fração oleosa</b> .....	29
4.2	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA .....	30
<b>4.2.1</b>	<b>Ensaio da toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i></b> .....	30
<b>4.2.2</b>	<b>Avaliação da toxicidade animal</b> .....	31
<b>4.2.2.1</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos</b> .....	31
<b>4.2.2.2</b>	<b>Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i></b> .....	32
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM ENSAIOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> .....	33
<b>4.3.1</b>	<b>Parasitas e sua manutenção <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b> .....	33
<b>4.3.2</b>	<b>Animais</b> .....	33
<b>4.3.3</b>	<b>Avaliação da atividade antileishmania da bixina e da fração oleosa</b> .....	34
<b>4.3.4</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade e determinação do índice terapêutico <i>in vitro</i></b> .....	35
<b>4.3.5</b>	<b>Avaliação da atividade <i>in vivo</i> da bixina e da fração oleosa em camundongos Suíços infectados com <i>L. major</i></b> .....	36
<b>4.3.5.1</b>	<b>Tratamento dos animais</b> .....	37
<b>4.3.5.2</b>	<b>Quantificação da carga parasitária</b> .....	37

4.3.5.3	<i>Análise estatística</i>	38
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	39
5.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE <i>BIXA ORELLANA</i>	39
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA BIXINA E DA FRAÇÃO OLEOSA	39
5.3	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	42
5.3.1	Ensaio da toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	42
5.3.2	Avaliação da citotoxicidade de frente eritrócitos de camundongos	43
5.3.3	Ensaio de toxicidade pré-clínica aguda em animais	44
5.3.3.1	<i>Avaliação comportamental e estimativa da DL50</i>	44
5.3.3.2	<i>Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração</i>	46
5.3.3.3	<i>Avaliação dos índices dos órgãos</i>	46
5.3.3.4	<i>Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos</i>	47
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i>	49
5.4.1	Avaliação da atividade antipromastigota de bixina e fração oleosa <i>in vitro</i>	49
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VIVO</i>	53
5.5.1	Avaliação da carga parasitária	54
6	<b>PESPECTIVAS</b>	56
7	<b>CONCLUSÕES</b>	57
	<b>REFERÊNCIAS</b>	58

## INTRODUÇÃO

Dentre as seis doenças tropicais de maior relevância no mundo, a leishmaniose caracteriza-se como sendo uma doença de caráter silvestre que se estende para o ambiente rural, exibindo uma crescente expansão para as áreas urbanas o que a torna um grave problema de saúde pública que afeta principalmente os países pouco desenvolvidos.

Esta enfermidade é causada por um protozoário heteroxeno do gênero *Leishmania*, com distribuição em várias partes do mundo, acarretando um elevado índice de morbidade e mortalidade, a transmissão se dá pela picada de fêmeas de flebotomíneos da família *Psychodidae* e da subfamília *Phlebotaminae* (SANTOS et al.,2008).

A leishmaniose é considerada endêmica em 88 países com estimativa que 12 milhões de pessoas estejam infectadas nos quatro continentes. A OMS afirma que a leishmaniose cutânea é mais prevalente em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão; a leishmaniose mucocutânea se expressa mais nos seguintes países: Brasil, Bolívia e Peru e a leishmaniose cutânea difusa ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. No Brasil, a leishmaniose visceral encontra-se disseminada em 17 estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2007).

A primeira linha de tratamento é predominantemente à base de antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), para as áreas endêmicas é um tratamento clássico, a segunda linha de tratamento inclui a anfotericina B e pentamidinas (isotionato e mesilato), contudo esses quimioterápicos apresentam várias limitações como alto custo, usados por via parenteral, requer longos períodos de administração e causam efeitos adversos, como: alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas (OLLIARO; BRYCESON, 1997; CROFT; YARDLEY, 2002).

Diante dos entraves com as terapias atuais o uso das plantas medicinais, as quais apresentam diversos metabólitos secundários com várias atividades farmacológicas, vem se tornando uma nova vertente para as pesquisas que visam alternativas no tratamento das leishmanioses buscando eliminar o parasita no hospedeiro vertebrado.

## 2OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o potencial antileishmania e a toxicidade dos fitoconstituintes da fração oleosa da semente de *Bixa orellana* L. e da bixina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar as condições de obtenção da fração oleosa e da bixina extraídos da semente de *B. orellana* L. como forma de assegurar a qualidade do insumo ativo a ser utilizado na produção do medicamento;
- b) Identificar e quantificar os fitoconstituintes presentes na fração oleosa da semente de *B. orellana* L. e na bixina;
- c) Quantificar e avaliar a toxicidade da fração oleosa e bixina sobre modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*;
- d) Calcular a  $DL_{50}$  (dose letal responsável pela morte de 50% dos animais em experimentação), por via oral;
- e) Investigar a atividade antileishmania da fração oleosa da semente de *B. orellana* L. e da bixina em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

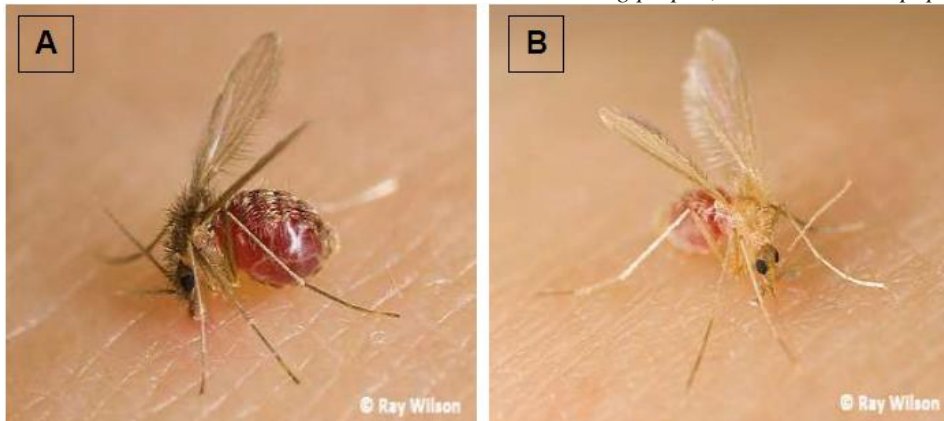
#### 3.1 LEISHMANIOSES, PARASITOS E SUA CARACTERIZAÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas são um grupo diverso de doenças que se desenvolvem principalmente entre as populações mais pobres do mundo, onde múltiplas infecções entre indivíduos isolados são comuns. Elas são endêmicas em 149 países e afetam centenas de milhões de pessoas no mundo. Neste grupo esta inclusa a Leishmaniose que é classificada como uma das doenças mais negligenciadas (WHO, 2013).

A depender da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro as Leishmanioses manifestam-se como um conjunto de enfermidades diferentes entre si, podendo comprometer pele, mucosas e vísceras. A doença é causada por parasitos do gênero *Leishmania* com ciclo de vida heteroxênico, abrangendo hospedeiros vertebrados (mamíferos) e insetos vetores (flebotomíneos) (BRASIL, 2009).

Os insetos vetores são dípteros pertencentes ao Filo Protozoa da Ordem Kinetoplastidae à família *Trypanosomatidae*, da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes filogeneticamente aos gêneros *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (Figura 1), divididas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e transmitidas pela picada de fêmeas infectadas (FRAGA et al., 2010).

**Figura 1** - Insetos vetores das leishmanioses. A: *Lutzomyia longipalpus*; B: *Phlebotomus muspapatasi*.

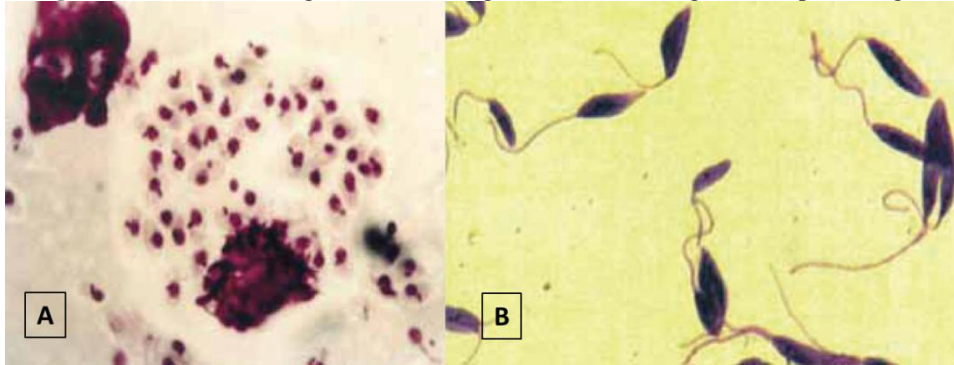


Fonte: ROCHA, 2014.

A *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, caracterizados por duas formas morfológicas que se alternam em promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas nos flebotomíneos possuem flagelo e vivem na luz do seu trato digestivo, já as formas amastigotas são aflageladas e parasitam as

células do sistema imune monocítico fagocitário em hospedeiros vertebrados (Figura 2)(BURCHMORE; BARRETT, 2001).

**Figura 2-** (A) Forma aflagelada ou amastigota; (B) Forma flagelada ou promastigota



Fonte: BRASIL, 2009.

Quanto à forma clínica, as leishmanioses podem se apresentar sob duas formas tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar é uma afecção dermatológica devido à infecção estar confinada na pele, e pode ser subdividida em quatro subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD)(GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose cutânea localizada (Figura 3A), no Brasil é causada principalmente pela espécie *L. brasiliensis*, e representa o acometimento primário da pele onde a lesão é comumente do tipo úlcera podendo evoluir para a cura espontânea e tem boa resposta ao tratamento (BRASIL, 2010; REITHINGE et al., 2007).

A leishmaniose cutânea difusa (Figura 3B) é caracterizada por lesões nodulares e não ulcerativas carregadas de parasitos que se disseminam a partir do local inicial da infecção, estabelece uma forma clínica rara, porém grave que pode se disseminar por todo o corpo. No Brasil, a doença é causada pela *L. amazonenses* (BRASIL, 2010; GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose mucocutânea (Figura 3C) é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões secundárias no complexo naso-faríngeo, com evidente obstrução nasal, perfuração de septo e destruição da cartilagem nasal. A principal espécie associada a este quadro clínico é a *L. braziliensis*, contudo as espécies *L. amazonensis* e *L. panamensis* também podem estar envolvidas (BRASIL, 2010; AMATO et al., 2007).

A leishmaniose disseminada (FIGURA 3D) é o subtipo mais raro caracterizada por múltiplas lesões papulares com acometimento mucoso concomitante, podendo acometer

várias partes do corpo com mais frequência a face e o tronco. A principal espécie associada a este quadro clínico são as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonenses* (BRASIL, 2010).

**Figura 3** – Formas clínicas das leishmanioses. **A:** cutânea localizada; **B:** cutânea difusa; **C:** mucocutânea; **D:** cutânea disseminada.



Fonte: BRASIL, 2006; BRASIL, 2010.

A Leishmaniose Visceral (FIGURA 4) ou Calazar (Kala-azar= febre negra em hindu) ocorre quando os parasitas invadem as células do sistema mononuclear fagocitário do homem e animais, sendo assim considerada uma infecção crônica grave.

**Figura 4** – Forma clínica da *Leishmaniose Visceral*.



FONTE: BRASIL, 2014.

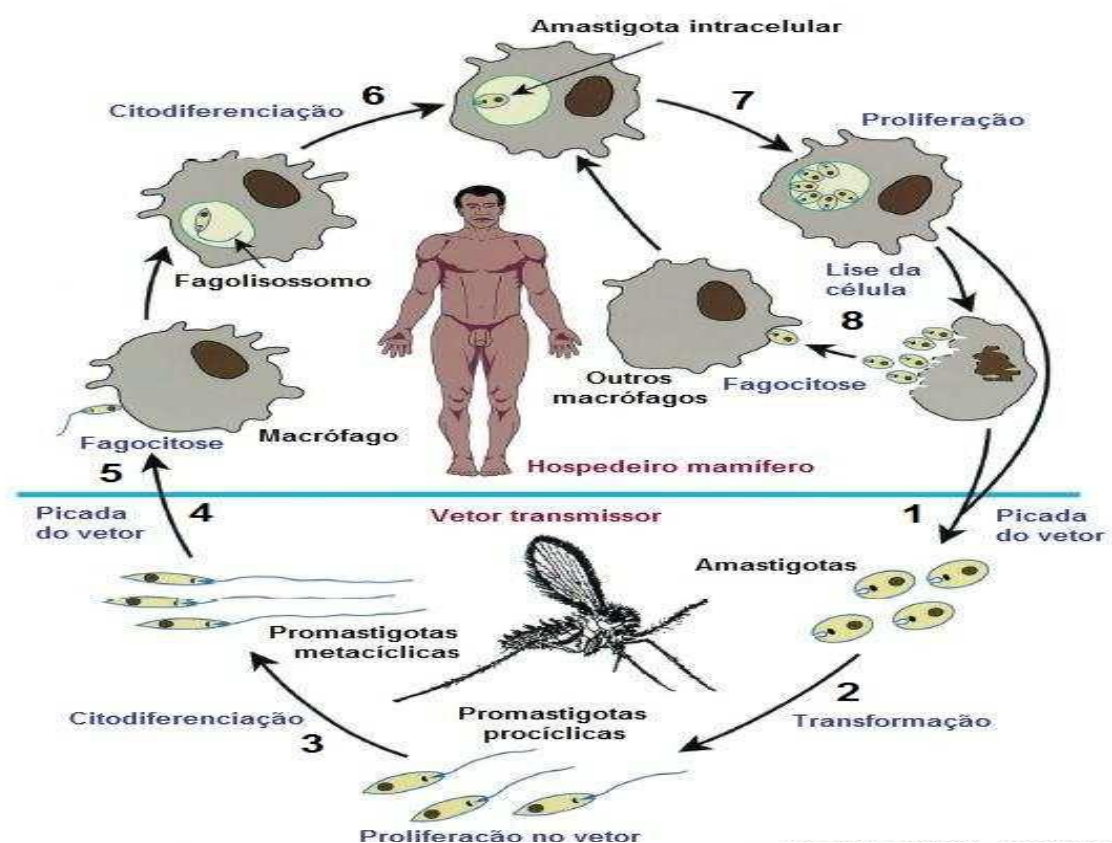
Nas regiões da Índia, Paquistão, África e China o agente etiológico é a *Leishmania donovani* e na região do Mediterrâneo é a *Leishmania infantum*. No Novo Mundo, principalmente no Brasil, a leishmaniose visceral é causada por *Leishmania chagasi* (sinon. *L. infantum*) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013).

### 3.2 CICLO BIOLÓGICO

O protozoário causador das leishmanioses apresenta um ciclo de vida heteroxênico, alternando sua forma evolutiva entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado.

O ciclo se inicia no hospedeiro invertebrado (FIGURA 5) quando durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, o inseto flebotomíneo ingere células sanguíneas e outras células, especialmente monócitos e macrófagos contendo formas amastigotas, estes são conduzidos a região anterior do trato digestório, neste novo ambiente as amastigotas se aproximam formando aglomerados chamados de ninhos ou ilhas de amastigotas que ficam protegidos no interior da matriz peritrófica, local este que se dá início ao processo de transformação das amastigotas em promastigotas procíclicas, tanto os parasitas e o sangue ingeridos ficam retidos no interior da matriz peritrófica, esta começa a se romper na região anterior do abdômen e as formas promastigotas migram para o epitélio do trato digestório (BATES; ROGERS, 2004).

**Figura 5** – Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*.



Fonte: adaptado de Handman, 2001

(1) Macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas do vetor, durante seu repasto sanguíneo; (2) no intestino do vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas não-infectivas e, posteriormente, (3) em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor e (4) são transmitidas após sua picada na derme do hospedeiro; (5) ocorre, então, a fagocitose das formas promastigotas metacíclicas por macrófagos do hospedeiro mamífero; (6) no interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas e (7) iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. (8) Os macrófagos infectados são lisados, liberando formas amastigotas que podem infectar novas células.

As promastigotas quando alcançam o epitélio começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária e aderem ao epitélio pela região do flagelo, alguns parasitas são eliminados junto com o conteúdo estomacal. Após a divisão os parasitas migram para a região anterior do intestino até a válvula estomodeal onde se concentram e sofrem diferenciação denominada metaciclogênese. Nesse período as promastigotas apresentam redução de tamanho do corpo celular e aumento do flagelo tornando-se extremamente móveis e altamente infectivos passando a serem denominados de promastigotas metacíclicos (KAMHAWI, 2006).

As promastigotas metacíclicos se acumulam próximo a válvula estomodeal danificando-a o que ocasiona a migração dessas formas para a probocite (esôfago e faringe do inseto), onde serão regurgitadas sendo transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado através da picada, recomeçando o ciclo (BRASIL, 2009).

A infecção de um hospedeiro vertebrado (Figura 5) ocorre quando a fêmea do flebotomíneo que é hematófaga pica o mamífero para se alimentar e assim durante a ingestão de sangue o inseto infectado inocula a forma promastigota metacíclica, a qual penetra na pele do hospedeiro invadindo várias células como dendríticas, fibroblastos, neutrófilos e principalmente macrófagos (NEVES, 2006).

A forma promastigota é internalizada via fagocitose por meio de pseudópodes ficando assim o parasita internalizado num vacúolo chamado de vacúolo parasitóforo. É no interior desse vacúolo que o parasita se diferencia para a forma amastigota, no entanto esses parasitas não sofrem modificações devido a presença das enzimas lisossomais no vacúolo (PETERS et al., 2008).

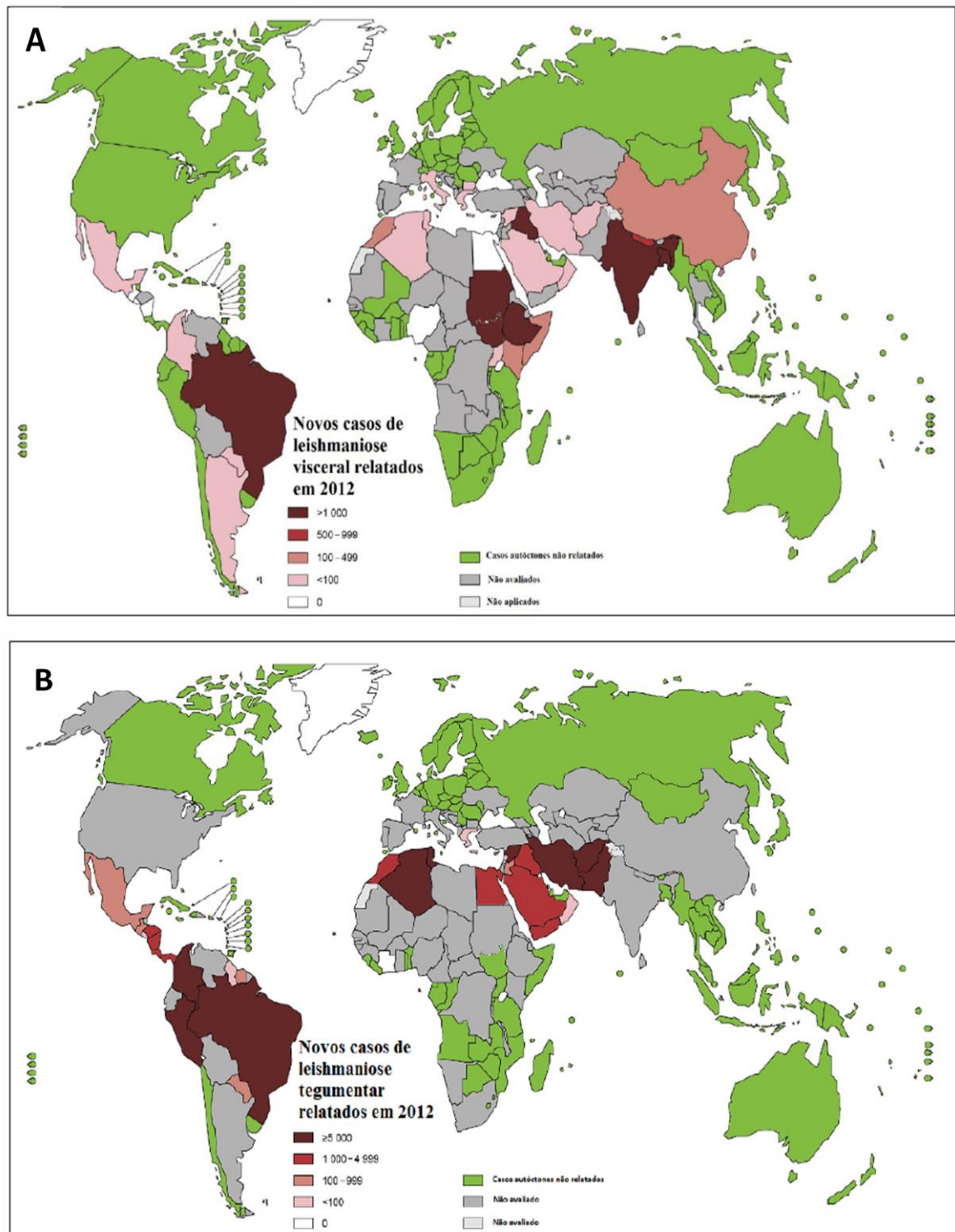
O parasita na forma amastigota se multiplica no interior do vacúolo parasitóforo por divisões binárias sucessivas, várias amastigotas ficam aderidas a membrana do vacúolo preferencialmente pela sua região posterior, muitas dessas formas amastigotas ocupa grande parte do citoplasma o que gera o rompimento da membrana do macrófago, liberando os parasitas no tecido. Essas formas amastigotas podem atingir a corrente circulatória podendo ficar livres no sangue ou permanecerem no interior dos monócitos, desse modo podendo ser sugados por uma nova fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo ou irão invadir novos macrófagos (KAMHAWI, 2006).

### 3.3 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

Consideradas um grande problema de saúde pública, as leishmanioses representam um conjunto de doenças com importante quadro clínico o que gera uma ampla diversidade epidemiológica. Cerca de 15 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, aproximadamente trezentos e cinquenta milhões de pessoas podem estar expostas ao risco de infecção e é provável que ocorram 1,5 a 2 milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2006, 2007).

Os continentes americanos, africano, asiático e a região sul da Europa são consideradas regiões endêmicas, sendo 88 países considerados endêmicos nos quais 72 são países em desenvolvimento (RATH et al., 2003, MISHRA et al., 2009). Aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão (Figura 6A) e a maioria dos casos de leishmaniose cutânea são relatados no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria (Figura 6B) (WHO, 2014). O Brasil está entre os países considerados altamente endêmicos, que concentram 90% dos casos de leishmaniose cutânea no mundo (BRASIL, 2007).

**Figura 6-** Mapa de distribuição das leishmanioses no Mundo: **6A** - casos de leishmaniose visceral; **6B**- casos de leishmaniose cutânea.



Fonte: WHO, 2014.

Em 20 estados brasileiros foram registrados e confirmados 3852 casos de LV só no ano de 2008, dos quais 53,7% acometeram crianças menores de 5 anos (BRASIL, 2010). Este fato pode estar relacionado com o contato frequente das crianças com animais reservatórios o

que influencia o quadro, como também essa faixa etária apresenta maiores taxas de carência nutricional e sistema imunológico em formação (QUEIROZ et al., 2004; BORGES et al., 2008).

Em 2010, no Brasil foram registrados 3.526 casos de LV, a região Nordeste continuava com o maior número de casos (1.662 casos) e em segundo a região Norte (636 casos) (BRASIL, 2011b).

A região Norte, em 2008, contribuiu com 43,3% dos casos registrados no Brasil para LTA, seguida pelas regiões Norte (30,5%) e Centro-Oeste (14,9%). A região Sudeste registrou 8,2% dos casos e a região Sul deteve 3,1% destes (IPEA, 2011).

No ano de 2009, no estado da Paraíba 109 casos de LTA foram registrados, sendo 73% oriundos dos municípios de Alagoa Nova, Areia, Alagoa Grande e Pilões. No tocante a LV neste mesmo ano foram registrados 16 casos em 10 municípios, ficando 31,2% do total de casos registrados em João Pessoa (BRASIL, 2011c).

### 3.4 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Devido à falta de vacinas como método de prevenção para as leishmanioses, os medicamentos se tornam as únicas formas para o tratamento dessas patologias. A terapêutica hoje praticada tem como drogas de primeira escolha os antimoniais pentavalentes (SbV), o antimoniato N-metil glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), este último não é comercializado no Brasil (RATH et al., 2003; BRASIL, 2007). Na ausência de resposta satisfatória no tratamento com os SbV a Anfotericina B, as pentamidinas e a miltefosina são as drogas de segunda escolha com administração por via parenteral (TIUMAN et al., 2011).

Desde 1912 utiliza-se os SbV para o tratamento das leishmanioses, porém mesmo após décadas ainda não está totalmente elucidado o seu mecanismo de ação. Sugere-se que essa droga facilitaria a distribuição da droga nos macrófagos do hospedeiro ou ainda que ela seja uma pró-droga, convertida no interior do macrófago em antimonial trivalente (ROBERTS et al., 2008 ; CROFT et al., 2006). A necessidade de tratamento prolongado, baixas dosagens e a via de administração ser parenteral o tratamento com Glucantime® leva a ocorrência de falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasitas, como agravante esse medicamento apresenta efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular, insuficiência renal, icterícia, elevação das enzimas hepáticas, hepatotoxicidade, pancreatite e dor no local da aplicação, entre outros (RATH et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011).

A Anfotericina B<sup>®</sup> é utilizada como droga de segunda escolha empregada nessa terapêutica, caracteriza-se por ser um antifúngico poliênico referência para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (OULLETE et al., 2004), mas que apresenta atividade contra algumas espécies de protozoários, incluindo *Leishmania* spp (LEMKE et al., 2005). O seu mecanismo de ação baseia-se na ligação da droga ao ergosterol provocando uma desorganização estrutural na membrana plasmática do parasita, nos mamíferos, essa droga liga-se ao colesterol da membrana celular devido a semelhança entre o ergosterol de membrana da *Leishmania* o que limita seu uso clínico, uma vez que ele apresenta vários efeitos adversos, como tremores, febre, náuseas, vômitos, anorexia, mialgias, artralgias, e perda de peso, sendo a nefrotoxicidade a principal expressão tóxica (NIETO et al., 1995; ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007). Na tentativa de reduzir os efeitos adversos novas associações desse fármaco à lipossomas tem sido realizadas pois esses agem especificamente sobre as células-alvo (macrófagos), porém o fator limitante para seu uso é o alto custo dessas formulações, em particular para os países em desenvolvimento (PAULA et al., 2003; CROFT et al., 2006).

A Pentamidina é uma diamina aromática cujo mecanismo de ação está relacionado com a sua ligação ao DNA e desintegração do mesmo, competindo com os ácidos nucleicos (JEAN-MORENO et al., 2006). Esse fármaco apresenta alta toxicidade o que limita seu uso, dentre os efeitos imediatos incluem-se hipotensão, dor de cabeça, náuseas, vômitos, hipoglicemia, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (PAULA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011).

A miltefosina, uma hexadecilfosfocolina, foi desenvolvida inicialmente como um agente antitumoral, porém mostrou-se eficaz na ativação de macrófagos de camundongos infectados por *Leishmania* spp. e na inibição da síntese de lipídeos destes protozoários (SINDERMANN et al., 2004; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006). Como vantagem de tratamento apresenta via de administração oral, no entanto, seu mecanismo de ação ainda é controverso, é considerada menos severa que os outros fármacos, porém pode provocar vômitos e diarreia, elevar a uremia e os níveis sanguíneos de transaminases (FISHER et al., 2001; OULETTE et al., 2004).

O alopurinol é um quimioterápico que é utilizado em associação com os antimonialis por apresentar atividade apenas inibitória do crescimento de *Leishmania* spp. Apresenta administração oral e toxicidade reduzida, o que facilita a terapêutica (OLIVEIRA et al., 2011).

Diante desse contexto, onde os fármacos apresentam altas toxicidades e diversos efeitos adversos observa-se a importância da busca de novos fármacos para a terapêutica das leishmanioses.

### 3.5 PRODUTOS NATURAIS E A *BIXA orellana* L.

O uso de plantas com fins terapêuticos tem sido constatado em todas as civilizações, assim como práticas de cunho religioso. De forma empírica o homem começou observando o efeito que as plantas causavam no organismo e assim passou a utilizá-las como fonte de alimentos. Desta forma, triando as plantas que tinham atividades tóxicas, alimentícias, medicinais (FIGUEREDO, 2011).

A riqueza da flora e o conhecimento popular transmitido através das gerações permitiu a identificação de inúmeras plantas medicinais o que serviu para os tratamentos de várias doenças no Brasil.

No início do século XX, a fitoterapia brasileira se expandiu muito devido aos estudos e utilização de plantas já conhecidas pelo uso popular por parte dos médicos, farmacêuticos e até mesmo dos laboratórios nacionais (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA BIOMOLECULAR, 2004). Por falta de estudos químicos e toxicológicos não se tem a comprovação da ação farmacológica de muitas espécies vegetais que são utilizadas pela população brasileira o que acarreta uma baixa qualidade nos medicamentos a base de plantas medicinais (BACCHI, 1996). Aliado a isso o mercado brasileiro devido a falta de P&D (pesquisa e desenvolvimento) e investimentos no setor de controle de qualidade encontra-se seriamente comprometido com o desenvolvimento de novos fitoterápicos (VILEGAS; CARDOSO, 2007).

Em 2006, o Brasil atendendo as orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) cria a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que estabelece diretrizes com a finalidade de garantir o desenvolvimento, acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos visando fortalecer o uso sustentável da biodiversidade brasileira e melhorar o desenvolvimento do Complexo produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

Tendo em vista que o Brasil conta com uma das maiores riquezas em biodiversidade do planeta, trazendo nos vegetais uma fonte sustentável para a busca de novas moléculas bioativas, este é um campo de pesquisa bastante promissor a ser explorado.

Compostos derivados de plantas têm sido empregados em diversas áreas, tendo como estimativa que de aproximadamente 250.000 espécies de plantas no mundo, apenas cerca de 25.000 foram avaliadas em busca de alguma atividade biológica (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

A potencialidade antileishmania de algumas plantas já foi demonstrada HOCQUEMILLER et al.,1991; SCHMEDA-HIRCHMANN, 1996; JARAMILLO et al., 2000; CAMACHO et al., 2003; VAN MIERT et al., 2005; TRUITI et al., 2005; MACHADO et al., 2007; CALLA-MAGARINOS et al., 2009; NERIS et al., 2013; ROCHA 2014; DIAS 2014; diante disso, a busca de novas substâncias bioativas com atividade antileishmania não é uma exceção.

A espécie *Bixa orellana*, vem sendo largamente empregada na medicina popular com atividades farmacológicas comprovadas, tais como antipirético, cardiotônica e antidiarréico (BANDONI et al., 1972), antimalárico e para doenças hepáticas (MILLIKEN, 1997), antiofídico (OTERO et al., 2000), hipoglicemiante (GIRON et al., 1991), repelente (ROJAS DE ARIAS, 1992), antimicrobiana (FLEISCHER et al., 2003; ALONSO 2004) e anticarcinogênico (AGNER et al., 2004).

*Bixa orellana* L, popularmente conhecido como urucum recebeu este nome científico em homenagem ao primeiro botânico explorador que estudou esse arbusto, Francisco de Orellana, planta esta, nativa do Brasil e existente ao longo da América Tropical, seu extrato era usado para tingir tecidos e pintar o corpo, bem como utilizada em uma bebida a base de cacau misturada a vanilina (SILVA e FRANCO et al., 2000; GIULIANO 2003).

Seu nome popular deriva da palavra em tupi “ru-ku” que significa “vermelho”, devido o seu cultivo ter atingido diversas regiões do mundo a sua sinonímia vulgar é bastante vasta: Urucu, urucum, açafraão, açafrao e açafroeira da terra (Brasil), atole, achiote e bija (Peru, Colômbia e Cuba), onotto e onotillo (Venezuela), urukú (Paraguai), roucou e rocuyer (República Dominicana e Guiana francesa), rocuyer (França), axiote (México), urucu (Argentina), analto, attae kushub (Honduras Britânica), analto (Honduras), guajachote (El Salvador), ditaque e kifasu (Angola), achiote, achote, anatto, bija (Porto Rico), roucou ekoessewee (Surinam) (SILVA E FRANCO et al., 2000).

A família Bixaceae é representada por um único gênero, *Bixa* L., onde a espécie *Bixa orellana* é um arbusto (figura 7A) que pode atingir de 3 a 4 metros de altura sendo considerada uma planta ornamental devido a exuberância de suas flores brancas ou em várias tonalidades (figura 7B) e seus frutos denominados de cachopas que são cobertos externamente com apêndices flexíveis vermelhos, verdes ou pardos, que abrigam em seu interior cerca de

40 a 60 sementes (figura 7C) de coloração avermelhada de onde se extraem os corantes de valor comercial (FRANCO et al., 2008).

**Figuras 7:** 7A- arbusto; 7B – flores e 7C – fruto aberto contendo as sementes de *Bixa orellana*.



Foto: FRANCO et al., 2008.

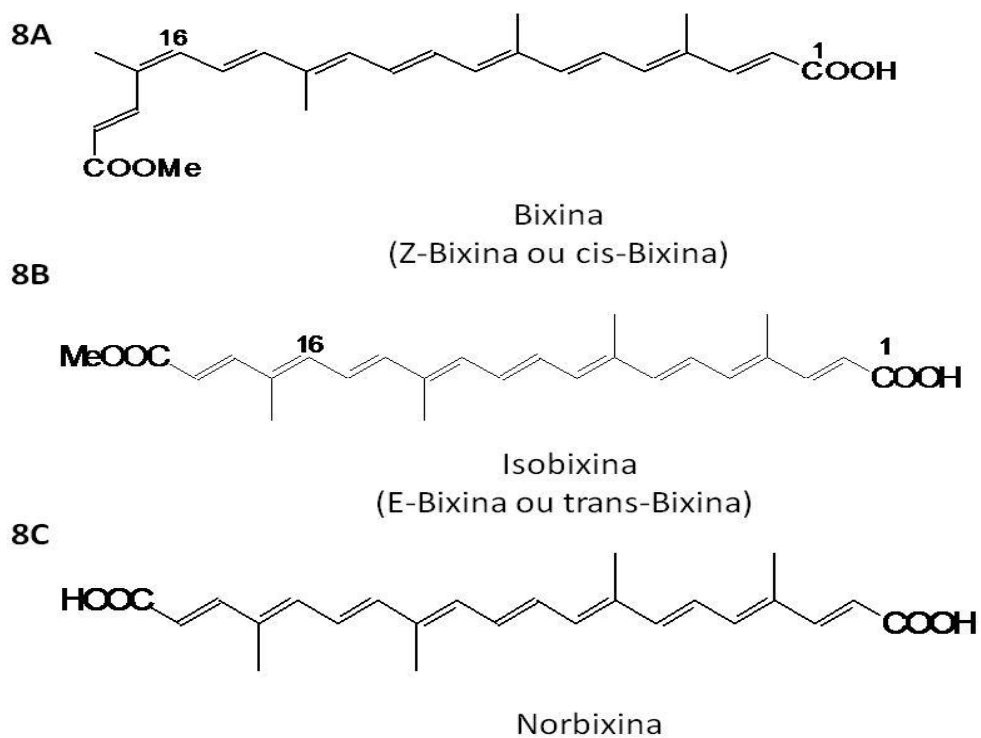
A extração das sementes quando realizada com solventes pode ser por três métodos básicos, extração alcalina que utiliza solução de NaOH ou KOH resultando na conversão da bixina em norbixina, a extração feita com óleo soja e milho e a extração através de solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, etanol, acetona, propilenoglicol) que resulta na forma mais pura dos pigmentos. Essas técnicas de extração em sua maioria almejam a extração da bixina, que é um corante o qual determina a coloração vermelha das sementes (YABIKU 1992; ARAÚJO 1995; ROBBINS, 1995).

São muitos os compostos químicos extraídos da *Bixa orellana*, como exemplos temos os flavonóides, ácido gálico, ácido alfitólico, óleo essencial, diterpenos, vestígios de alcalóides, os carotenóides (REVILLA, 2001).

Na fração lipídica, extraída com hexano, foi identificada a presença de tocotrienóis com destaque para o delta tocotrienol (FREGA et al., 1998).

A bixina é um carotenóide pertencente à classe dos apocarotenóides naturais, este pigmento encontra-se em maior concentração sendo o responsável por fornecer a coloração vermelha ao arilo da semente (GALINDO-CUSPINERA 2002). Este pigmento ocorre naturalmente na forma 16-Z (cis) (figura 8A), no entanto durante o processo de extração é isomerizada conduzindo à forma 16-E (trans), denominada isobixina (figura 8B) e a norbixina (figura 8C) é o derivado desmetilado da bixina (EVANS, 1992).

**Figura 8** - Estrutura química: 8A - bixina; 8B – isobixina; 8C – norbixina.



Segundo Marmion (1991), a bixina é indexada no Color index como CI No 75120, e pela Comunidade Económica Européia como EEC n<sup>o</sup> E160b e CI Natural Color 4.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA PRIMA

#### 4.1.1 Obtenção da matéria prima

Foram utilizadas sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) do cultivar Piáveis Verde Limão doadas gentilmente pela empresa CHR HANSEN, apresentando teor de bixina de 6%.

#### 4.1.2 Método de extração

O processo utilizado na extração de constituintes da *B. orellana* seguiu o método descrito por Barbosa-Filho et al. (1998), onde 800 g de sementes não trituras foram secadas na estufa por 45°C, extraídas em soxhlet com hexano por um período de 8 horas, em seguida, evaporado o solvente em rotavapor obtendo um produto oleoso vermelho escuro que foi denominado de “fração oleosa”. Em seguida, as sementes foram extraídas com clorofórmio, também por um período de 8 horas. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo sólido, de coloração avermelhada, que foi denominado de “concentrado de bixina”. Esse concentrado foi ressolubilizado numa mistura de clorofórmio-acetona (1:1) e deixado no freezer por um período de 24 horas. Em seguida, o precipitado foi filtrado e recristalizado em clorofórmio, fornecendo a bixina pura, na forma de cristais vermelho púrpura de ponto de fusão 195-196 °C.

#### 4.1.3 Caracterização das substâncias avaliadas

##### 4.1.3.1 Caracterização do concentrado de bixina

A bixina foi identificada através de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparada com dados da literatura (KELLY et al.,1996).

##### 4.1.3.2 Caracterização da fração oleosa

###### a) Esterificação do óleo fixo de urucum

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram preparados pelo método Maia (1992), que consistiu basicamente da saponificação de 0,030g de óleo com solução de hidróxido de sódio (0,5N) em metanol, seguido da esterificação com solução de cloreto de amônio, ácido sulfúrico e metanol, na proporção de 1:1 e 5:30, respectivamente.

À seguir, acrescentou-se ao tubo de ensaio, sob agitação (30 segundos), solução saturada de cloreto de sódio e posteriormente 5 mL de hexano sob agitação (30 segundos). Após a separação das fases, a fase superior (fase hexânica) foi transferida com auxílio de pipeta de Pasteur para um frasco com tampa e mantido sob refrigeração até análise dos ácidos graxos.

#### **b) Análise da fração oleosa por cromatografia gasosa**

A separação e quantificação (método de normalização de área) das substâncias foram realizadas em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010), dotado com coluna capilar DB-5 (J&W Scientific; 30,0m x 0,25mm x 0,25µm).

A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV), dotado com coluna capilar OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0m x 0,25mm x 0,25µm). As condições de análise no CG-DIC e CG-EM foram: injetor a 240 °C, detector a 230 °C; gás de arraste: hélio, vazão: 1,0mL/min.; modo de injeção split: 1/30, volume de injeção: 1µL de solução.

A comprovação das substâncias foi efetuada por meio da comparação dos tempos de retenção, dos espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e comparação destes com os ésteres metílicos dos seguintes ácido graxos: oleico (Sigma, L – 37H846), palmítico (Sigma, L – 80H8431), linolênico (Sigma, L– 67H1673), mirístico (Sigma, L – 126H3446), esteárico (Sigma, L – 26H8491), behênico (Sigma, L – 96H8467), araquídico (Sigma, L – 56H0479).

## **4.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

### **4.2.1 Ensaio da toxicidade aguda com *Artemia salina***

Para a determinação preliminar da toxicidade aguda foi utilizado o método por *Artemia (A.) salina* (MEYER et al., 1982). Os ensaios foram realizados no Laboratório de

Ensaio Farmacológico localizado no Complexo Integrado de Pesquisa Três Marias no Campus I da Universidade Estadual da Paraíba-UEPB.

Uma quantidade de 0,3 g de cistos de *A. salina* foram mantidos em água marinha sintética e incubados por 24-36 horas sob iluminação artificial e temperatura de 22°C. Após a eclosão, 10 náuplios foram coletados e tratados em tubos de ensaio contendo a solução de bixina e da fração oleosa 125 e 250 g/l em concentrações entre 50 e 1000 µg/mL e um controle. As culturas de foram incubadas a 22°C, sendo realizada a leitura do número de sobreviventes e mortos após 24 horas para a determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>). O ensaio foi realizado em triplicata.

Para análise do ensaio da toxicidade com *A. salina*, a DL<sub>50</sub>±desvio padrão foi determinada pelo método Probitos utilizando software STATPLUS® 2009, com 95% de intervalo de confiança.

## **4.2.2 Avaliação da toxicidade animal**

### **4.2.2.1 Avaliação da citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos**

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos suíços coletado do sinus orbital. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. A fração oleosa e a bixina foram solubilizadas em DMSO (5%) e preparada em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em quadruplicata. Os controles positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (SigmaAldrich®) em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção, foi adicionado a cada poço 200 µL de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100

(0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH<sub>50</sub> da fração oleosa e bixina (concentração do que produz 50% de hemólise), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{Hemólise} = \frac{A_{\text{Tx}} - A_{(\text{FO e B})}}{A_{\text{Tx}}} \times 100$$

Onde:

$A_{\text{Tx}}$  = Absorbância do poço contendo controle positivo com Triton-X

$A_{(\text{FO e B})}$  = Absorbância do poço contendo a concentração da fração oleosa e bixina

#### 4.2.2.2 Avaliação da toxicidade aguda *in vivo*

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o OECD “Guidelines for testing of chemicals” n. 423.

Camundongos suíços, três fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 2000 mg/kg da fração oleosa e bixina por via oral (v.o.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (óleo de milho). O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Uma vez existindo informações toxicológicas sobre a substância a ser testada, recomenda-se iniciar com a dose de 2000 mg/kg. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL<sub>50</sub> (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS (Anexo 1).

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração da fração oleosa e bixina por via oral (v.o.), foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental elaborado pelo Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB e descrito por Almeida et al. (1999). Desde a 24<sup>a</sup> hora e até 14 dias após a administração da dose, foram observadas a variação do peso e o consumo de água e alimentos pelos animais experimentais.

Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados. Os órgãos, fígado, rins, coração, timo e baço foram removidos e pesados para

determinação do índice dos órgãos e calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

#### 4.3.1 Parasitas e sua manutenção *in vitro* e *in vivo*

Para a avaliação da atividade leishmanicida do concentrado de bixina e da fração oleosa, foram utilizadas formas promastigotas de *L. major* (MHOM/IL/1980/FN) cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Norma Melo (Universidade Federal de Minas Gerais). Os parasitas foram cultivados em meio de cultura NNN/SCHNEIDER suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 U.I. de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina), incubados a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e repicados semanalmente. Concomitantemente, a cepa de *L. major* foi mantida em camundongos suíços inoculando-se  $1 \times 10^7$  células/mL no coxim plantar da pata posterior esquerda dos animais, provenientes do Biotério Thomas George, localizado no CBiotec/UFPB.

As espécies de *L. major* também foram criopreservadas para futuras utilizações. Para isto, adicionou-se 10% de glicerol estéril nas culturas de promastigotas no início da fase estacionária de crescimento, cultivadas apenas em meio Schneider completo. O glicerol foi adicionado lentamente à cultura sob agitação constante, e após 15 minutos, alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos apropriados para criopreservação, e mantidas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  e em nitrogênio líquido. Conforme necessidade, essas culturas eram descongeladas à temperatura ambiente, observadas no microscópio comum, e uma alíquota de cerca de 200 µl era inoculada em 1 mL de meio Schneider completo e incubadas em estufa a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  para o crescimento das culturas.

#### 4.3.2 Animais

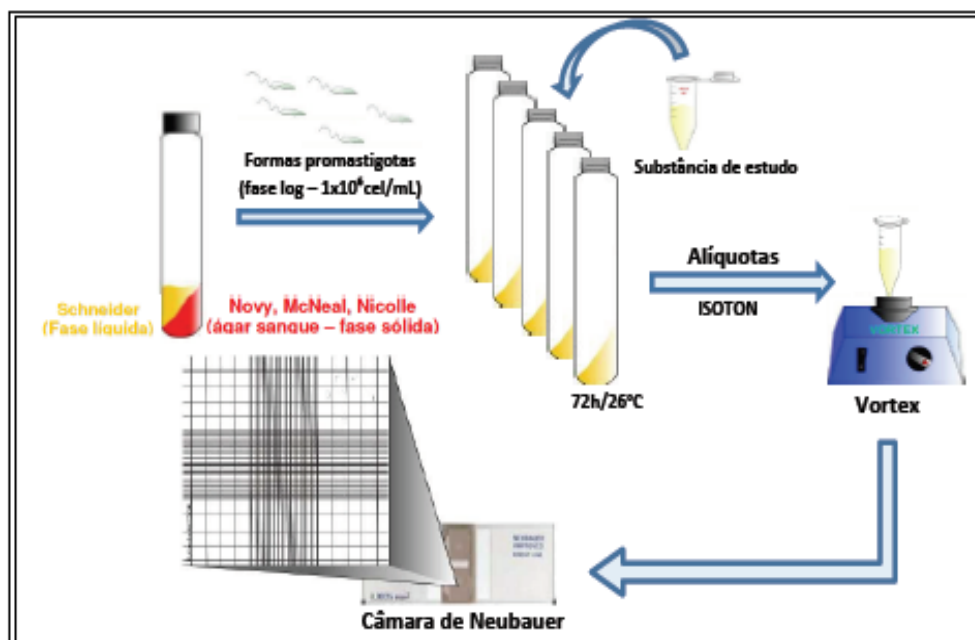
Foram utilizados camundongos suíços fêmeas (8 -10 semanas) provenientes do Biotério Thomas George, localizado no CBiotec/UFPB e do Biotério, localizado na FCM/Campina Grande. Todos os animais foram mantidos num ambiente com temperatura controlada a 21 ciclos  $\pm 2^\circ\text{C}$ , claras e escuras de 12/12 horas e tiveram livre acesso a comida e água. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de

Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, com o registro nº 0806/11 (ANEXO 2).

#### 4.3.3 Avaliação da atividade antileishmania da bixina e da fração oleosa

Para avaliação da atividade antipromastigota, experimentos foram realizados em tubos de ensaio contendo meio Schneider completo, onde adicionou-se  $1 \times 10^6$  células/mL de promastigotas das espécies de *Leishmania* sp. estudadas, em fase logarítmica de crescimento, na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações do concentrado de bixina e da fração oleosa. Após 72 horas de incubação a  $26^\circ\text{C} \pm 1$ , alíquotas das culturas foram retiradas, diluídas em solução de Isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 mL de formol em 1 L de água destilada), analisadas sob microscopia óptica comum e quantificadas diretamente em câmara de Neubauer (Figura 9). A estimativa do número de parasitos/ mL de cultura foi feita utilizando a fórmula: N° de parasitos = média dos 4 quadrantes x o inverso da diluição da amostra x  $10^4$ .

Figura 9 – Esquema do experimento da atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *Leishmania major*.



Fonte: Nérís, 2012. Formas promastigotas de *L. major* em fase log de crescimento ( $1 \times 10^6$  cel/mL) foram incubadas na presença da bixina, fração oleosa, Glucantime® e Anfotericina B® em diferentes concentrações. Após 72h de incubação a  $26^\circ\text{C}$ , alíquotas foram diluídas em solução de ISOTON e quantificadas em câmara de Neubauer, através de microscopia óptica comum.

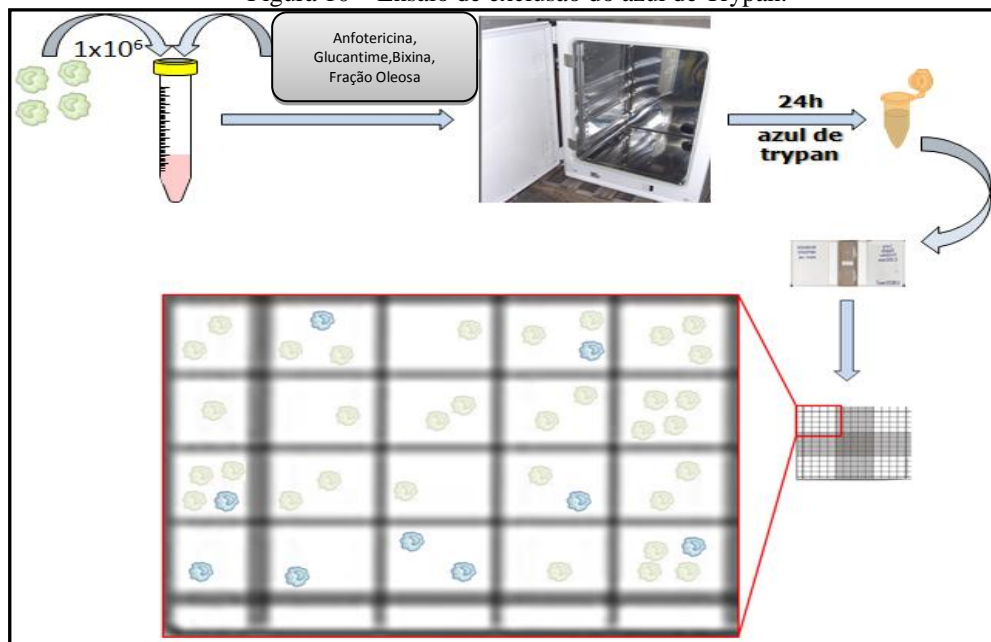
Paralelamente, as culturas de *L. major* foram avaliadas quanto à sensibilidade ao Glucantime<sup>®</sup> [300mg/mL (Aventis Pharma, Brasil)] e a Anfotericina B<sup>®</sup> [1mg/mL (Cristália)], como medicamentos de referência. Ambas as substâncias foram diluídas em meio Schneider completo, de acordo com as concentrações testadas. Esses medicamentos foram cedidos gentilmente pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley-UFPB.

As culturas mantidas na ausência dos compostos foram denominadas controles, onde seu crescimento foi considerado 100% e os cálculos da porcentagem de inibição dos compostos foram realizados em relação a esta cultura controle. Cada experimento foi realizado em duplicata e foi repetido pelo menos em três experiências independentes. A concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) foi calculada por análise Probit (SPSS para Windows 8.0).

#### **4.3.4 Ensaio de citotoxicidade e determinação do índice terapêutico *in vitro***

Para a obtenção dos MØs peritoneais murinos, utilizaram-se fêmeas de camundongos suíços, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes do biotério do CBiotec da UFPB. Administrou-se 1 mL de tioglicolato na cavidade peritoneal dos camundongos e após 5 dias os mesmos foram sacrificados para obtenção de MØs peritoneais. Para tanto, 10 mL da solução PBS, suplementada com 3%, de SBF foram injetados na cavidade peritoneal, e a solução foi recuperada em seguida. As células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo (RPMI + 10% SBF e 100 U.I. de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina) (Figura 10). As células viáveis foram ajustadas para uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL, e então distribuídos 1 mL dessa suspensão em tubos de polipropileno, seguindo pela adição dos compostos a serem testados em diferentes concentrações, exceto nos controles. As células foram então incubadas em estufa 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, e após 24 horas, quantificadas em câmara de Neubauer na presença de Azul de Trypan a 0,4%.

Figura 10 – Ensaio de exclusão do azul de Trypan.



Fonte: Caldas, 2010.

A viabilidade das células expostas às substâncias avaliadas foi determinada por comparação com a cultura controle (sem fármaco), sendo cada experimento realizado em duplicata, com pelo menos três experimentos independentes. A concentração que causou uma redução de 50% da viabilidade celular ( $CC_{50}$ ) foi calculada por análise Probit (SPSS para Windows 8.0). O índice terapêutico foi calculado dividindo o  $CC_{50}$  para macrófagos peritoneais pelo  $IC_{50}$  das formas promastigotas (AMORIM et al., 2013).

#### 4.3.5 Avaliação da atividade *in vivo* da bixina e da fração oleosa em camundongos Suíços infectados com *L. major*

Para os estudos *in vivo* foram utilizados camundongos suíços. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/ FCM. Camundongos, fêmeas, de 8 a 10 semanas, foram infectados com  $1 \times 10^7$  promastigotas em fase estacionária de crescimento (cinco dias de cultivo) pela via subcutânea, na pata posterior esquerda. O desenvolvimento das lesões foi monitorado semanalmente, por meio de medidas da espessura da pata infectada e não infectada com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Japão). A diferença entre as medidas representou o tamanho da lesão. Os aspectos analisados foram, portanto, tamanho e características do desenvolvimento da lesão, carga parasitária e peso do animal.

#### **4.3.5.1 Tratamento dos animais**

O tratamento dos camundongos foi por administração via oral das substâncias testadas e via intraperitoneal das medicações de referência Glucantime<sup>®</sup> e Anfotericina<sup>®</sup>, todos os dias a partir do segundo dia de infecção, durante quatro semanas consecutivas. Os camundongos foram observados por mais quatro semanas, totalizando dois meses de experimentação.

Os animais utilizados neste experimento foram divididos em cinco grupos (n=10), sendo: (I) grupo controle, tratado com o veículo óleo de milho (Marca, Liza), via oral; (II) grupo com o concentrado de bixina 80 mg/kg, tratado com dose de 80 mg/kg, via oral; (III) grupo com a fração oleosa 80 mg/kg, tratado com dose de 80 mg/kg, via oral; (IV) grupo Glucantime<sup>®</sup>, tratado com medicamento de referência na dose de 100 mg/kg, via intraperitoneal e (V) grupo Anfotericina<sup>®</sup>, tratado com medicamento de referência na dose de 100 mg/kg, via intraperitoneal. Os medicamentos de referência foram diluídas no veículo PBS e as substâncias avaliadas foram diluídas no óleo de milho (Marca, Liza), e o volume administrado em cada dose foi de 100 µL.

O desenvolvimento das lesões dos animais foi monitorado semanalmente durante dois meses, por meio de medidas da espessura da pata infectada e não infectada com o auxílio de um paquímetro, onde a diferença entre as medidas representou o tamanho da lesão. Foram também analisados durante o tratamento parâmetros qualitativos que poderiam indicar uma possível toxicidade do composto testado, dentre eles alterações de peso corporal, onde a pesagem será realizada semanalmente, além da queda de pelo e presença de metástase.

#### **4.3.5.2 Quantificação da carga parasitária**

Ao fim do tratamento, todos os animais foram eutanasiados e a parasitemia da pata, linfonodo poplíteo esquerdo, baço foram avaliados através do método de diluições sucessivas (OLIVEIRA et al., 2005). Um fragmento da lesão da pata e baço de cada animal foi removido, pesado e macerado em meio Schneider completo (2 mL) com um macerador de tecido, até formar uma suspensão homogênea. Processo semelhante foi realizado com linfonodo poplíteo que drenou a lesão, contudo, a solução do linfonodo foi obtida com a utilização do órgão completo. As suspensões celulares (200 µL) foram então transferidas para placas de 96 poços, e em seguida, realizou-se diluições sucessivas em meio Schneider completo até  $10^{-7}$ . A análise das culturas ocorreu depois de 10 dias de incubação em estufa a

26±1°C sob microscopia óptica comum, para verificar a presença de promastigotas de *L.major*. Cada amostra foi analisada em triplicata.

#### ***4.3.5.3 Análise estatística***

Os dados obtidos dos experimentos foram comparados utilizando o teste ANOVA *oneway*, seguido de pós teste de Dunnet. Para realização da análise estatística e geração de gráficos, foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Para o cálculo de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitos) foi utilizado o modelo Probit de análise de regressão, no programa SPSS 8.0 for Windows.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS SEMENTES DE *BIXA ORELLANA*

Um fator que pôde ser visto durante as extrações foi a descoloração das sementes durante o processo. Após a extração com hexano, as sementes ainda permaneciam bastante vermelhas, e a fração hexânica apresentava coloração vermelho-alaranjada. Já a fração clorofórmica era de cor vermelho intensa e as sementes após a extração estavam praticamente desprovidas de cor.

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIXINA E DA FRAÇÃO OLEOSA

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da bixina apresentou sinais de deslocamento químico entre 1,89-1,93 ppm que correspondem a próton das metilas ligadas aos carbonos vinílicos, um singlete em 3,73 ppm correspondente a metoxila do grupamento éster e também a dois pares de dupletos em 5,79 / 7,26 e 5,83 / 7,35 ppm atribuídos respectivamente a  $\text{H}\alpha$  /  $\text{H}\beta$  aos grupos carboxílicos do ácido livre e do éster. Também apresentou multipletos entre 5,86 a 6,84 ppm.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da bixina apresentou sinais de deslocamento químico em 169,7 e 168,17 ppm referentes aos carbonos das carbonilas de ácido e éster, respectivamente. Também apresentou sinal de deslocamento em 51,5 ppm referente ao carbono da metoxila do éster. Na região de 123,1 a 149,7 ppm observou-se multiplicidade de sinais correspondentes aos carbonos  $sp^2$  da cadeia vinílica e na região entre 12-20 ppm os sinais de deslocamento de carbonos das metilas ligadas aos carbonos vinílicos.

Dessa forma, a análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e os dados de literatura (KELLY et al.,1996) permitiram caracterizar o cristal obtido como sendo o corante bixina, conforme Tabela 1 e Figura 11.

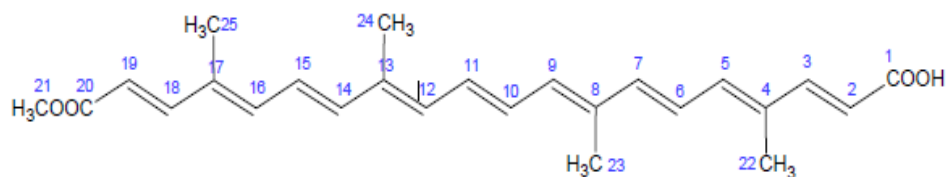
**Tabela 1 - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do cristal de bixina.**

Carbono	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^1\text{H}^a J_{\text{HH}}$	$^1\text{H}^b J_{\text{HH}}$
1	168,07	169,79		
2	117,64	115,84	5,870; 15,5	5,78 ; 15,5
3	147,35	149,79	7,446 ; 15,4	7,31 ; 15,5
4	133,63	133,32		
5	139,93	140,38	6,53 ; 9,8	6,25 ; 10,0
6	124,87	124,18	6,62 ; 16,3	6,59 ; 17,5
7	141,11	141,78	6,53 ; 16,2	6,54 ; 14,0
8	136,60	136,52		
9	134,56	134,79	6,35 ; 10,8	6,43 ; 11,5
10	131,34	131,37	6,66 ; 14,2	6,61 ; 14,5
11	131,14	130,68	6,70 ; 14,2	6,78 ; 14,0
12	134,56	134,18	6,31 ; 10,3	6,30 ; 11,0
13	136,74	136,88		
14	140,62	140,55	6,39 ; 14,7	6,44 ; 14,5
15	123,11	123,15	6,85 ; 14,7	6,80 ; 14,5
16	138,07	138,01	6,35 ; 11,2	6,34 ; 15,0
17	131,33	131,15		
18	138,47	139,60	7,95 ; 15,6	7,89 ; 15,5
19	118,44	117,19	5,90 ; 15,6	5,83 ; 15,0
20	166,86	168,18		
21	12,52	12,46	1,95	1,87
22	12,58	12,60	1,98	1,91
23	12,68	12,77	2,00	1,93
24	19,94	20,05	1,95	1,88
25	51,40	51,52	3,78	3,71

<sup>a</sup> Kelly DR. et al., NMR, MS and X-Ray Crystal Structure Determination of the Bixin Family of Apocarotenoids, J. Chem. Res.(S), 1996, 446-447.

<sup>b</sup> Medidas feitas observando-se o núcleo do  $\text{H}^1$  e  $\text{C}^{13}$  a 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm.

Figura 11 - Estrutura química do cristal de bixina.



Em um estudo fitoquímico para aplicação do óleo da *B. orellana* em uma formulação cosmética, Costa (2007) constatou valores semelhantes ao analisar os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Oliveira (2005) em seus estudos relata obtenção de valores semelhantes aos encontrados nesse estudo para os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C extraídos de sementes de *B. orellana*.

Conforme demonstrado no cromatograma (Figura 12), a amostra da fração oleosa da semente de urucum esterificada apresentou uma mistura complexa de substâncias, com maior abundância dos ésteres metílicos de ácidos graxos saturados e insaturados (Tabela 2).

Figura 12 -Cromatograma de íons totais da amostra do óleo das sementes de urucum esterificada realizada em CG-MS.

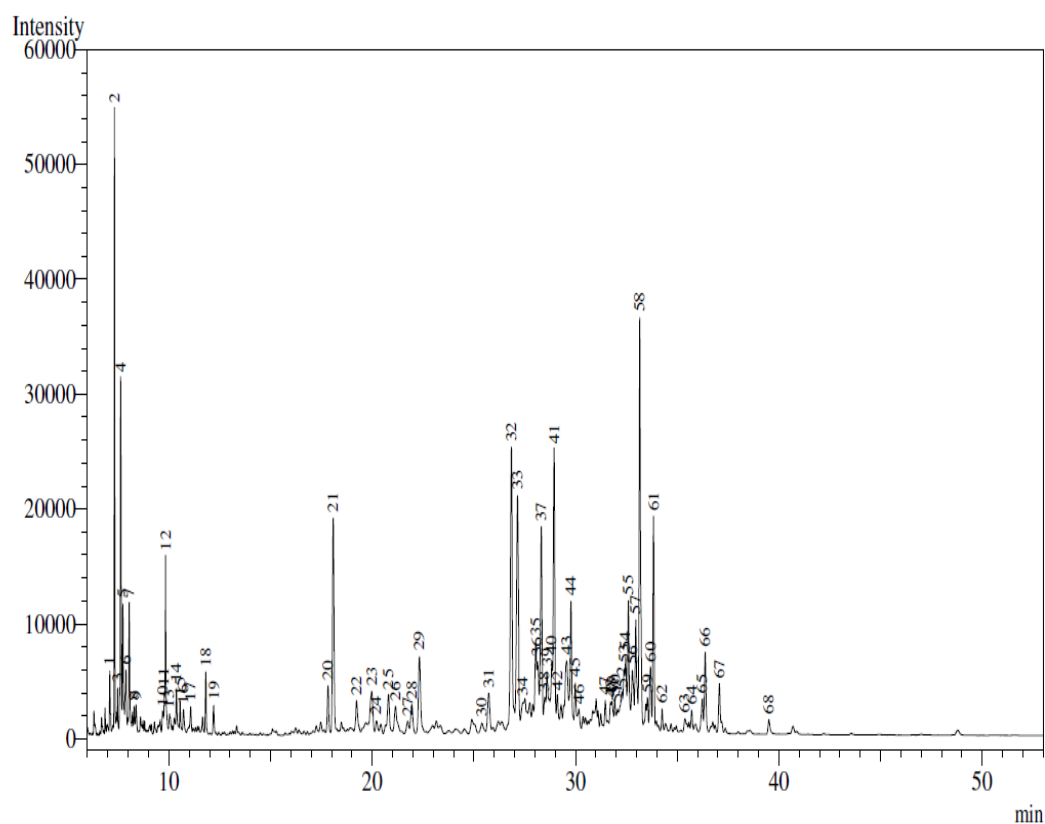


Tabela 2 - Composição dos ácidos graxos das sementes de urucum (*Bixa orellana*L.).

Pico	Tempo de Retenção (min)	Ácido graxo	%
6	7,896	Láurico	1,10
18	11,817	Mirístico	0,84
21	18,086	Palmítico	4,33
32	26,847	Linoleico	7,34
33	27,149	Oléico	5,88
37	28,323	Esteárico	3,99
61	33,836	Araquídico	3,25
68	39,512	Behênico	0,34

Os ácidos graxos listados correspondem aos de maior concentração no óleo. Primeiramente está o linoléico, com aproximadamente 7,34%, seguido do ácido oléico. Os ácidos palmítico e esteárico também estão em quantidades significativas. Essas concentrações se assemelham com os resultados encontrados por Matos et al.(1992), que utilizaram a mesma forma de extração do óleo de *B. orellana* e identificação dos ácidos graxos. Costa-Val (2007) obteve concentrações equivalentes aos resultados encontrados nesse estudo. Porém algumas diferenças podem ser notadas, pois existem diversas variedades da espécie. Além disso, a época em que os frutos foram colhidos pode não ter sido a mesma, o que também interfere nas quantidades de seus componentes.

### 5.3 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

#### 5.3.1 Ensaio da toxicidade aguda com *Artemia salina*

Meyer et al. (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média (DL<sub>50</sub>), apresentada por substâncias bioativas e extratos de plantas em meio salino com náuplios de *A. salina*. Desde então, considera-se que quando são verificados valores abaixo de 500 µg/mL indica que o composto é tóxico, quando os valores de DL<sub>50</sub> variam entre 500 e 1000 µg/mL denota-se moderada toxicidade e quando são encontrados valores acima de 1000 µg/mL, estes, são considerados atóxicos. Baseada nessa relação, pode-se inferir que a bixina e a fração oleosa apresentam-se como tóxicos por apresentar valor de DL<sub>50</sub>, respectivamente, de 353,64±67,54 e 285,41±35,81µg/mL após 24 horas nas condições experimentais, sendo o índice de mortalidade dos náuplios dose-dependente. Tais dados

toxicológicos, segundo Parra et al. (2001), podem ser correlacionados com testes de toxicidade aguda oral em animais.

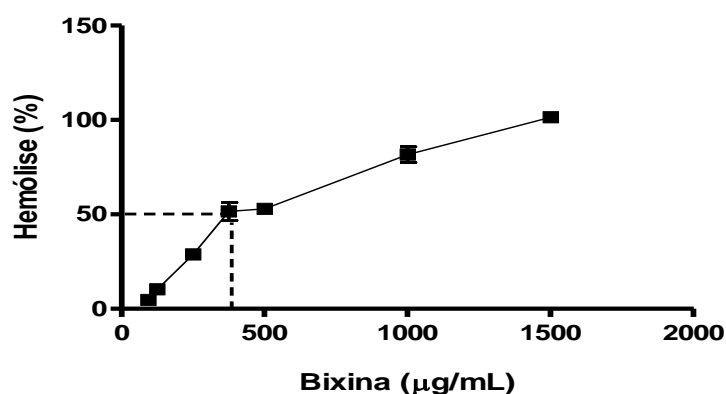
Os testes de toxicidade como o bioensaio com *A. salina*, são válidos, pois os efeitos produzidos por um composto nos animais de laboratório são aplicáveis ao homem. Com base na dose por unidade de superfície corporal, os efeitos tóxicos no homem estão consideravelmente nos mesmos limites que os observados nos animais de laboratório, sendo possível descobrir possíveis riscos nos humanos (KLASSEN et al., 2001).

Num estudo realizado por Kumar et al., (2012) ao utilizar extratos das folhas de *B. orellana* evidenciou um efeito não tóxico contra a *A. salina*, demonstrando que extratos de outras partes da mesma planta podem conter diferentes princípios ativos, os quais podem apresentar efeito tóxico contra a mesma espécie testada.

### 5.3.2 Avaliação da citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos

No ensaio de avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos suíços observou-se que a percentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com bixina, produzindo 100% de hemólise em concentrações a partir de 1500  $\mu\text{g/mL}$ . O valor de  $\text{CH}_{50}$  obtido foi de 431,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $R^2 = 0,9805$ ) (Figura 13). Já no caso da fração oleosa, não foi possível calcular uma  $\text{CH}_{50}$ , uma vez que hemólise em baixo percentual foi observada apenas na maior dose testada (2000  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo considerada uma composição pouco hemolítica ( $\text{CH}_{50}$  maior que 1250  $\mu\text{g/mL}$  (SANTOS JÚNIOR et al., 2010).

Figura13 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos suíços após tratamento com bixina ( $\mu\text{g/mL}$ ).



$$\text{CH}_{50} = 431,5 \mu\text{g/mL} (R^2 = 0.9805)$$

Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas.

Tal atividade corrobora com achados na literatura, uma vez que estudos indicam que alguns compostos isolados de plantas, tais como terpenoides, assim como polifenóis, epicatequinas e saponinas podem causar mudanças na membrana de células vermelhas sanguíneas e subsequentemente produzir hemólise (GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

Agências regulatórias, a exemplo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendam a realização de ensaios desta natureza para a aprovação de produtos cosméticos. O ensaio permite quantificar e avaliar os efeitos adversos dos tensoativos empregados em xampus, sabonetes líquidos e produtos de higiene sobre a membrana plasmática das hemácias e a consequente liberação da hemoglobina (hemólise) e ainda, o índice de desnaturação da hemoglobina, avaliado através de sua forma oxidada, ambos quantificados por espectrofotometria. A relação entre a hemólise e oxidação da hemoglobina fornece um parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vitro* (BRASIL, 2003).

### 5.3.3 Ensaios de toxicidade pré-clínica aguda em animais

#### 5.3.3.1 Avaliação comportamental e estimativa da DL<sub>50</sub>

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda que segue o protocolo estabelecido pela OECD nº423 (Anexo 1), foi evidenciado que o tratamento com 2000 mg/kg da bixina induziu morte de um animal apenas no segundo experimento. O valor de DL<sub>50</sub> obtido foi de 2500 mg/kg.

Ainda, foram observados alguns efeitos característicos de alterações no SNC e SNA (Tabela 3). No segundo experimento, os efeitos foram bem mais discretos, com ptose e sedação de 0 a 60 min, e com variação nos efeitos observados no SNA, uma vez que no segundo experimento foi observada defecação aumentada no tempo zero.

**Tabela 3 - Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com bixina com dose máxima, via oral.**

Dose (mg/kg; V.O.)	Tempo de observação (min)	Efeitos comportamentais
Bixina 2000 (3 animais)	0	(++) hiperatividade; (++) irritabilidade; (++) agressividade; (+) ataxia; (+) resposta ao toque diminuído; (+) perda do reflexo corneal e (+)

		<b>auricular; (+) ambulação; (+) levantar; (++) escalar; (+) contorções abdominais; (++) constipação; (-) micção; (-) tônus muscular; (-) força para agarrar</b>
	<b>15</b>	<b>(++) hiperatividade; (+) irritabilidade; (++) agressividade; (+) ataxia; (++) resposta ao toque diminuído; (+) ambulação; (+) escalar; (+) constipação; (-) micção; (-) força para agarrar</b>
	<b>30</b>	<b>(++) hiperatividade; (+) irritabilidade; (++) agressividade; (+) ataxia; (+) analgesia; (+) resposta ao toque diminuído; (+) ambulação; (+) estereotipia; (+) constipação; (-) micção; (-) força para agarrar</b>
	<b>60</b>	<b>(+) hiperatividade; (++) irritabilidade; (+) agressividade; (+) ataxia; (+) analgesia; (+) constipação; (-) micção; (-) força para agarrar</b>
	<b>240</b>	<b>(+) hiperatividade; (++) micção; (-) força para agarrar</b>

[(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n = 3 (fêmeas) – primeiro experimento.

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda foi evidenciado que o tratamento com 2000 mg/kg da fração oleosa não induziu morte de animal experimental. O valor de DL<sub>50</sub> obtido foi de 5000 mg/kg.

Foram observados alguns efeitos característicos de alterações no SNC e SNA (Tabela 4). Observou-se também que após 4 horas, as fezes foram ficando diarréicas, e com muito óleo, da cor da fração oleosa. Os efeitos observados podem ser correlacionados como sendo resultantes do mal estar abdominal gerado pela ingestão da fração oleosa.

**Tabela 4 - Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com fração oleosa com dose máxima, via oral.**

<b>Dose (mg/kg; V.O.)</b>	<b>Tempo de observação (min)</b>	<b>Efeitos comportamentais</b>
<b>O.E.U. 2000 (3 + 3 animais)</b>	<b>0</b>	<b>(-) ambulação; (+) escalar</b>
	<b>15</b>	<b>(+) irritabilidade; (+) ptose; (+) ataxia; (+) constipação; (-) micção</b>
	<b>30</b>	<b>(+) sedação; (+) ataxia; (+) analgesia; (+) constipação; (-) micção</b>
	<b>60</b>	<b>(+) sedação; (+) ataxia; (+) levantar; (-) micção</b>

	<b>240</b>	<b>(+)diarréia; (-) micção</b>
--	------------	--------------------------------

[-] efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n = 6 (fêmeas).

### 5.3.3.2 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração

Na Tabela 5 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração e evolução ponderal, avaliados durante os 14 dias de observação.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que, após tratamento com dose única da bixina, percebe-se diminuição significativa no consumo de água nos experimentos realizados com a dose de 2000 mg/kg quando, comparado ao grupo controle. No que se refere a fração oleosa, percebe-se diminuição significativa na média do consumo diário da água e da ração quando comparados ao grupo controle.

**Tabela 5 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa sobre o consumo de água e ração e evolução ponderal dos camundongos fêmeas.**

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	36,92±2,50	44,23±5,21	29,02±1,16	32,23±1,41
Bixina	2000	22,50±2,54 <sup>a</sup>	17,21±1,38 <sup>a</sup>	27,14±0,70	31,83±0,39
O.E.U.	2000	30,45±3,04	17,89±1,25 <sup>a</sup>	28,23±1,52	33,25±1,21

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; <sup>a</sup>p<0,05 comparado com grupo controle por teste ANOVA *oneway*, seguido de pós teste de Dunnet.

### 5.3.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Nenhuma alteração significativa no índice desses órgãos foi observada entre os grupos de animais controle e tratados nos dois experimentos realizados com a dose de 2000 mg/kg (Tabela 6).

**Tabela 6 -Efeitos do tratamento agudo (v.o.) com bixina e fração oleosa nos índices dos órgãos de camundongos fêmeas.**

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Controle	----	4,07±0,21	60,33±2,07	11,76±0,78	4,05±0,42	5,86±0,67
Bixina	2000	4,48±0,14	58,50±1,62	12,28±0,65	4,75±0,20	7,11±0,99
O.E.U.	2000	3,97±0,41	54,38±2,46	10,19±0,77	4,13±0,25	6,03±0,96

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; <sup>a</sup>p<0,05 comparado com grupo controle por teste ANOVA *oneway*, seguido de pós teste de Dunnet.

Na tentativa de defender o organismo contra o ataque de patógenos o sistema imune e os órgãos são os principais defensores do corpo. O sistema imune pode estar afetado caso ocorra degeneração ou atrofia de órgãos imune. Como exemplo disso, temos o baço que serve como reservatório de sangue e tem a função de purificá-lo juntamente com a linfa, no entanto se o baço sofre algum dano ou é removido, o indivíduo ficara mais susceptível a infecções (YU et al., 2007). A função imunológica pode também ser diminuída quando realizada a timectomia (retirada do timo), uma vez que o timo é o responsável pelo desenvolvimento de tecidos linfóides e no estabelecimento das funções imune (MILLER et al., 1962; MILLER et al., 1962a; MILLER et al., 1962b; MILLER, 1964).

Entretanto, o tratamento com a bixina e a fração oleosa, não provocaram alterações nesses índices, sugerindo que estas substâncias não possuem atividade imunodepressora.

#### 5.3.3.4 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A investigação dos efeitos toxicológicos da bixina e fração oleosa prosseguiram-se também com avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Nenhuma alteração significativa foi observada nos parâmetros bioquímicos em ambos os grupos, quando comparados com o controle (Tabela 7).

**Tabela 7 - Efeitos do tratamento agudo com bixina ou fração oleosa nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos fêmeas.**

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	-	183,6 ± 7,88	46,40 ± 9,81	45,00 ± 2,75	0,30 ± 0,03
Bixina	2000	160,7 ± 13,08	50,63 ± 8,83	48,71 ± 2,58	0,29 ± 0,04
O.E.U.	2000	164,0 ± 9,86	52,50 ± 6,04	48,50 ± 3,52	0,25 ± 0,02

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado com grupo controle por teste ANOVA *oneway*, seguido de pós teste de Dunnet.

Uma grande quantidade de enzimas está concentrada nos hepatócitos que são celular metabolicamente complexas. Para avaliação da função hepática são avaliadas a função de duas enzimas: a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Na lesão hepática ocorre extravasamento dessas enzimas para o plasma sendo úteis para o diagnóstico e monitoramento desse tipo de lesão, tornando-se os principais marcadores de lesão celular, especialmente hepatopatias (HENRY, 2008).

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de uréia e creatinina. A uréia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da uréia hepática. É filtrada pelos glomérulos e reabsorvida nos dutos coletores juntamente com a água (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996). É recomendado que a aplicabilidade das determinações da uréia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da uréia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina.

Os dados desse estudo sugerem que a bixina e a fração oleosa possuem baixa toxicidade hepática e renal, nas doses avaliadas.

Com relação à avaliação hematológica, não houve nenhuma alteração significativa na série vermelha para nenhum dos grupos, quando comparados com o controle (Tabela 8 e 9). Esses dados inferem que os tratamentos com bixina e fração oleosa não induzem toxicidade em nível de células sanguíneas, bem como na hematopoiese.

**Tabela 8 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas.**

Grupos	Dose (mg/kg)	Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Controle	-	9,32±0,10	13,95±0,71	50,45±2,24
Bixina	2000	9,71±0,49	13,78±0,52	53,21±2,74
O.E.U.	2000	9,89±0,44	14,75±0,52	53,48±4,92

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado com grupo controle por teste ANOVA *oneway*, seguido de pós teste de Dunnet.

**Tabela 9 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas. (continuação).**

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM ( $\text{fm}^3$ )	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Controle	-	53,83±1,81	14,68±0,968	28,07±2,36
Bixina	2000	55,19±2,54	14,48±1,03	26,34±1,63
O.E.U.	2000	53,47±2,61	15,03±0,82	28,82±2,97

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média; <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado com grupo controle por teste ANOVA *oneway*, seguido de pós teste de Dunnet.

Na contagem diferencial de leucócitos o tratamento com a bixina não houve nenhuma alteração significativa na contagem dos linfócitos e dos neutrófilos em comparação com os grupos controle, Tabela 10.

**Tabela 10 - Efeitos do tratamento agudo com bixina e fração oleosa nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos fêmeas (continuação).**

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos totais ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
			Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Controle	-	$5,9 \pm 0,19$	$76,7 \pm 0,49$	$19,7 \pm 0,76$	$2,7 \pm 0,49$	$1,0 \pm 0,52$
Bixina	2000	$5,7 \pm 0,87$	$85,3 \pm 2,99$	$11,0 \pm 2,77$	$3,11 \pm 0,56$	$0,44 \pm 0,34$
O.E.U.	2000	$6,8 \pm 1,27$	$83,6 \pm 2,97$	$17,17 \pm 4,35$	$2,2 \pm 0,31$	$0,50 \pm 0,22$

Dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média; <sup>a</sup> $p < 0,05$  comparado com grupo controle por teste ANOVA *oneway*, seguido de pós teste de Dunnet.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO*

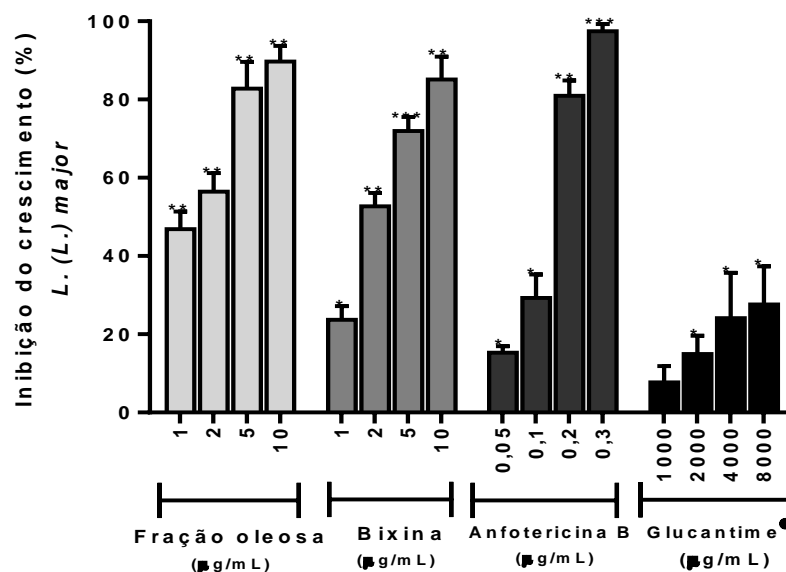
##### 5.4.1 Avaliação da atividade antipromastigota de bixina e fração oleosa *in vitro*

A atividade leishmanicida da bixina, fração oleosa, Glucantime® e Anfotericina B sobre as formas promastigotas de *L. major* estão representadas nas figuras 14.

Analisando os dados de inibição de crescimento, observou-se que a bixina inibiu o crescimento das culturas de *L. major* em todas as concentrações analisadas, de maneira dose dependente, apresentando para as concentrações de 1; 2; 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  os valores de inibição de crescimento de 23,71 ( $\pm 6,111$ ); 52,69 ( $\pm 5,890$ ); 71,98 ( $\pm 6,218$ ) e 85,13 ( $\pm 10,04\%$ ), respectivamente. Igualmente observou-se que a fração oleosa inibiu o crescimento das culturas de *L. major* em todas as concentrações analisadas, também de maneira dose dependente, apresentando para as concentrações de 1; 2; 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  os valores de inibição de crescimento de 46,87 ( $\pm 7,800$ ); 56,47 ( $\pm 8,263$ ); 82,77 ( $\pm 11,93$ ); 89,74 ( $\pm 6,902\%$ ), respectivamente.

Com relação ao tratamento com a Anfotericina B®, observou-se inibição significativa no crescimento das culturas quando comparadas ao controle em todas as concentrações avaliadas. A avaliação do tratamento com o Glucantime® demonstrou que, a partir da concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , começou a existir inibição no crescimento da cultura ( $14,98 \pm 4,66\%$ ). Para maiores concentrações, as taxas de inibição de crescimento também aumentaram, sendo de 24,15 ( $\pm 11,58$ ) e 27,65 ( $\pm 9,73\%$ ) para as concentrações de 4000 e 8000  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 14 – Inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania major* na presença de diferentes concentrações do concentrado de bixina, fração oleosa, Anfotericina B e Glucantime®.



As formas promastigotas de *L. major* ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , na presença das substâncias avaliadas. O gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*  $P \leq 0,05$  \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$  (Significância em relação ao controle usado).

A partir dos dados de inibição de crescimento apresentados por todas as espécies estudadas frente à bixina, fração oleosa, Anfotericina B® e Glucantime®, foram calculadas as concentrações que inibe o crescimento dos parasitas em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). Estes dados de  $\text{IC}_{50}$  estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração inibitória de 50% do crescimento ( $\text{IC}_{50}$ ) de promastigotas de *Leishmania major* na presença da bixina, fração oleosa, Anfotericina B e Glucantime®.

<i>L. major</i>	Bixina (µg/mL)	Fração Oleosa (µg/mL)	Anfotericina B (µg/mL)	Glucantime® (µg/mL)
$\text{IC}_{50}$ (M $\pm$ e.p.m)	$2,16 \pm 1,67$	$1,26 \pm 0,75$	$0,13 \pm 0,008$	$12,57 \pm 6,82$

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (M  $\pm$  e.p.m) de três experimentos independentes.

As primeiras análises da atividade biológica da bixina e da fração oleosa demonstraram expressiva atividade sobre as formas promastigotas da *L. major* em todas as concentrações analisadas, com perfil dose dependente. A fração oleosa superou o efeito da droga de referência (Anfotericina B®) em algumas concentrações testadas. Mediante estes resultados afirma-se que a atividade antipromastigota encontrada caracteriza-se tanto como

atividade leishmaniostática quanto leishmanicida, pois além de inibir o crescimento das culturas, observou-se morte dos parasitas nas maiores concentrações avaliadas.

Resultado semelhante foi anteriormente relatado quando testado um extrato hidroalcoólico das sementes desta planta apresentando um valor de  $IC_{50}$  de 9,1  $\mu\text{g/mL}$  contra amastigotas (GARCIA et al., 2011). Corroborando com nossos dados, um estudo conduzido por Monzote et al. (2013), testaram o óleo essencial das sementes de *B.orellana* que causou inibição do crescimento de amastigotas com valores de  $IC_{50}$  de 8,1  $\mu\text{g/mL}$  e um índice de seletividade, de 7  $\mu\text{g/mL}$ . Pelo cálculo de  $IC_{50}$ , Almeida e colaboradores (2012), verificaram que o extrato da folha do urucum (0,14 mg/mL) foi o que apresentou melhor atividade, seguido pelo extrato de caule do urucum (0,21 mg/mL) e raiz do mesmo (0,44 mg/mL).

Em 2007, Cruz e seus colaboradores testaram a fração oleosa extraída do urucum nas concentrações de 10, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ , e verificou a inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. Amazonenses* em 22, 88,9, 98,1 e 100%, respectivamente, gerando uma  $IC_{50}$  de 29,02  $\mu\text{g/mL}$ . Também observou um efeito antileishmania da fração oleosa sobre as formas promastigotas de *L. chagasi* evidenciando uma inibição de 36,8 e 100% do crescimento nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, gerando uma  $IC_{50}$  de 8,5  $\mu\text{g/mL}$ .

A atividade antileishmania do fármaco de referência Glucantime<sup>®</sup> foi avaliada contra formas promastigotas de *L. major*. Verificou-se que em concentrações de até 2000 mg/mL essa droga não exerceu atividade antileishmania significativa contra essas formas promastigotas. Portanto, a bixina e a fração oleosa são expressivamente mais tóxicas para as formas promastigotas de *L. major* do que o Glucantime<sup>®</sup>. Contudo, é relatado que o Glucantime<sup>®</sup> é pouco tóxico para as formas promastigotas de *Leishmania*, tendo uma ação mais significativa sobre as formas amastigotas (CROFT et al., 2006).

Já a Anfotericina B<sup>®</sup> exibiu uma expressiva atividade antipromastigota sobre todas as espécies analisadas, superando a atividade das substâncias sob estudo, corroborando com a literatura, onde já foi relatado que a AnfotericinaB<sup>®</sup> apresenta citotoxicidade expressiva sobre promastigotas de *Leishmania sp.* (SAHA et al., 1986; ESCOBAR et al., 2002; KUMAR et al., 2012).

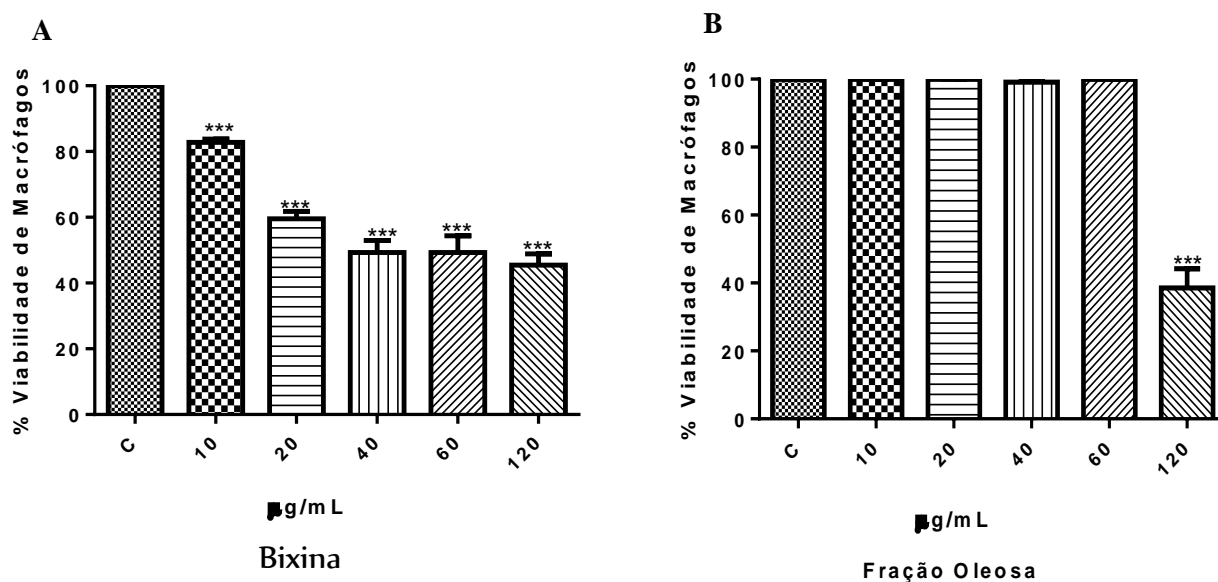
#### 5.4.2 Índice de citotoxicidade e Índice terapêutico para bixina e fração oleosa

Em virtude da bixina e da fração oleosa apresentarem atividade antileishmania significativa, expressa em baixos valores de  $IC_{50}$ , e visando o uso terapêutico dessas

substâncias em estudo, a avaliação da atividade citotóxica delas contra células de mamíferos se fez indispensável para comprovação de sua segurança terapêutica. Cinco concentrações de cada substância em estudo foram avaliadas (10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL e 120 µg/mL) pelo método de exclusão do azul de Trypan.

A bixina apresentou uma citotoxicidade significativa em todas as doses testadas sobre os macrófagos murinos, conforme Figura 15A. A  $CC_{50}$  na presença de diferentes concentrações da bixina foi estimada em 59,51 µg/mL. No entanto, a fração oleosa apresentou citotoxicidade para os MØs apenas na maior concentração avaliada (120 µg/mL) (Figura 15B) gerando uma  $CC_{50}$  estimada em 111,41 µg/mL (Tabela 12).

Figura 15 – Citotoxicidade da bixina (A) e da fração oleosa (B) para macrófagos peritoneais de camundongos suíços.



Elaboração própria.\*\*\*  $P \leq 0,0001$ . Os macrófagos ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubados por 24h em estufa de  $CO_2$  a  $37^\circ C$  na presença de diferentes concentrações da bixina e da fração oleosa e posteriormente quantificados sob microscopia óptica na presença de azul de Trypan. O gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata.

Na tabela 12, está demonstrado o índice terapêutico *in vitro* da bixina e fração oleosa em relação a *L. major*. Os valores de  $CC_{50}$  utilizados para gerar esse índice foram obtidos nos ensaios de exclusão do azul de Trypan.

Tabela 12 - Índice terapêutico *in vitro* da bixina e da fração oleosa para *L. major*.

Tratamento	$IC_{50}$ µg/mL	$CC_{50}$ µg/mL	Índice terapêutico ( $CC_{50} / IC_{50}$ )
	<i>L. major</i>	Macrófagos	
Bixina	2,16	59,51	27,55
Fração Oleosa	1,26	111,41	88,42

Particularmente, a avaliação da citotoxicidade de moléculas candidatas ao tratamento das leishmanioses em MØs é importante, uma vez que são essas as principais células parasitadas por parasitos do gênero *Leishmania* em seu hospedeiro vertebrado (KAMHAWI, 2006).

Os resultados mostram que as substâncias apresentam uma toxicidade expressivamente maior para os parasitas do que para os macrófagos murinos. Destacando-se principalmente a fração oleosa, que foi 88,42 vezes mais tóxica para *L. major* do que para macrófagos murinos. Resultados semelhantes também foram observados quando testada a fração oleosa do urucum para *L. chagasi* e *L. amazonensis*, sendo 8,73 e 2,57 vezes mais citotóxicas para o parasita do que para o macrófago murino (CRUZ et al., 2007).

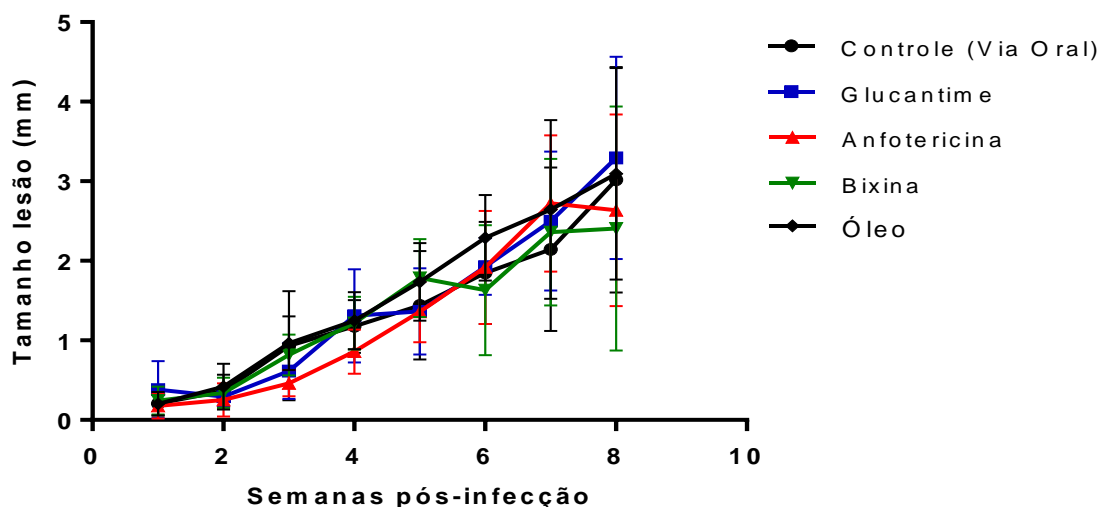
Dada a importância da síntese dos esteróis para a viabilidade celular do parasito e que há indícios na literatura de que o receptor para LDL é conservado em toda ordem Kinetoplastida (BASTIN et al., 1996), pretensiosamente sugere-se que a ação da fração oleosa deve-se a sua composição rica em ácidos graxos, unidades formadoras de esteróis, uma vez na corrente sanguínea do hospedeiro a mesma será utilizada como fonte exógena de colesterol pelo parasito exercendo sua ação leishmanicida e leishmaniostática já comprovadas nesses estudos *in vitro*.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VIVO*

Após observação da significativa atividade da bixina e em especial da fração oleosa *in vitro*, tanto sobre formas promastigotas quanto sobre macrófagos infectados com *L. major*, foi realizada a análise de sua atividade *in vivo*, em modelo experimental de leishmaniose cutânea. Utilizou-se nesses testes camundongos suíços infectados com *L. major*, sendo o tratamento com as substâncias em estudo realizado por via oral. As drogas de referência Glucantime<sup>®</sup> e Anfotericina B<sup>®</sup> foram administradas por via intraperitoneal, visto que em modelo murino, elas não apresentam-se eficazes por via oral (DEMICHELI et al., 2004).

A análise comparativa entre os tratamentos realizados mostrou que, as substâncias em estudo não reduziram o tamanho das lesões dos animais em relação ao controle (tratado com veículo), não tendo significância estatística, figura 16.

Figura 16– Efeito do tratamento com a bixina e fração oleosa no tamanho de lesão de camundongos suíços infectados com *L. major*.

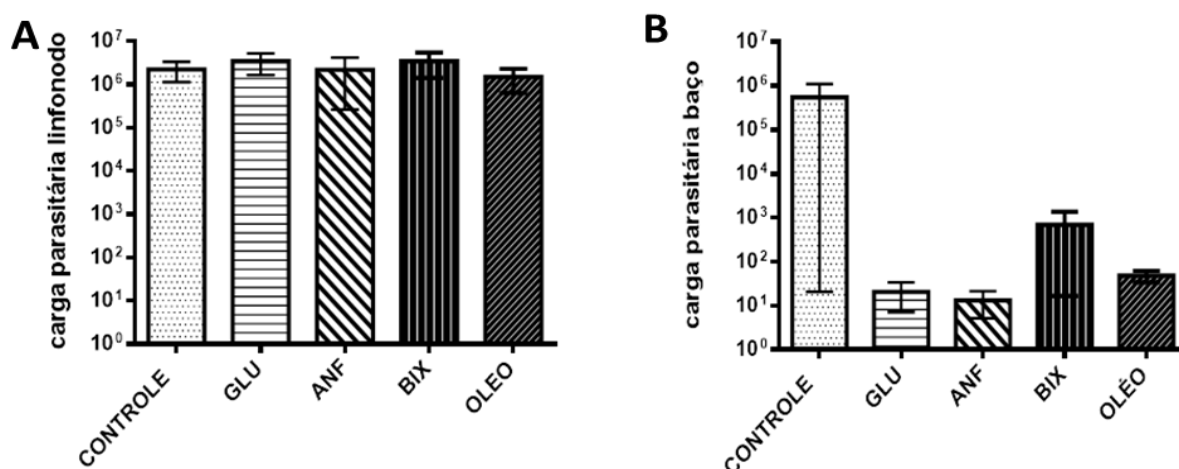


Os camundongos suíços foram infectados com *L. major* e tratados durante oito semanas. A espessura da pata foi medida semanalmente, e a diferença entre a espessura das patas correspondeu ao tamanho da lesão. O gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média de cada grupo.

### 5.5.1 Avaliação da carga parasitária

As substâncias sob estudo e as drogas de referências utilizadas não conseguiram reduzir significativamente a carga parasitária nem do linfonodo poplíteo nem do baço, isso quando comparados ao perfil obtido no grupo controle do experimento (Figuras 17A e B).

Figuras 17– Carga parasitária do linfonodo poplíteo (A) e do baço (B) dos camundongos suíços infectados *L. major*.



Após o tratamento, os camundongos infectados com *L. major* foram eutanasiados e a carga parasitaria do linfonodo (A) e do baço (B) foram analisadas através de diluição sucessiva. Dados são representativos da média de cinco animais por grupo.

Foi possível inferir que, os resultados obtidos *in vivo* podem estar relacionados com dois fatores, o primeiro deles seria o tipo da linhagem utilizada, tendo em vista que os camundongos suíços são uma linhagem heterogênea e resistente a inoculações quando comparadas com as linhagens de BALB/c que são linhagens homogêneas. Estudos com camundongos BALB/c realizados por Monzote e colaboradores (2013), evidenciaram eficácia terapêutica significativa do óleo essencial das sementes de urucum contra a leishmaniose cutânea. Croft e colaboradores (2006), afirmam que os modelos utilizando camundongos BALB/c são extensivamente utilizados devido à susceptibilidade desse camundongo a diversas espécies de *Leishmania* causadora de *Leishmania tegumentar*, e por ser uma linhagem cuja cura é excepcionalmente difícil, mesmo utilizando as drogas padrão.

O segundo fator que possa ter influenciado as respostas dos experimentos *in vivo*, seria a solubilidade da fração oleosa tendo em vista que, fármacos muito hidrofílicos são incapazes de atravessar a membrana celular e fármacos muito hidrofóbicos são insolúveis nos líquidos aquosos, portanto para que ocorra a absorção de um fármaco é preciso que ele seja hidrofóbico, entretanto deve ter certa solubilidade em soluções aquosas (STOLF et al., 2001).

## 6 PESPECTIVAS

Um caminho possível para ultrapassar estes problemas consiste em desenvolver novas formulações que possam direcionar a droga para os macrófagos, uma vez que, durante a infecção por *Leishmania*, os parasitas são fagocitados por macrófagos e dentro destas células se tornam amastigostas, que iludem os vários mecanismos de defesa do hospedeiro e facilmente multiplicam-se no compartimento ácido de fagolisossomas (OLIVIER et al., 2005).

Nesse contexto os lipossomas (estruturas vesiculares que devido às suas propriedades anfifílicas, podem incorporar tanto substâncias hidrofílicas como lipofílicas), assim como a *Leishmania*, tem a tendência natural de serem capturados pelas células do sistema fagocitário mononuclear direcionando o fármaco para os órgãos alvo da infecção: fígado, baço e medula óssea, melhorando o aproveitamento das substâncias encapsuladas, podendo assim, a substância liberada agir diretamente sobre o parasito (FREZARD et al., 2005).

## 7 CONCLUSÕES

Na extração hexânica obteve-se um produto oleoso vermelho escuro que foi denominado de “fração oleosa” e seus ácidos graxos foram quantificados e identificados por CG-DIC e CG-EM, sendo o ácido linoleico o majoritário nesse composto. A bixina um resíduo sólido de coloração avermelhada foi obtida pela extração clorofórmica e identificada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Nos experimentos de toxicologia com *A. salina* a bixina e a fração oleosa extraídos das sementes da *B.orellana* L. foram considerados tóxicos contra esse molusco. Já nos experimentos de toxicologia aguda para a bixina e fração oleosa infere-se baixa toxicidade frente eritrócitos de camundongos suíços e baixa toxicidade após administração aguda na dose de 2000 mg/mL.

Verificou-se que a bixina e a fração oleosa apresentaram atividade antileishmania (leishmaniosstática e leishmanicida) sobre formas promastigotas de *Leishmania major*. As substâncias testadas possuem uma expressiva atividade sobre as formas promastigotas da *L. major*, evidenciando uma maior ação quando testada com a fração oleosa, chegando a superar o efeito do fármaco de referência, a Anfotericina B<sup>®</sup> em algumas concentrações testadas.

Constatou-se que a bixina e a fração oleosa apresentaram uma toxicidade expressivamente maior para os parasitos do que para os macrófagos murinos, destacando-se principalmente que a fração oleosa é mais tóxica para *L. major* do que para macrófagos murinos.

A bixina e a fração oleosa não apresentaram um efeito antileishmania *in vivo*, em camundongos suíços infectados com *L.major*, uma vez que não foi observada diminuição da carga parasitária nos animais tratados via oral com estas substâncias.

## REFERÊNCIAS

- AGNER, A. R. et al. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1687-1693. 2004.
- ALMEIDA, R. N. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- Almeida, C. R. et al. "Evaluation of antiparasitic activity of hydroethanolic extracts from root, stem and leaf of *Bixa orellana* L. on *Leishmania* The ScientificWorld Journal 11 amazonensis samples," **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.10, n. 2, p. 384-391. 2012.
- ALONSO, Jorge. **Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos**. Rosario: Esteban Oscar Mestre, 2004.
- AMATO, V.S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.77, p. 266-274, 2007.
- AMORIM, F. M. et al. Morita-Baylis-Hillman adducts shows in vitro activity against *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 29-38. 2013.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química dos alimentos** - teoria e prática. Viçosa, MG: UFV, 1995.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE BIOMEDICINA MOLECULAR. **Fitoterapia**. Disponível em: <[http://www.medicinacomplementar.com.br/estrategia\\_fitoterapia.asp](http://www.medicinacomplementar.com.br/estrategia_fitoterapia.asp)>. Acesso em: 16 abr. 2012.
- BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, 1996.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- BANDONI, A. L. et al. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. **Lloydia**, v. 35, n. 1-4, p. 69-80, 1972.
- BARBOSA FILHO, J. M. et al. Teor de bixina em quatro variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas na Paraíba. **Rev Bras Farmacogn**, v. 7, n. 8, p. 41-47. 1998.
- BASTIN, P. et al. An M(r) 145000 low-density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order. **Mol Biochem Parasitol**, v. 76, n. 1-2, p. 43-56. 1996.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission. Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**. v. 4, p. 601-609, 2004.

BORGES, B. K. A. et al. Avaliação do nível de conhecimento e de atitudes preventivas da população sobre a leishmaniose visceral em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v. 24, n. 4, p. 777-784, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da leishmaníase Visceral**. Série A normas e manuais. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico: Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública**. Ano 10, n. 2, 2010.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral**. 2011b. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv\\_casos\\_05\\_09\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lv_casos_05_09_11.pdf)> Acesso em: 02 Abr 2012

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de epidemiologia. Programa de Zoonoses Região Sul. **Manual de Zoonoses**. Coordenação de controle de zoonoses e animais. 1 ed. Brasília, 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Paraíba**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011c.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

\_\_\_\_\_. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para Avaliação e Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília, DF 2003.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. **International Journal for Parasitology**. v.3 1, p. 1311-1320, 2001.

CALDAS, J.P.A. **Investigação da Atividade Antileishmania e Citotóxica das Neolignanas Burchelina, Grandisina e Licarina A**. 2010, 106f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais – Farmacologia e Química) Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. 2010.

CALLA-MAGARINOS, J. et al. An Alkaloid Extract of *Evanta*, Traditionally Used as Anti-leishmania Agent in Bolivia, Inhibits Cellular Proliferation and Interferon- $\gamma$  Production in Polyclonally Activated Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, p. 251-258, 2009.

CAMACHO, M. R. et al. Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **J Ethnopharmacol**, v. 89, p. 185-191. 2003.

COSTA, C.K. **Estudo fitoquímico de *Bixa orellana*, Bixacea e aplicação de óleo em formulação cosmética**, Curitiba, 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPR.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr Pharm Design**, v. 8, p. 319-342. 2002.

CRUZ, A. A. S. Atividade Citotóxica de Bixaorellana (BIXACEAE) sobre formas Promastigotas de Leishmania e Macrófagos Murinos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL FESBE, XXII. **Anais...**, 2007, Águas de Lindóia-São Paulo. Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE, 2007.

DEMICHELI, C. et al. Oral delivery of meglumineantimoniate- $\beta$ -ciclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.1, p.100-103, 2004.

DEMICHELI, C.P.; FREZARD, F.J.G. Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v.6, p.24-30, 2005.

DIAS, C. N. S. **Avaliação da atividade antileishmania de produtos naturais obtidos de *dephyllanthusacuminatus* e de *hyptismacrostachys***. 2014 Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2014.

ESCOBAR, P. et al. Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. **ActaTropica**. v. 81, p. 151-157, 2002.

EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 13.ed. London: BeillièreTindall, 1992.

FIGUEREDO, Climério Avelino. **Fitoterapia I, II** (mimeografado). Núcleo de Estudo e Pesquisas Homeopáticas e Fitoterápicas – DFP/CCS/UFPB, 2011.

FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, p. 85-87, 2001.

FLEISCHER, T. C. et al. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of Bixa Orellana. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136-138. 2003.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DONCKER, S.; DUJARDIN, J.; AUWERA, G. V. Phylogeny of Leishmania species based on heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 238-245, 2010.

FRANCO, C. F. de O. et al. **Cultivo do urucuzeiro: técnicas e manejo**. João Pessoa: EMEPA-PB, 2001.

\_\_\_\_\_. **Urucum: sistema de produção para o Brasil**, João Pessoa: EMEPA-PB, 2008.

FREGA, N.; MOZZON, M. Identification and Estimation of Tocotrienols in the Annatto Lipid Fraction by Gas Chromatography Mass Spectrometry. **Journal of The American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 12, p. 1723-1727, 1998.

FRÉZARD F.; SCHETTINI D. A.; ROCHA O. G. F.; DEMICHELI C. LIPOSSOMAS: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS, APLICAÇÕES NA QUIMIOTERAPIA À BASE DE ANTIMÔNIO. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, 511-518, 2005

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M.B.; RANKIN, S.A. Comparison of Volatile Compounds in Water and Oil-Soluble Annatto (Bixa Orelana) Extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2010-2015, 2002.

GARCÍA, M. et al. Effect of Bixaorellana against Leishmaniaamazonensis. **Forsch Komplementmed**, v. 18, p. 351-353. 2011.

GIRON, L. M. et al. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 2-3, p. 173-187, 1991.

GIULIANO, G, ROSATI, C. AND BRAMLEY P. M. To Dye or Not to Dye: Biochemistry of Annatto Unveiled. **Trends in Biotechnology**, vol. 21, n.12 513-516, dec. 2003.

GLOBAL HEALTH OBSERVATORY.**Map Gallery**.WHO, 2014. Disponível em: <<http://gamapserv.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>>. Acesso em: 29 mar. 15.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin**. n. 26, p. 293-307, 2012.

GRINBERG, L. N. et al. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 9, p. 973-978, 1997.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clinical Nephrology**, v. 46, p. 273- 6, 1996.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**14:229- 243. 2001.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. Manole, 2008.

HOCQUEMILLER, R. et al. A isolation an synthesis of espintanol, a new antiparasitic monoterpene. **J. Nat. Prod.**, v. 54, n. 2, p. 445-452, 1991.

IPEA. **Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos.** Brasília: IPEA, 2011. Disponível em: <[http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td\\_1607.pdf](http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td_1607.pdf)>. Acesso em: 02Mar. 2012

JARAMILLO, M.C. et al. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annon amurica* tapericarp. **Fitoterapia**, v. 71, p. 183-186, 2000.

JEAN-MORENO, V. et al. Leishmaniadonovani: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**. v.112, p. 21-30, 2006.

KAMHAWI, S. Phlebotominae sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. **Trends in Parasitol**, v. 22, n. 9, p. 439-445. 2006.

KANG, C. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilemanomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 85-90, 2009.

KELLY, D. R. et al. NMR, MS and X-Ray Crystal Structure Determination of the Bixin Family of Apocarotenoids. **J Chem Res**, n. S, p. 446-447. 1996.

KLASSEN, C. O.; WATKINS, J. B. **Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos de Casarett e doulls's.** 5. ed. Lisboa: McGraw-Hill, 2001.

KUMAR, S.; TRIPATHY, P. K.; JENA, P. K. Ethnobotany and bioactive compounds in leaf of *Bixaorellana* L. and its toxicity to *Artemiasalina* L. **Plant Science Research**. v. 34,n. 1-2, p. 93-96, 2012.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. Appied. **Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 151-162, 2005.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; DE CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 1, p. 73-77, 2007.

MAIA, E. L. **Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição química em ácidos graxos e aminoácidos de peixe em água doce.** 1992. Tese (Doutorado em Bioquímica) Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1992.

MATOS, F. J. A. Ácidos graxos e algumas oleaginosas tropicais em ocorrência no nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 15, n. 3, p. 181-185, 1992.

MARMION, D. M. HANDBOOK OF US. COLORANTS, FOOD, DRUGS, COSMETICS and MEDICAL DEVICES, 3a ed., **JohnnWiley & Sons**, Inc.120-122, 1991.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJ Med.** doi:10.1093/qjmed/hct116.2013.

MEYER, N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica.** v. 45, p. 31. 1982.

MILLER, J. F. A. P. The thymus and the development of immunologic responsiveness. **Science,** v. 144, p. 1544-51, 1964.

\_\_\_\_\_. Role of the thymus in transplantation immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 99, p. 340-354, 1962a.

\_\_\_\_\_. Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. **Proceedings of the Royal Society,** v. 156, p. 410-428, 1962b.

MILLER, J. F. A. P.; MARSHALL, A. H. E.; WHITE, R. G. The immunological significance of the thymus. **Advances in Immunology,** v. 2, p. 111-162, 1962.

MILLIKEN, W. **Plants for malaria for fever, medicinal species in Latin America.** London: The Royal Botanical Garden. 1997.

MISHRA B.B. et al. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia** v. 80, p. 81-90, 2009.

MONZOTE, L. et al. Antileishmanial Activity of the Essential Oil from *Bixa orellana*. **Phytother Res.** v. 28, n. 5, p. 753-8. 2013.

NÉRIS, P. L. N. **Neolignana Licarina A: Investigação Da Atividade Biológica Sobre Leishmania Sp.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. 2012.

NÉRIS, P. L. N et al. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania* (*Leishmania*) major associated with immunomodulation in vitro. **Exp Parasitol,** v. 135, p. 307-313. 2013.

NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica.** São Paulo: Atheneu. 2006.

NIETO, J. et al. La Leishmaniosis canina. 1a of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 39, p. 1234-1239, 1995.

OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol Today.** v.9 p. 323-328. 1997

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **ActaTropica.** v. 118, p.87-96, 2011.

OLIVEIRA, M. R. et al. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. **Parasitology.** v. 131, n. 5, p. 477-488, 2005.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **ClinMicrob Rev.** v. 18, p. 293-305. 2005.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L. et al. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v.30, p. 325-329, 2007.

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

OTERO, R. FONNEGRA, S. L. JIMÉNEZ et al., “Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: traditional use of plants,” **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 71, no. 3, pp. 493–504, 2000.

PARRA, A. L. et al. 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**, v. 8, p: 395-400, 2001.

PAULA C. D. R. et al. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaníase tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 365-371, 2003.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. **Drug Resist Updat.** v. 9, p. 26-39, 2006.

PETERS, N.C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sandflies. **Science**, v.321, p.970-974, 2008.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria.** v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaníase: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** v. 7, p. 581-96, 2007.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis.** 2. ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, 2001.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. In vitro antileishmanial properties. In: SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment: a challenge that remains – a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

ROBBINS, P. **Marketing e Post harvest Research in Eastern and Central Africa- Tropical Commodities and their Markets- Part Two – Commodities A-B**, published by Twin

1995. Disponível em: <<http://www.foodnet.cgiar.org/market/tropcomm/part2ab.htm>>. Acesso em: 02 mar. 2015.

ROCHA, J. C. **Comportamento de camundongos suíços frente à infecção por *Leishmania* (v.) *Braziliensis* e/ou *leishmania* (l.) *Amazonensis***. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2014.

ROJAS de ARIAS, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; FALCÃO, A. Feeding deterrence and insecticidal effects of plant extracts on *Lutzomyia longipalpis*. **Phytother. Res.**, v. 6, p. 64-67, 1992.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, p. 195-200, 1986.

SANTOS JÚNIOR, H. M. et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment: a challenge that remains – a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. **Phytother. Res.**, v. 10, p. 375. 1996.

SILVA, F. C. P.; FRANCO, C. F.O. **Urucuzeiro uma alternativa de agronegócio**. João Pessoa: EMEPA - PB, 2000.

SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, p. 173-180, 2004.

STOLF, A.; DREIFUSS, A.; LÍVEROVIEIRA, F. **III Curso de Verão em Farmacologia**. URPR. 2001.

TIUMAN, T.S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**. v.15, p.e525-e532, 2011.

TRUITI, M. C. T. et al. Antiprotozoal and molluscicidal activities of live Brazilian plants. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 1873-1878. 2005.

VAN MIERT, S. et al. Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, n. 3, p. 661-669, 2005.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.C. (orgs). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Media centre- **Leishmaniasis**- Fact sheet n. 375- Febuary, 2013. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

YABIKU, Y. H.; TAKAHASHI, M. Y. Determinação de Bixina em semente de Urucum: Estudo Colaborativo. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz** . v. 52, n. 1, p. 231-236, 1992.

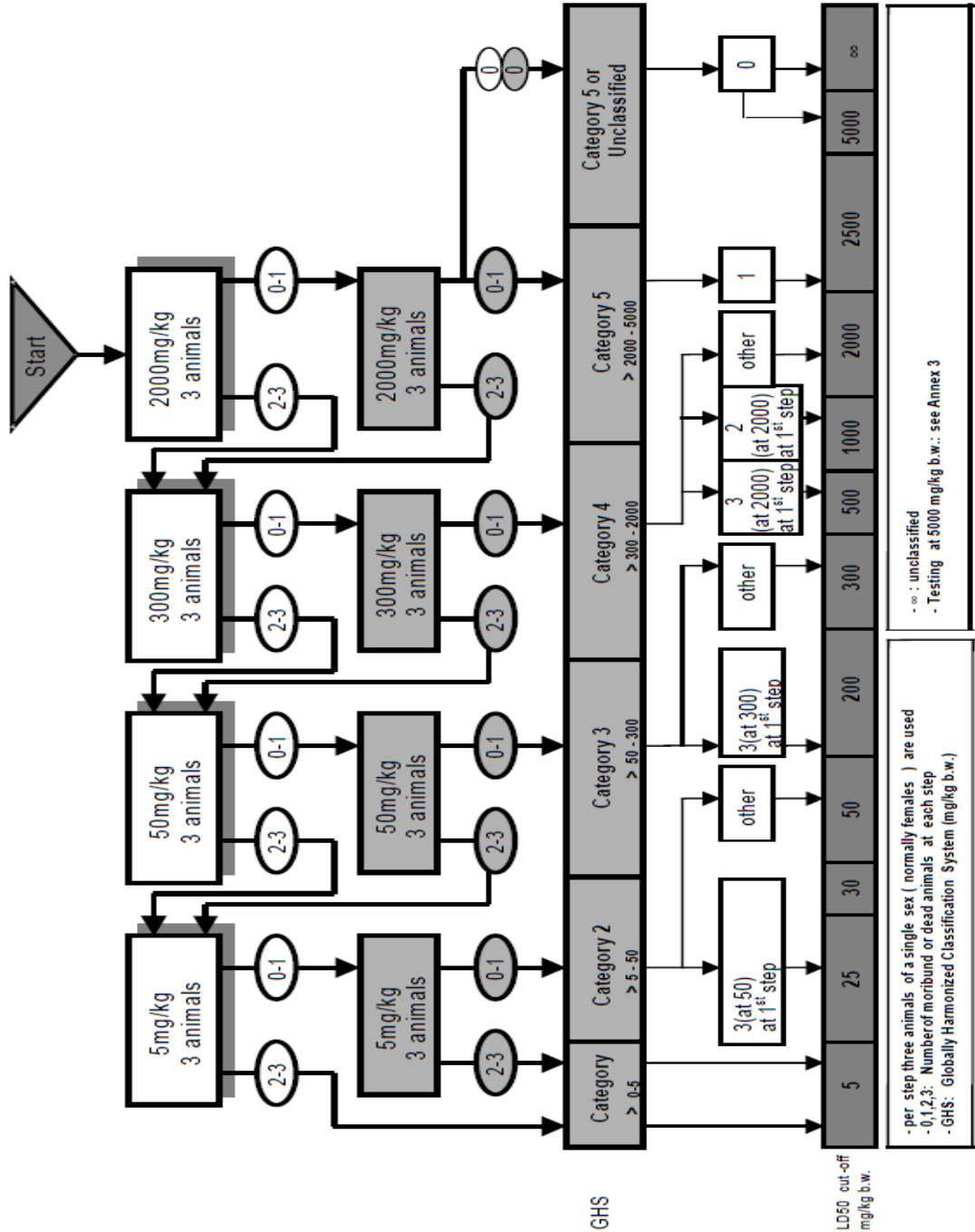
YU, F. et al. Effects of Hydrocoty lesibthorpioides extract on transplanted tumors and immune function in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 166-71, 2007.

ZHANG, A. et al. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, n. 4, p. 383-394, 1997

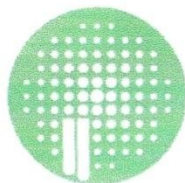
## **ANEXOS**

ANEXO 1 – OECD “Guidelines for testing of chemicals”

ANNEX 2d: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 2000 MG/KG BODY WEIGHT



## ANEXO 2– Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB (CEUA)

**PgPNSB**Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL  
CERTIDÃO**

João Pessoa, 31 de agosto de 2011

CEPA Nº. 0806/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Prof(a): Dr(a): José Maria Barbosa

Orientando(a) : Daniela de Araújo Vilar

Departamento/Setor: LTF/CCS

Ref.:DESENVOLVIMENTO DE UM FITOTETÁPICO ATRAVÉS DO ESTUDO  
FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO OLEOSA DAS SEMENTES DE URUCUM (*Bixa  
orellana* L.) BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia  
Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e  
APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 384 animais ratos wistar e camundongos suíços

Período: Agosto 2011 a Julho 2012.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB.