

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE –
UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Ana Paula Aquistapase Dagnino

**Atividade Leishmanicida de Extratos e
Compostos de Espécies de *Hypericum***

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2015

Ana Paula Aquistapase Dagnino

Atividade Leishmanicida de Extratos e Compostos de Espécies de *Hypericum*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Porto Alegre

2015

Catálogo na Publicação

Aquistapase Dagnino, Ana Paula

Atividade leishmanicida de extratos e compostos de espécies de *Hypericum* / Ana Paula Aquistapase Dagnino. -- 2015.

79 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.

Orientador(a): Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão.

1. Leishmanicidal activity. 2. *Hypericum*. 3. *Leishmania (L.) amazonensis*. 4. Macrophages. 5. Nitric oxide. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LISTA DE ABREVIATURAS

CC₅₀ – Concentração Citolóxica para 50% das células
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HCl – Ácido Clorídrico
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
CI₅₀ – Concentração Inibitória para 50% das células
CL₅₀ – Concentração Letal para 50% das larvas
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
IC – Intervalo de confiança
IFN- γ - Interferon gama
IS – Índice de Seletividade
LC – Leishmaniose Cutânea
LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
LDPC – Leishmaniose Disseminada Pós-Calazar
LMC – Leishmaniose Mucocutânea
LPS - Lipolissacarídeo
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV – Leishmaniose Visceral
MTT – brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
NO – Óxido Nítrico
PBS – Tampão Fosfato-salino
ROS - Espécies reativas derivadas do oxigênio
RPMI – meio de cultura - *Roswell Park Memorial Institute*
Sb - Antimônio
SFB – Soro Fetal Bovino
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TDR1 – Redutase I Tiol Dependente
TWEEN 80 – Polissorbato 80

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of infectious disease caused by *Leishmania* parasites which mainly infect macrophages. In humans, *Leishmania* infection can cause four syndromes: cutaneous, diffuse cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. The conventional chemotherapeutic agents currently available, such as pentavalent antimonials and pentamidine, have high toxicity, causing cardiac and renal disturbances, respectively. The amphotericin B present high toxicity and high cost. Due to the limited number of drugs for the treatment and the lack of an effective vaccine, it is fundamental the research on new therapeutics. In this sense, the antiparasitic activity of molecules derived from plant extracts or their oils has been intensively investigated. The present study aims to investigate the leishmanicidal activity of extracts and compounds of species of the genus *Hypericum* collected in Cusco/ Cajamarca in Peru and Rio Grande do Sul (Brazil) on promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* as well as the cytotoxic effects of hexane extracts and compounds on macrophages and human red blood cells, respectively. For this, promastigotes of *L. (L.) amazonensis* were distributed in 96-well plates (3×10^6 /per well) and incubated with medium M199 (control) or with different concentrations of extracts or compounds of the genus *Hypericum* (15.6 to 900 $\mu\text{g/mL}$). After 48 hours incubation the viability of promastigotes was determined by counting the number of viable promastigotes in a Neubauer chamber. The viability of macrophages treated with the hexane extracts of different *Hypericum* species was determined by MTT assay. To this, 2×10^6 cells/mL were incubated with RPMI (control) or different concentrations of *Hypericum* fractions (15.6 to 1000 $\mu\text{g/mL}$). To test the leishmanicidal activity of isolates against amastigotes forms, macrophages were infected *in vitro* with promastigotes of *L. amazonensis* and stimulated with LPS (10 ng/mL)/IFN- γ (1 ng/mL) for 48 h. This activity was measured by determination of the number of alive parasites after incubation in M199 at 26 °C and growth of promastigotes. The extracts of *H. polyanthemum*, *H. carinatum* and *H. linoides* showed significant leishmanicidal activity against promastigotes with IC_{50} of 36.12 $\mu\text{g/mL}$, 64.99 $\mu\text{g/mL}$ and 111.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. It was also observed that this extracts were 4, 1.8 and 1.2 times less toxic to macrophages than to promastigotes, respectively. The compounds cariphenone A, uliginosin B, isouliginosin B and japonicin A showed significant toxicity on promastigote forms with IC_{50} of 35.46 $\mu\text{g/mL}$, 42.65 $\mu\text{g/mL}$, 43.96 $\mu\text{g/mL}$ and 82.18 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The treatment of macrophages with LPS/IFN- γ , and with different compounds decreased the

viability of intracellular amastigote forms in almost 100%. While the leishmanicidal activity induced by LPS/IFN- γ was abrogated by the treatment with aminoguanidine, the activity induced by the compounds was independent of nitric oxide production. In addition, the compounds showed low cytotoxicity to erythrocytes. Our results suggest that different species of *Hypericum* genus present compounds that directly caused leishmanicidal activity on promastigote, as well as present the ability to induce leishmanicidal mechanisms on *Leishmania*-infected macrophages. Further studies are needed to clarify the mechanisms involved in the leishmanicidal activity of *Hypericum* compounds.

Keywords: *Leishmania (L.) amazonensis*. Leishmanicidal activity. *Hypericum*. Macrophages. Nitric oxide.

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, os quais infectam principalmente macrófagos. A infecção por *Leishmania* pode causar quatro síndromes: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. Os quimioterápicos convencionais disponíveis como os antimonial pentavalentes e a pentamidina apresentam toxicidade elevada, gerando alterações cardíacas e renais, respectivamente. Já a anfotericina B possui elevado custo e alta toxicidade. Devido ao número limitado de fármacos para o tratamento e a inexistência de uma vacina eficaz, é fundamental a pesquisa de novas alternativas terapêuticas. Neste sentido, a atividade antiparasitária de moléculas obtidas de extratos de plantas ou seus óleos têm sido intensamente investigada. O presente trabalho se propõe a investigar a ação leishmanicida de extratos hexânicos e compostos de espécies do gênero *Hypericum* coletadas em Cusco/Cajamarca no Peru e no Rio Grande do Sul (Brasil) sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* assim como, avaliar a citotoxicidade dos extratos e compostos sobre macrófagos e hemácias humanas, respectivamente. Assim, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram distribuídas em placas de 96 poços (3×10^6 /poço) e incubadas com meio M199 (controle) ou com diferentes concentrações de extratos ou compostos do gênero *Hypericum* (15,6-900 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas de incubação a viabilidade de formas promastigotas foi determinada através da contagem do número de formas promastigotas viáveis em câmara de Neubauer. A viabilidade de macrófagos tratados com diferentes espécies de *Hypericum* foi determinada pelo ensaio de MTT. Para isto, 2×10^6 células/mL foram incubadas com RPMI (controle) ou com diferentes concentrações das frações de *Hypericum* (15,6-1000 $\mu\text{g/mL}$). Para testar a atividade leishmanicida dos compostos sobre formas amastigotas, macrófagos foram infectados *in vitro* com promastigotas de *L. amazonensis* e estimulados com LPS (10 ng/mL)/IFN- γ (1 ng/mL) por 48 horas. Esta atividade foi mensurada pela determinação do número de parasitas vivos após incubação com M199 a 26 °C e crescimento de promastigotas. Os extratos de *H. polyanthemum*, *H. carinatum* e *H. linoides* mostraram significativa atividade leishmanicida sobre promastigotas com IC₅₀ de 36,12 $\mu\text{g/mL}$, 64,99 $\mu\text{g/mL}$ e 111,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Observou-se também que estes extratos foram 4, 1,8 e 1,2 vezes menos tóxicos para macrófagos do que para formas promastigotas, respectivamente. Os compostos carifenona A, uliginosina B, isouliginosina B e japonicina A demonstraram significativa toxicidade sobre formas promastigotas com IC₅₀ de 35,46 $\mu\text{g/mL}$, 42,65 $\mu\text{g/mL}$,

43,96 µg/mL e 82,18 µg/mL, respectivamente. O tratamento de macrófagos com LPS/ IFN- γ , e com diferentes compostos diminuiu a viabilidade de amastigotas intracelulares em quase 100%. Enquanto que a atividade leishmanicida induzida por LPS/IFN- γ foi anulada pelo tratamento com aminoguanidina, a atividade induzida pelos compostos foi independente da produção de óxido nítrico. Em adição, os compostos mostraram baixa citotoxicidade sobre hemácias. Nossos resultados sugerem que diferentes espécies do gênero *Hypericum* possuem compostos que causam atividade leishmanicida direta sobre promastigotas, bem como apresentam a capacidade de induzir mecanismos leishmanicidas em macrófagos infectados com *Leishmania*. Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos na atividade leishmanicida dos compostos de *Hypericum*.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) amazonensis*. Atividade leishmanicida. *Hypericum*. Macrófagos. Óxido nítrico.

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes na minha vida:

Minha mãe, dentre todas as mulheres, a mais guerreira.

Meu pai, dentre todos os homens, o mais generoso.

Meu amor, Luis, o mais amoroso e gentil que conheço.

O convívio é uma benção. Amo demais vocês!!!

AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, **Graciela Dagnino e Rodolfo Dagnino**, pelo amor incondicional e por acreditaram no meu potencial. Por nunca desistirem de mim. Vocês são o que de mais valioso tenho na vida. Minha fortaleza. Minha eterna fonte de inspiração.*

*Ao meu namorado, **Luis Fernando Kanan**, pelo companheirismo e apoio nas horas mais difíceis desta trajetória. Meu parceiro e cúmplice de todos os momentos. E pela sorte que tenho de ter alguém como você do meu lado, pois meus dias se tornam mais felizes.*

Aos meus familiares que acreditaram em meu trabalho e me ofereceram todo o suporte necessário e ajudaram no que foi preciso.

*Ao meu professor e orientador, **Pedro Roosevelt Torres Romão**, pela oportunidade de poder aprimorar meus conhecimentos na área de Imunologia e adquirir a prática na bancada, fundamentais para o meu crescimento profissional. Sempre muito solícito e empenhado em extrair o melhor de cada aluno. E hoje, um amigo.*

*Agradeço também aos professores **Josiane Prophiro, Alessandra Peres, Márcia Vignoli e Luiz Rodrigues**, sempre dispostos a sanar dúvidas e a contribuir da melhor maneira possível para que o trabalho fosse promissor, sempre com sugestões enriquecedoras.*

*Aos colegas de laboratório, em especial as colegas **Alexandra Allemand, Ana Antonello, Thais Sartori e Viviane Fagundes** e ao técnico **Giuliano Rizzotto**, pela colaboração em experimentos, pelas risadas e por compartilhar dos mesmos sentimentos inerentes à busca pela pós tão almejada. Em nenhum momento esta caminhada foi individual.*

Agradeço à FAPERGS, à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Às vezes todos os nossos pensamentos são inquietantes.”

Led Zeppelin

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1.	Leishmaniose.....	11
1.1.1.	Formas clínicas.....	13
1.1.2.	Resposta imune.....	14
1.1.3.	Epidemiologia	17
1.1.4.	Tratamento	18
1.2.	Produtos naturais com atividade biológica.....	20
1.2.1.	Atividades biológicas de extratos de <i>Hypericum</i>	21
1.2.2.	Atividades biológicas de compostos de <i>Hypericum</i>	22
2.	OBJETIVO	25
2.1.	Objetivos específicos.....	25
3.	ARTIGO: PUBLICADO.....	26
4.	APÊNDICE: RESULTADOS PARCIAIS DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS DE ESPÉCIES DE <i>HYPERICUM</i>	32
5.	CONCLUSÃO	49
6.	PERSPECTIVAS	50
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXO A	68
	ANEXO B	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa ocasionada por protozoários tripanosomatídeos que pertencem à ordem Kinetoplastida e ao gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania*, que está presente nas Américas, na Europa, na África e na Ásia e o *Viannia*, encontrado apenas na Europa, Ásia e África [1, 2]. Por ser uma doença que ocorre principalmente em países pobres, o investimento global na pesquisa de medicamentos anti-*Leishmania* pelas empresas farmacêuticas tem sido considerado limitado [3].

A *Leishmania* apresenta duas formas morfológicas, a forma promastigota extracelular e flagelada encontrada na saliva do vetor e a forma amastigota intracelular encontrada em células como macrófagos/monócitos, células dendríticas e outros fagócitos como os neutrófilos. A forma promastigota infecta os fagócitos e transforma-se na forma intracelular. A posterior replicação, leva à ruptura da célula e à infecção de outros fagócitos. O ciclo está completo quando os flebotomíneos, que se alimentam do sangue do hospedeiro, absorvem as células fagocíticas infectadas ou parasitas extracelulares (Figura 1) [4-6].

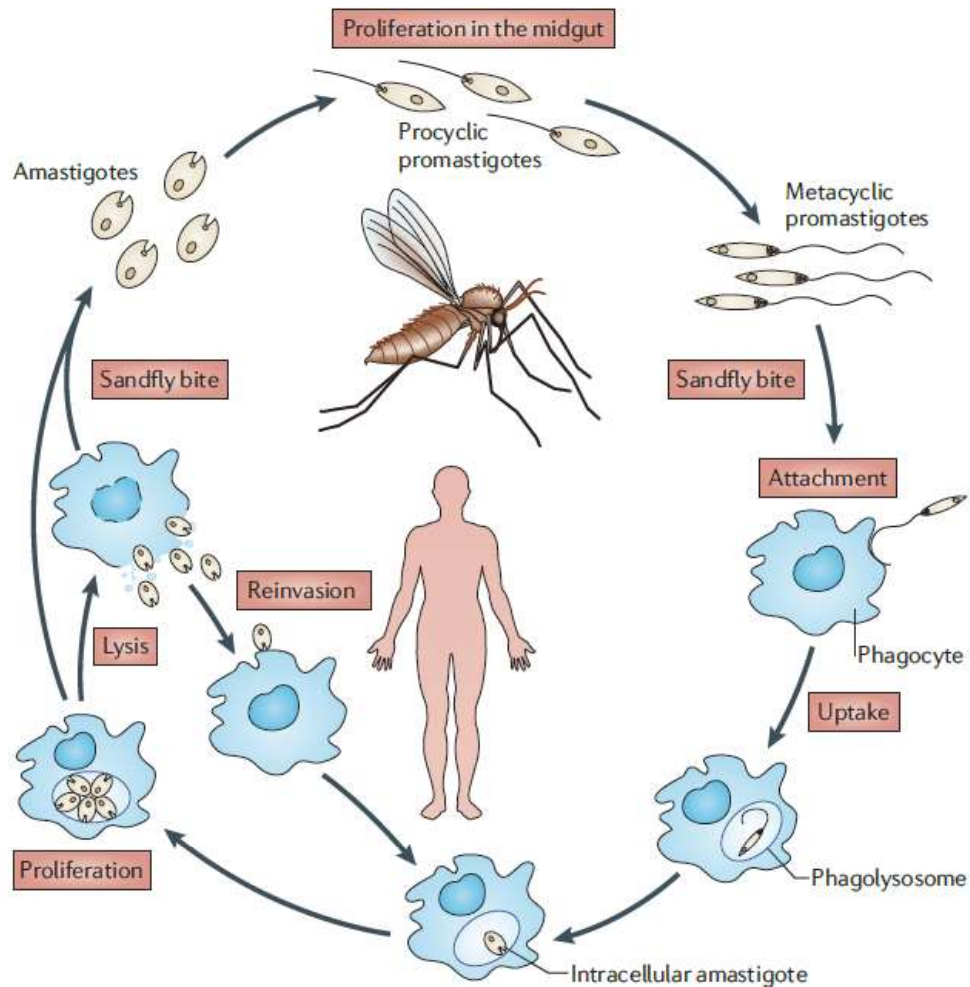


Figura 1. Ciclo de vida dos parasitos de *Leishmania*. Fonte: Kaye & Scott, 2011 [5].

A transmissão do parasito pode ser zoonótica, tendo o cão (ciclo doméstico) ou animais silvestres (ciclo silvestre) como principais reservatórios, e antroponótica, a qual o homem é o reservatório. Além destas, há a ocorrência da transmissão enzoótica entre animais selvagens, onde caso o homem seja infectado, é o hospedeiro final. Em ciclos silvestres, os hospedeiros animais podem manter a transmissão enzoótica indefinidamente sem a doença humana. A leishmaniose esporádica ou epidêmica ocorre quando o homem entra no habitat silvestre para propósitos econômicos ou militares, ou quando habitações humanas invadem o cenário silvestre [7].

Nas Américas, o vetor responsável pela transmissão é o flebotomíneo fêmea pertencente ao gênero *Lutzomyia*, enquanto que na Europa, África e Ásia, é o *Phlebotomus* [8]. Os flebotomíneos geralmente picam em áreas externas e durante a noite, mas algumas espécies o fazem durante o dia e em áreas internas, como dentro de casa [9]. Os vetores podem ser específicos para uma espécie de *Leishmania* ou podem ser inespecíficos, suportando o crescimento de mais de uma espécie em seu interior [10, 11]. Esta capacidade é

devido a receptores nas células do intestino do vetor que se acoplam a ligantes específicos expressos pelas formas promastigotas de *Leishmania* [12, 13]. A distribuição da doença depende das características ambientais que permitem a sobrevivência do vetor. Quando há a ocorrência de temperaturas mais elevadas, a tendência do mosquito é voar para locais menos quentes, onde normalmente não haveria a presença do vetor [14-17].

Diferentes espécies estão envolvidas no desenvolvimento das distintas manifestações clínicas. A forma cutânea é causada por diversas espécies de *Leishmania*, dentre as quais: *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) killicki*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. A forma mucocutânea tem sido associada com *L. (V.) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Já a síndrome visceral é ocasionada por *Leishmania (Leishmania) donovani*, *L. (L.) tropica* e *Leishmania (Leishmania) infantum*. Para esta última espécie se aceita também a utilização da nomenclatura *Leishmania (Leishmania) chagasi*, pois se acredita que se tratam do mesmo agente etiológico [18-21].

De acordo com Azeredo-Coutinho e colaboradores a distribuição geográfica de *L. amazonensis* tem aumentado no Brasil [22]. Por isso, cepas de *L. amazonensis* têm sido utilizadas em estudos para uma possível vacina contra a leishmaniose cutânea [23].

1.1.1. Formas clínicas

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem da espécie do parasito e da susceptibilidade genética do hospedeiro [24]. Dentre elas temos a leishmaniose cutânea (LC) que é caracterizada por lesões em forma de úlceras ou nódulos em áreas expostas à picada do flebotômíneo, como pernas, braços e face. Esta é dividida em quatro fenótipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), sendo que esta última ocorre em consequência da leishmaniose visceral (LV) [25]. Contudo, uma nova forma clínica tem sido descrita, a leishmaniose cutânea disseminada intermediária/*borderline* que é caracterizada por evolução crônica e recaídas. Esta manifestação é intermediária entre a LCL e as formas LMC e LCD [26].

A LC pode curar-se espontaneamente ou evoluir para a forma mucocutânea, quando causada pelas espécies *L. (V.) panamensis* e *L. braziliensis* [27]. A LMC ocasiona

desfigurações na face do indivíduo, afetando áreas como o nariz, boca e pálpebras. Esta destruição do tecido pode dificultar a respiração e a deglutição, podendo levar à morte [28].

A LCD pode ser ocasionada por *L. amazonensis*, *L.(L.) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) pifanoi*, *L. (L.) major* e *L. (L.) aethiopica*. É caracterizada por nódulos que se espalham pelos membros, nádegas e face. Esta forma crônica e casos de recidivas são comuns [29].

A LV ou calazar é a forma mais severa dentre as leishmanioses, sendo caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia e perda de peso. Caso o indivíduo não seja tratado, o quadro pode evoluir para pancitopenia e imunossupressão. Em consequência da pancitopenia, palidez e hemorragia também podem ocorrer [23, 24, 30, 31]. As reações inflamatórias se desenvolvem de dois a oito meses após a infecção e se a doença não for tratada, geralmente é fatal [32].

1.1.2. Resposta imune

A resposta imune contra *Leishmania* é bastante complexa [33]. Dentre os mecanismos efetores para eliminação do parasito cita-se a ativação de macrófagos com posterior produção de óxido nítrico (NO), de espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS) e nitrogênio, além da ativação da enzima lisossomal [34-37].

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da picada do flebotomíneo e envolve a produção do fator quimiotático para neutrófilos por formas promastigotas, que também induzem a secreção de IL-8 pelos neutrófilos [38-42]. Vale ressaltar que componentes salivares dos vetores também desencadeiam o recrutamento de neutrófilos [43, 44]. Os neutrófilos são responsáveis pela fagocitose e a morte do parasito se dá através da liberação de peptídeos antimicrobianos e pela degranulação do neutrófilo, que é induzido por leucotrieno B4 (LTB-4) [45, 46]. Contudo, após o englobamento, o neutrófilo pode entrar em apoptose e liberar restos dos parasitos que poderão ser fagocitados por macrófagos. Os neutrófilos apoptóticos também podem atuar sobre os macrófagos infectados, reduzindo sua capacidade fagocítica. Além disso, os macrófagos infectados produzem TGF- β e PGE₂ na presença de neutrófilos apoptóticos auxiliando na replicação da *Leishmania* [47, 48]. Os neutrófilos também podem servir como veículo para levar o parasito vivo ao interior de fagócitos (monócitos/macrófagos) sem ativar os mecanismos efetores dos macrófagos sobre *Leishmania*, de acordo com a hipótese do “cavalo de Tróia” (Figura 2) [49].

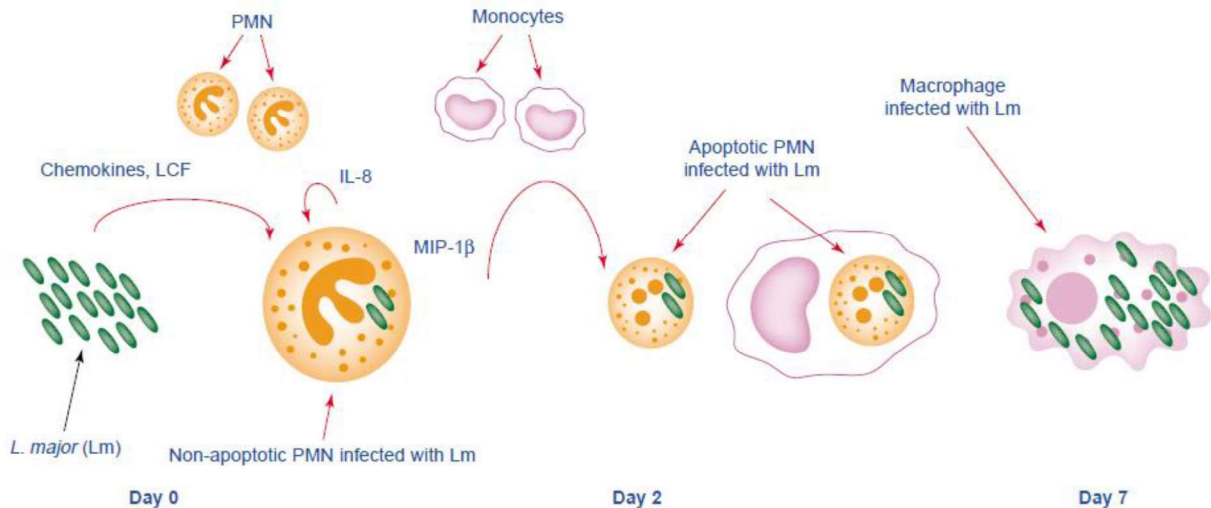


Figura 2. Neutrófilos como reservatório de *Leishmania*: a hipótese do cavalo de Tróia. Fonte: Laskay et al., 2003 [49].

As células dendríticas atuam no controle parasitário através da ativação de células T e da produção de $\text{TNF-}\alpha$ [48]. Já as células NK desencadeiam a atividade microbicida de macrófagos pela produção de $\text{IFN-}\gamma$. Em pacientes com LCD tratados há o recrutamento de NKs para o local da lesão [50, 51]. Sabe-se que em pacientes com LMC ocorre produção excessiva de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ [35, 52, 53]. A expressão de $\text{IFN-}\gamma$ e os níveis de RNAm de $\text{IFN-}\gamma$ estão elevados no plasma e no linfonodo de pacientes com LV ativa, respectivamente. Contudo, estes dados indicam que mesmo com a produção elevada de $\text{IFN-}\gamma$, isto não confere uma proteção contra esta forma da doença [54-56]. Desse modo percebe-se que a presença de citocinas pró-inflamatórias e células fagocíticas nem sempre está relacionada ao controle da infecção, podendo até favorecer o surgimento de lesões.

Em camundongos, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12 são citocinas características da resposta Th1 que está diretamente relacionada ao desenvolvimento de lesões menores e com uma pequena quantidade de parasitos, ou seja, uma doença controlada [49]. Estas citocinas ativam macrófagos infectados aumentando os níveis de NO e ROS que são prejudiciais à *Leishmania* [57]. Em contrapartida, a resposta chamada de Th2 favorece lesões mais extensas e disseminadas, sendo característica a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13 [49]. Este paradigma de resposta Th1/Th2 tem sido reavaliado e outras populações de células T CD4^+ também podem influenciar significativamente no resultado da doença. Dentre estas populações temos as populações de células T CD4^+ reguladoras, células T CD4^+ helper Th17 e Th9, e células T helper folicular (fh) (Figura 3) [58].

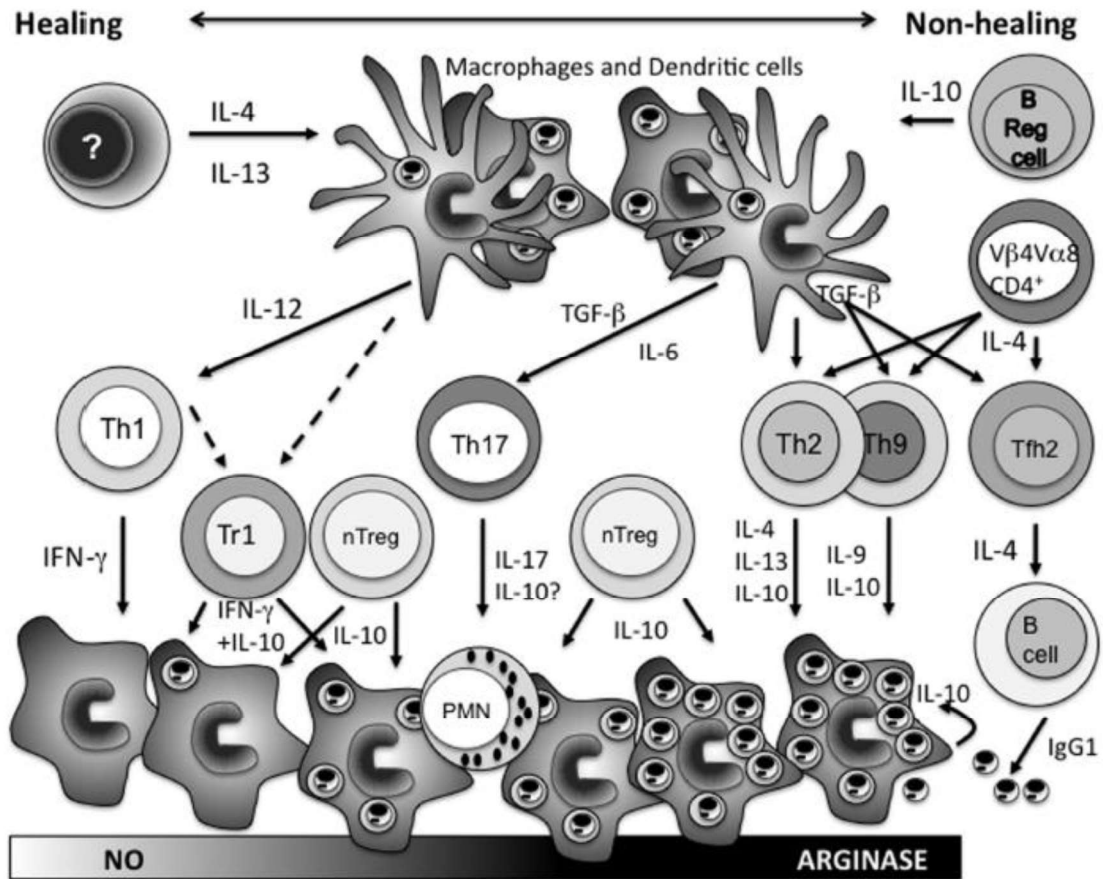


Figura 3. Os mecanismos que influenciam a expansão de diferentes populações de células T CD4⁺ como parte da resposta imune adaptativa após infecção por *Leishmania major*, e seu papel na determinação do resultado da doença. Fonte: Alexander & Brombacher, 2012 [58].

Em humanos, esta diferenciação nítida entre respostas Th1 e Th2 não é totalmente aplicável. Contudo, a resposta imune tem um papel fundamental na caracterização da clínica da doença [59].

As células T CD4⁺ controlam a infecção através da produção de IFN- γ e ativação de macrófagos, mas a resposta destas células não estaria envolvida com a citólise de células infectadas [60]. Contudo, citocinas produzidas por estas células podem também causar dano tecidual a partir do desenvolvimento de resposta inflamatória [49]. Células T CD4⁺ denominadas Th17 produzem IL-17, uma citocina que foi encontrada em altos níveis em pacientes com LC e LMC [61]. Esta interleucina contribui para a patogênese da LMC através da ativação de polimorfonucleares, injúria tecidual e osteoclastogênese [35]. Contrariamente, indivíduos expostos a *L. donovani* tiveram uma maior proteção contra o desenvolvimento de LV quando suas células mononucleares de sangue periférico produziram IL-17 após estímulo com o parasito morto [62].

Já as células T CD8⁺ causam citólise de células infectadas, e por isto, interferem na imunopatologia da doença [60]. Prova disto é a presença de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos em lesões de pacientes com LC, estando correlacionado com a progressão e o tamanho da lesão [60, 63, 64]. Apesar destes efeitos nocivos, estas células levam à cura da doença através da produção de IFN- γ , mudando assim a resposta de Th2 para Th1 na infecção primária [65-68].

Células como macrófagos, células T reguladoras, células Th1 e células T CD8 produzem IL-10 que diminui as respostas inflamatórias em indivíduos com LC [69-71]. Sabe-se também que nestes indivíduos a resposta imune é regulada tanto por citocinas pró-inflamatórias como anti-inflamatórias [49]. No caso de pacientes com LMC verifica-se uma baixa produção de IL-10, caracterizando assim a exacerbada resposta inflamatória encontrada nesta forma da doença [72]. Esta citocina encontra-se em níveis elevados em pacientes com LV e está diretamente correlacionada com a carga parasitária no sangue destes indivíduos [73].

Em pacientes infectados com *L. braziliensis* verificou-se a presença de células T reguladoras no sítio da infecção [74]. Em outro estudo, demonstrou-se que a persistência de *L. major* na pele de camundongos C57BL/6, após a cura das lesões da derme, é controlada por células T reguladoras que suprimem a ação de linfócitos T efetores, diminuindo consequentemente os níveis de IFN- γ . Esta supressão é através de mecanismos dependentes e independentes de IL-10 [75]. Além disto, as células T reguladoras são responsáveis pela reativação da doença por *L. major* em infecções latentes. Isto foi demonstrado por Mendez e colaboradores em um estudo realizado com camundongos que apresentaram a reativação no sítio primário da infecção após uma superinfecção pelo parasito. Neste sítio houve um aumento dos níveis de células T reguladoras produtoras de IL-10 [76].

1.1.3. Epidemiologia

A leishmaniose, englobando todas as suas formas clínicas, destaca-se pelo elevado índice de mortalidade, ocasionando 50.000 mortes no mundo no ano de 2010 [77]. Neste mesmo ano, 3,3 milhões de pessoas viviam inválidas devido à doença [78].

De 2004 a 2013 foram registrados no Brasil um total de 35.530 casos de leishmaniose visceral (LV) e 226.191 casos de leishmaniose tegumentar (LT) [79, 80]. Murray e colaboradores reportaram o Brasil como líder no ranking dos países Americanos, com uma incidência anual de 4.200 e 26.008 casos de LV e leishmaniose cutânea (LC), respectivamente [78]. Juntamente com mais cinco países, é responsável por mais de 90% dos casos de LV no

mundo. Além disto, de 70 a 75% da incidência de LC é distribuída em dez países: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru [81].

No período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010 o Rio Grande do Sul apresentou oito casos de LV confirmados, sendo sete autóctones do município de São Borja e um advindo de Três Lagoas (MS). Com relação à leishmaniose visceral canina, nos últimos anos tem sido crescente o número de casos de cães infectados no Rio Grande do Sul. Em 2008 foi encontrado o primeiro caso na cidade de São Borja, e em inquérito sorológico realizado entre fevereiro de 2009 a dezembro de 2010, dos 5.400 cães investigados 22,5% foram sororreagentes (Ensaio Imunoenzimático Indireto - ELISA e Imunofluorescência Indireta - RIFI). Vale ressaltar que foi registrada a presença de *Lutzomyia longipalpis* (vetor principal da leishmaniose visceral) na região e que nas amostras de alguns cães houve caracterização de *L. (L.) infantum*. Na cidade de Porto Alegre, em 72 amostras analisadas no ano de 2010 encontrou-se uma prevalência de 4,1% de LV canina (ELISA e RIFI) [82]. Dados do nosso grupo em estudo epidemiológico realizado com 405 cães da região metropolitana de Porto Alegre (municípios de Canoas (n = 107), São Leopoldo (n = 216) e Novo Hamburgo (n = 82) encontrou uma prevalência de 1,23% por ensaio imunoenzimático (ELISA EIE[®]) [83]. Desta maneira, percebe-se que a presença do vetor na região e o grande número de animais infectados representam um fator de risco para a saúde do homem, pois *L. longipalpis* pode transmitir a leishmaniose visceral através de sua picada.

1.1.4. Tratamento

O fármaco de primeira escolha para tratamento da leishmaniose é à base de antimônio pentavalente, apresentado em duas formulações: estibogluconato de sódio e antimoniato de metil meglumina. Estes fármacos apresentam problemas como eficácia variável e alta toxicidade, além de resistência em alguns países, como na Índia [84, 85]. Além disso, problemas cardiovasculares e pancreatite podem ocorrer [86-88]. A ação destes fármacos se dá por duas vias, a saber: pela redução do antimônio pentavalente (Sb^V) a trivalente (Sb^{III}) (farmacologicamente ativa) no interior de macrófagos e do parasito, atuando como pró-droga e pela própria forma pentavalente [88, 89]. A redução da forma pentavalente à trivalente pode ocorrer por mecanismos dependentes de tióis, como a glutatona, cisteína, cisteinil-glicina e tripanotiona, inibindo a enzima tripanotiona redutase e aumentando a suscetibilidade do parasito ao dano oxidativo gerado em macrófagos infectados ou por uma enzima específica do

parasito (TDR1 - Redutase I Tiol Dependente), levando à apoptose da célula [90-92]. A segunda via sugere que haja uma atividade anti-*Leishmania* intrínseca, onde o Sb^V se complexa com ribonucleosídeos e atua sobre a purina, inibindo a topoisomerase I [93, 94].

Além dos antimoniais, distintas formulações para as várias formas clínicas da doença têm sido empregadas nos últimos anos: isotiocianato de pentamidina, anfotericina B e suas formulações lipídicas, paramomicina, alopurinol, derivados do azol (fluconazol, cetoconazol, itraconazol) e análogos da alquilfosfocolina (miltefosina) [8].

A anfotericina B é descrita como fármaco de segunda escolha. Como o antimônio pentavalente, esta também apresenta problemas relacionados à toxicidade. Entre as reações adversas da anfotericina B destaca-se febre alta, hipocalcemia e nefrotoxicidade. Além disso, o seu custo elevado dificulta o acesso ao tratamento, o qual requer período prolongado de hospitalização [86, 95]. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, contudo, sabe-se que este medicamento atua sobre o ergosterol da membrana do parasito. A interação da anfotericina com o ergosterol ocasiona a formação de canais transmembrânicos (poros) na bicamada lipídica que facilita a translocação de cátions, água, glicose e enzimas de membrana, provocando assim, a morte do parasito [96-99]. O medicamento também se liga ao colesterol da membrana de macrófagos, inibindo sua infecção por *Leishmania* [100].

Já a pentamidina demonstra toxicidade elevada, ocasionando diabetes mellitus, problemas gastrointestinais, cardíacos e pancreatite [101, 102]. O mecanismo de ação deste fármaco está envolvido na morte do parasito através da fragmentação da membrana mitocondrial do mesmo [103, 104]. Estudos reportam que o medicamento inibe a topoisomerase I e modifica a morfologia do cinetoplasto, gerando complexos cliváveis de proteínas do minicírculo através da inibição da topoisomerase II [105-107]. Além disto, a pentamidina inibe a S-adenosil-metionina-descarboxilase, enzima fundamental para a biossíntese da poliamina espermidina e promove o colapso do potencial de membrana mitocondrial [108, 109].

Outros dois fármacos têm sido utilizados no tratamento da leishmaniose, a paramomicina e a miltefosina. A miltefosina demonstrou-se útil no tratamento da leishmaniose visceral na Índia e na Alemanha e da leishmaniose cutânea na Colômbia [110, 111]. Esta substância inibe uma enzima chave na remodelação do éter lipídico, afetando assim, o crescimento celular do protozoário [112]. É um fármaco teratogênico, ocasiona diarreia e vômito, além de toxicidade hepática e renal [113, 114]. A paramomicina é utilizada tanto no Velho como no Novo mundo no tratamento da leishmaniose tegumentar, com

administração local e parenteral [115]. Seu mecanismo de ação se dá através da inibição da respiração mitocondrial e da despolarização da membrana [116].

1.2. Produtos naturais com atividade biológica

Devido aos problemas demonstrados nos tratamentos existentes, esforços para a descoberta de novos fármacos anti-*Leishmania* estão em andamento e precisam ser estimulados [117]. Muitas substâncias com ação farmacológica foram descobertas e têm sido utilizadas para o controle de doenças parasitárias, como a artemisinina de *Artemisia annua* L. para a terapia antimalárica [118-120].

Produtos naturais são fontes para o desenvolvimento de moléculas bioativas que têm sido utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de inúmeras doenças [121]. Exemplo disto, pode-se citar a galegina de *Galega officinalis* L., substância utilizada para produção de metformina (antidiabético oral), a papaverina de *Papaver somniferum* L. usada na preparação de verapamil (anti-hipertensivo) e a quelina de *Ammi visnaga* (L.) Lam. utilizada no preparo da cromolina para o tratamento da asma [122].

Diante do arsenal terapêutico advindo de produtos naturais, estudos com plantas têm sido realizados para a investigação de atividade biológica de extratos (preparações líquidas obtidas pela remoção dos constituintes ativos a partir de plantas empregando um solvente que permite extrair seletivamente os compostos de interesse), frações (obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto em contato com diferentes líquidos extratores de diversas polaridades ou produto obtido a partir do extrato após procedimentos de extração sólido-líquido ou cromatografia líquida em coluna) e compostos (composto, metabólito ou molécula obtida a partir do extrato ou da fração por meio de técnicas de separação cromatográfica) [123, 124].

Neste último ano, diversos trabalhos demonstram a potencial atividade de produtos naturais sobre *L. amazonensis in vitro*. A atividade leishmanicida de extratos hexânicos de diferentes espécies de plantas do Brasil foi demonstrada por Ribeiro e colaboradores, onde *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav., *Chrysobalanus icaco* L., *Dipteryx alata* Vogel, *Syzygium cumini* (L.) Skeels, *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stignocarpa* Mart. ex. Hayne, obtiveram valores de CI_{50} menores que 200 $\mu\text{g/mL}$ para formas promastigotas [125].

De Queiroz e colaboradores verificaram que os extratos aquosos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit., *Aloe vera* (L.) Burm. f., *Ruta graveolens* L., *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Chenopodium ambrosioides* L. na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ inibiram o

crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* em 74,2%, 75,6%, 70,8%, 83,8% e 82,1%, respectivamente [126]. O extrato acetato de etila de *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil. demonstrou um CI_{50} de 24,9 $\mu\text{g/mL}$ [127].

A atividade leishmanicida *in vitro* de compostos e óleos essenciais de diversas espécies sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* também tem sido demonstrada, com valores de CI_{50} menores que 15 $\mu\text{g/mL}$. Dentre os quais pode-se citar: partenolida de *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip., oleoresina de *Copaifera reticulata* Ducke, casearilucina A e caseamembrol A de *Laetia procera* (Poepp.) Eichler e eupomatenóide-5 de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. [128].

Estudos *in vivo* também tem demonstrado a atividade leishmanicida de componentes derivados de plantas, como cumarina e alcalóide fluoroquinolona de *Helietta apiculata* Benth., cantin-6-ona de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium* Engl. e extrato bruto hidroalcolico de *Chenopodium ambrosioides* L. [129].

1.2.1. Atividades biológicas de extratos de *Hypericum*

Espécies da família Guttiferae são fontes de substâncias com várias atividades biológicas, sendo que as do gênero *Hypericum* têm sido utilizadas em várias partes do mundo na medicina tradicional como antisséptica, diurética, digestiva e cicatrizante [130-132]. A espécie mais conhecida do gênero é *H. perforatum* L. (erva de São João), frequentemente utilizada no tratamento da depressão [133]. Além destas atividades, outras têm sido descritas, como anti-neoplásica de *H. adenotrichum* Spach, anti-inflamatória de *H. androsaemum* L., antioxidante de *H. ascyron* L. e *H. choisianum* Wall. Ex N. Robson, antidepressiva de *H. reflexum* L. fil., analgésica de *H. glandulosum* Ait., antifúngica de *H. connatum* Lam. e antimicrobiana de *H. elongatum* Ledeb. [134].

Dentre as diversas ações biológicas destaca-se a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *H. caprifoliatum* Cham. & Schldl. e *H. myrianthum* Cham. & Schldl., que foram ativos contra *Staphylococcus aureus* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, com uma zona de inibição de crescimento do microrganismo de 16,40 e 13,14 mm no teste de difusão em placa, respectivamente. Além disso, o extrato metanólico de *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ obteve uma zona de inibição de 16,23 mm para *Micrococcus luteus* e 12,58 mm para *Bacillus subtilis* [135].

Além deste efeito sobre diferentes bactérias, a ação acaricida de extratos metanólico e hexânico de *H. polyanthemum* foi determinada através do teste de imersão de adultos, onde

fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (carrapato que parasita bovinos) foram imersas em diferentes concentrações dos extratos (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL) e levadas à estufa para observação da ovopostura. No teste de imersão larval verificou-se que após 48 horas de exposição, o extrato hexânico na concentração de 6,25 mg/mL e o extrato metanólico na concentração de 50 mg/mL induziram a morte de 100% das larvas. O extrato hexânico na concentração de 50 mg/mL inibiu em 19,2% a ovoposição [136]. Efeito larvicida também foi encontrado para extratos hexânicos de *H. polyanthemum* e *H. carinatum* Griseb. sobre *Aedes aegypti*. No teste de suscetibilidade larval, após 24 horas de tratamento com os extratos, foram obtidos valores de CL₅₀ de 121 e 100 µg/mL para os extratos de *H. polyanthemum* e *H. carinatum*, respectivamente. Além disto, o extrato de *H. polyanthemum* na concentração de 53 e 71 µg/mL preveniu a formação de pupas (estágio imaturo da larva), interferindo no desenvolvimento das larvas de *A. aegypti* [137, 138].

A atividade antiproliferativa de diferentes espécies de *Hypericum* também tem sido descrita. Neste sentido, foi demonstrado que os extratos de *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum* na concentração de 100 µg/mL inibiram o crescimento de linhagens tumorais HT-29 (adenocarcinoma coloretal humano) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão de células não pequenas) em mais de 75% [139]. Outro estudo demonstrou ação antidepressiva quando do tratamento de ratos Wistar com extrato ciclohexano de *H. caprifoliatum* via oral (três administrações de 90 mg/kg, nos tempos de 5 minutos, 19 e 23 h após a primeira exposição ao nado forçado), que foi capaz de reduzir em aproximadamente 40% o tempo de imobilidade dos animais no teste de nado forçado [140].

Os dados acima exemplificam o grande interesse pela busca de moléculas ativas a partir de plantas do gênero *Hypericum*, incluindo a procura por atividade antiparasitária e imunomoduladora.

1.2.2. Atividades biológicas de compostos de *Hypericum*

Dentre os mais comuns compostos de *Hypericum* estão as quinonas policíclicas, as xantonas, os flavanóides, os derivados de fluoroglucínóis, os benzopiranos e as benzofenonas [141]. Um grupo de pesquisadores isolou três benzopiranos de *H. polyanthemum*, o HP1 (isobutiril-5,7-dimethoxi-2,2-dimetil-benzopirano), o HP2 (7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano) e o HP3 (5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano) [142], além de derivados de floroglucinol de *H. myrianthum* [143], *H. carinatum*, *H.*

polyanthemum, *H. caprifoliatum* e *H. connatum* [144, 145]. De *H. carinatum* foram também obtidas duas benzofenonas de estrutura inédita [146].

Estudos têm demonstrado que os benzopiranos e benzofenonas possuem atividade antiprotozoária. A hiperforina, floroglucinol de *H. perforatum* L. apresentou valor de CI_{50} de 2,1 μM [147], enquanto otogirone e erectquione B, floroglucinóis de *H. erectum* Thunb. CI_{50} de 5,6 e 7,2 μM [148] contra *Plasmodium falciparum*. Benzofenonas (7-epi-clusianona, garciniafenona e guttiferona-a) de *Garcinia brasiliensis* Mart. demonstraram atividade anti-*Leishmania* contra formas promastigotas com valores de CI_{50} de 3,33 a 18,12 $\mu g/mL$ [149]. Benzopiranos de *H. polyanthemum* (isobutiril-5,7-dimethoxi-2,2-dimetil-benzopirano – HP1, 7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano - HP2 e 5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano - HP3) demonstraram atividade contra formas trofozoítas de *Trichomonas vaginalis* com valores de CI_{50} variando de 226,5 a 1230,4 μM [150]. Com relação a bactérias, atividade antimicrobiana foi demonstrada para uliginosina B, japonicina A, HP2 e HP3 que foram fortemente ativos em inibir o crescimento de *S. aureus* (dados de inibição não foram apresentados pelo autor) [151]. Em outro estudo, verificou-se a atividade antibacteriana de floroglucinóis (isouliginosina B, japonicina A e uliginosina B) de *H. brasiliense* Choisy contra *S. epidermidis* e *S. aureus* com valores de concentração mínima inibitória que variaram entre 1,5 a 50 $\mu g/mL$ [152].

Outro potente efeito encontrado para os benzopiranos foi a atividade anti-tumoral *in vitro*. Constatou-se que HP1, HP2 e HP3 obtiveram valores de IC_{50} menores que 30 $\mu g/mL$ sobre as linhagens tumorais NCI-H460, HT-29 e U-373MG [153]. Pinhatti e colaboradores mostraram atividade antiproliferativa de uliginosina B e japonicina A sobre a linhagem celular de carcinoma ovariano OVCAR-3, reduzindo a proliferação celular em 34 e 35%, respectivamente, na concentração de 50 $\mu g/mL$. Carifenona A e carifenona B na concentração de 100 $\mu g/mL$ promoveram a redução da proliferação em 54 e 53% da linhagem U-251 (glioblastoma celular humano), 53 e 37% da linhagem HT-29 e 32 e 27% da linhagem OVCAR-3, respectivamente. Quando da associação de concentrações sub-efetivas de japonicina A (1,3 $\mu g/mL$) e paclitaxel (0,08 $\mu g/mL$), fármaco convencional para câncer, houve uma redução de quase 50% na viabilidade celular de OVCAR-3 [154].

Com relação aos efeitos sobre o sistema nervoso central, HP1 mostrou efeito antinociceptivo no teste de contorção abdominal em camundongos. O benzopirano na dose de 60 mg/kg (via oral) reduziu as contorções induzidas por ácido acético em 58% [155]. A uliginosina B foi responsável pela inibição em mais de 90% das contorções abdominais na dose de 15 mg/kg via oral [156]. Além desta ação, a uliginosina B apresentou uma ação

antidepressiva no teste de nado forçado em ratos. Desta maneira, na dose de 10 mg/kg (via oral) houve uma redução em mais de 70% no tempo de imobilidade dos animais. Neste mesmo estudo, pode-se verificar que a uliginosina B, na dose de 5 mg/kg, associada a doses sub-efetivas de antidepressivos comumente utilizados, potencializou a ação destes últimos, nos testes de nado forçado [157].

Diante das limitações no tratamento das leishmanioses, onde os quimioterápicos disponíveis possuem elevada toxicidade, administração parenteral e desenvolvimento de resistência pelo parasita, o estudo de compostos com atividade leishmanicida poderá contribuir com o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Dessa forma, a partir de uma parceria estabelecida entre o Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS e o laboratório de Imunologia da UFCSPA e considerando as importantes atividades farmacológicas citadas para compostos de espécies do gênero *Hypericum*, além dos promissores resultados relatados por diversos estudos, o presente trabalho propõe a investigação de atividade anti-*Leishmania* de extratos e compostos obtidos de espécies de *Hypericum* advindas do Rio Grande do Sul (Brasil) e Cusco/Cajamarca (Peru).

2. OBJETIVO

Avaliar a possível ação leishmanicida de extratos e compostos de espécies do gênero *Hypericum* coletadas em Cusco/Cajamarca no Peru e no Rio Grande do Sul (Brasil) sobre *L. amazonensis in vitro*.

2.1. Objetivos específicos

Artigo: publicado

- Investigar se extratos hexânicos de diferentes espécies do gênero *Hypericum* possuem atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. amazonensis in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade de extratos hexânicos obtidos de espécies do gênero *Hypericum* sobre macrófagos;
- Determinar o índice de seletividade dos compostos com ação contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Apêndice: Resultados parciais que serão utilizados para a escrita do próximo artigo:

- Avaliar a ação leishmanicida de compostos de espécies do gênero *Hypericum* sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade de compostos de espécies do gênero *Hypericum* sobre hemácias humanas;
- Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados e estimulados *in vitro* com compostos de espécies do gênero *Hypericum* e LPS/IFN- γ .

3. ARTIGO: PUBLICADO

Phytomedicine – fator de impacto 2,877

Phytomedicine 22 (2015) 71–76



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.de/phymedLeishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* speciesAna Paula Dagnino^a, Francisco Maikon Corrêa de Barros^b, Gari Vidal Ccana-Ccpatinta^b, Josiane Somariva Prophiro^a, Gilsane Lino von Poser^b, Pedro R.T. Romão^{a,*}^a Laboratório de Imunologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Rua Sarmento Leite, 245, sala 206, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2014

Received in revised form 29 August 2014

Accepted 17 October 2014

Keywords:

Hypericum species

Leishmaniasis

Leishmania amazonensis

Leishmanicidal activity

ABSTRACT

Leishmaniasis has emerged as the third most prevalent parasite-borne disease worldwide after malaria and filariasis, with about 350 million people at risk of infection. Antileishmanial drugs currently available have various limitations, mainly because of the parasite resistance and side effects. The search of new antileishmanial drugs is ventured throughout the world.

Purpose: The purpose of this study was to assess the leishmanicidal activity of lipophilic extracts of eight *Hypericum* species against promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Material and methods: The dried and powdered materials of aerial parts of *H. andinum* Gleason, *H. brevistylum* Choisy, *H. caprifoliatum* Cham. & Schldtl., *H. carinatum* Griseb., *H. linoides* A. St.-Hil., *H. myrianthum* Cham. & Schldtl., *H. polyanthum* Klotzsch ex Reichardt and *H. silenoides* Juss. were extracted by static maceration with *n*-hexane. Extracts were evaporated to dryness under reduced pressure and stored at -20°C until biological evaluation and HPLC analysis. The metabolites investigated were dimeric phloroglucinol derivatives, benzophenones and benzopyrans. The yields were expressed as mean of three injections in mg of compound per g of extract (mg/g extract). The effect of *Hypericum* species on the viability of infective forms of *L. (L.) amazonensis* was determined using a hemocytometer. Amphotericin B was used as a standard drug. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values for each extract were determined by linear regression analysis. The cytotoxic effects of extracts were assessed on peritoneal macrophages of BALB/c mice by MTT assay. The concentration that causes 50% of macrophage cytotoxicity (CC_{50}) was determined by linear regression analysis. The selectivity index (SI) of the extracts was determined considering the following equation: CC_{50} against mammalian cells/ IC_{50} against *L. amazonensis*.

Results: We demonstrated that *H. carinatum*, *H. linoides* and *H. polyanthum* were able to kill the parasites in a dose dependent manner. These extracts presented low cytotoxicity against murine macrophages. At 48 h of incubation *H. polyanthum* presented significant leishmanicidal activity with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 36.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The leishmanicidal activity of *H. myrianthum* was significantly lower than that presented by *H. polyanthum*, *H. carinatum* and *H. linoides* extracts. *H. brevistylum* and *H. caprifoliatum* showed significant leishmanicidal activity only at high concentrations (500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), while *H. andinum* and *H. silenoides* were ineffective.

Conclusion: The promising results demonstrate the importance of the species of the genus *Hypericum* as source of compounds potentially useful for the treatment of leishmaniasis.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Parasites of the genus *Leishmania* cause a spectrum of diseases ranging from self-healing ulcers to disseminate and often fatal

visceral diseases, depending on the parasite species transmitted, intrinsic resistance to drugs and mechanisms immune mediated, such as the production of oxygen and nitrogen reactive species (Convit et al., 1993; García-Hernández et al., 2012; McMahon-Pratt and Alexander, 2004). Leishmaniasis is endemic in 98 countries on five continents. At the moment, approximately 350 million people are considered at risk of contracting leishmaniasis, and about 0.2 – 0.4 million cases of visceral leishmaniasis (VL) and 0.7 – 1.2

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3303 8746; fax: +55 51 3303 8810.
E-mail addresses: pedror@ufcsa.edu.br, prtortes@usp.br (P.R.T. Romão).

million cases of cutaneous leishmaniasis (CL) occur each year (Alvar et al., 2012). *Leishmania (Leishmania) amazonensis* is able to produce a wide spectrum of diseases in humans, including localized cutaneous leishmaniasis (LCL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and VL (Barral et al., 1991).

Despite of the vast amount of research conducted on *Leishmania* biology, chemotherapeutic interventions are still far from ideal and adequate vaccines have yet to be developed (García-Hernández et al., 2012; Mutiso et al., 2013). The pentavalent antimonials remain the first-line drugs for the treatment of leishmaniasis regardless their high toxicity, resistance emergency and treatment failure (Sundar, 2001; WHO, 2010). Other drugs such as pentamidine, amphotericin B and miltefosine have limited use due to their high cost, severe side effects or resistance (Sánchez-Cañete et al., 2009; WHO, 2010). Plants are a rich source of new molecules for pharmaceutical purposes, either as a source of compounds or as a model for the designing of new ones (Cragg and Newman, 2013). In the last decades, there has been a renewed interest in natural products as source of new drugs, including anti-infective substances (Butler, 2004; Cragg and Newman, 2013).

Species of the genus *Hypericum* (Hypericaceae) have been traditionally used in different parts of the world as antiseptic, diuretic, stomachic, wound healing and antimicrobial agents (von Poser et al., 2006), and several reports have confirmed their therapeutic potential. Recently, our group demonstrated that the lipophilic extract and isolated compounds (benzopyrans HP1, HP2, HP3 and dimeric phloroglucinol uliginosin B) from *H. polyanthemum* present antiprotozoal activity against *Trichomonas vaginalis* (Cargnin et al., 2013). Moreover, extracts of *H. lanceolatum* and phloroglucinol derivatives of *H. erectum* presented pronounced antiplasmodial activity (Moon, 2010; Zofou et al., 2011), while samples of *H. perforatum* macerated in olive oil exerted mild inhibitory activity against *Trypanosoma rhodesiense* (Orhan et al., 2013).

Considering the current problems related to antileishmanial drugs and the increasing need for alternatives that may lead to development of new medicines, this study investigated the leishmanicidal activity of lipophilic extract of eight *Hypericum* species against *L. amazonensis* and their cytotoxicity on macrophages. To determine the major compounds present in the extracts (Fig. 1), analyses by high performance liquid chromatography (HPLC) were performed.

Materials and methods

Plant material

Aerial parts of eight *Hypericum* species in flowering stage were collected (Table 1). Plants were identified by Dr. Sérgio Bordignon (UNILASALLE, RS, Brazil) and voucher specimens were deposited in the herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN). Plant collection was authorized by Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA-003/2008 P 02000.001717/2008-60) and Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre of the Republic of Peru (0147-2010-AG-DGFFS-DGEFFS).

Extraction procedures

Dried and powered plant materials (50 g) were thoroughly extracted (5 × 24 h at 25 °C) by static maceration with *n*-hexane (5 × 500 ml) (F. Maia, Cotia, São Paulo, Brazil). Extracts were evaporated to dryness under reduced pressure (Rotavapor 8020 Fisatom®) yielding 1.9% (*H. andinum*), 3.0% (*H. brevistylum*), 2.0% (*H. caprifoliatum*), 4.0% (*H. carinatum*), 3.8% (*H. linoides*), 3.6% (*H. myrianthum*), 2.5% (*H. polyanthemum*) and 2.8% (*H. silenoides*). The

extracts were stored at –20 °C until biological evaluation and analysis (Barros et al., 2013a).

HPLC analysis

A Shimadzu liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a DGU-20A5 degasser, LC-6AD pumps, SIL-10AD auto sampler, CTO-20AC column oven, SPD-20AV UV/VIS detector and CBM-20A communications module was employed. LC Solution 1.24 SP2 software was used to record and process the data.

Acetonitrile (CH₃CN) and methanol (MeOH) were HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany); trifluoroacetic acid (TFA) was reagent grade (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil) and distilled water (H₂O) was purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The separations were performed with Waters Nova Pack C18 column (4 μm, 3.9 mm × 150 mm) and Waters Nova-Pack C18 60 Å guard column (3.9 mm × 20 mm). Benzophenones (1 = cariphenone A; 2 = cariphenone B) and benzopyrans (3 = 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP1); 4 = 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP2); 5 = 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP3)) were eluted with an isocratic mobile phase system consisting of CH₃CN:H₂O (60:40, v/v) and detection at 270 nm. Dimeric phloroglucinols (6 = hyperbrasilol B; 7 = japonicin A; 8 = uliginosin B) were also eluted with an isocratic mobile phase system but consisting of CH₃CN:H₂O (95:5, v/v) containing 0.01% of TFA and detection at 220 nm.

The extracts, completely dissolved in MeOH, were filtered (0.22 μm pore size, Merck) and analyzed at room temperature (25 °C), at a flow rate of 1 ml/min. The injection volume was of 20 μl. Peaks were identified by comparison of their retention times (Rt) (1 = 8.0 min; 2 = 6.2 min; 3 = 8.2 min; 4 = 11.5 min; 5 = 19.4 min; 6 = 8.8 min; 7 = 5.7 min; 8 = 7.3 min) and co-injection with authentic standards isolated from *Hypericum* species (benzophenones 1 and 2 from *H. carinatum*; benzopyrans 3 – 5 from *H. polyanthemum*; dimeric phloroglucinol 6 from *H. caprifoliatum*, 7 and 8 from *H. myrianthum*) (Bernardi et al., 2005; Dall'agnol et al., 2005; Ferraz et al., 2001; Nör et al., 2004). The identity and purity of compounds were confirmed by ¹H-NMR spectroscopy (Eft-60®, Anasazi Instruments). Calibration curves described by Barros et al. (2013a,b) were used to quantify the metabolites. The benzophenone 2 and dimeric phloroglucinols 6 and 7 were determined with 1 and 8 calibration curves, respectively. The yields were expressed as mean of three injections in mg of compound per g of extract (mg/g extract).

L. (L.) amazonensis culture

The MHOM/BR/73/M2269 strain of *L. (L.) amazonensis* were routinely isolated from draining popliteal lymph node of footpad lesions of infected BALB/c mice and maintained as promastigotes in M199 medium containing 40 mM of 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt (HEPES), 0.1 mM adenine, 7.7 mM hemin, 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml of penicillin and 50 μg/ml of streptomycin. Cultures were incubated at 26 °C, and cells were kept at densities ranging between 5 × 10⁵ and 3 × 10⁷ parasites/ml (Romão et al., 2006). All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the National Institute of Health and Brazilian Society for Science on Animals of Laboratory with the approval of local Ethics Committee from Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (process number 11-061).

Determination of leishmanicidal activity in vitro

Promastigote forms of *L. amazonensis* (3 × 10⁶ on stationary phase) were plated in 96 well microtiter plates in four replicates

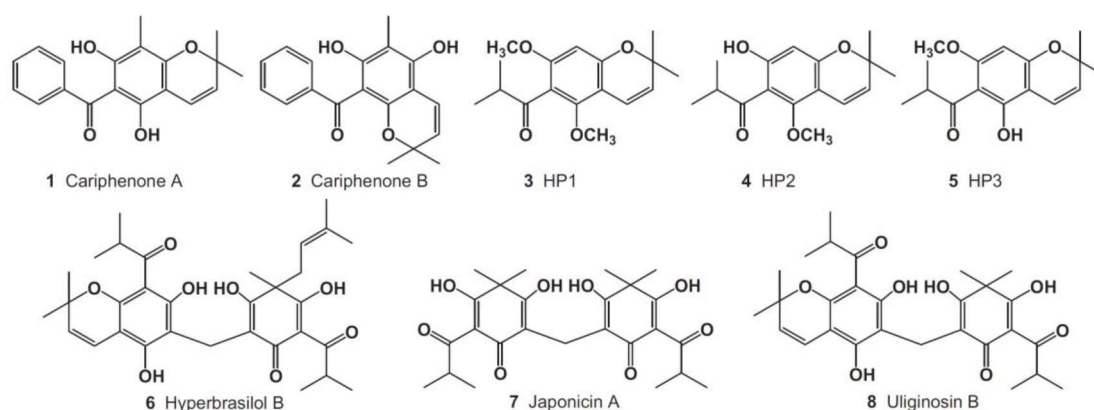


Fig. 1. Constituents investigated in *n*-hexane extracts of the *Hypericum* species.

and incubated with M199 medium supplemented with 10% FBS in the presence or absence *Hypericum* extracts (0 – 1000 $\mu\text{g/ml}$) for 48 h. Amphotericin B (Sigma, USA) at 4 $\mu\text{g/ml}$ was used as standard antileishmanial drug (100% of mortality). Control cells were incubated with M199 medium containing less than 0.05% of polysorbate 80 (Tween 80). Parasites viability was evaluated from motility after 48 h and cell density was determined using a hemocytometer. The survival rate was calculated according to the formula: percentage survival = (average number of viable parasites in treated group/average number of viable untreated parasites) \times 100. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values for each extract were determined by linear regression analysis using GraphPad Software, version 5.0.

Macrophages viability

The macrophages viability was measured by a colorimetric assay using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Peritoneal macrophages were harvested from BALB/c mice which 3 days previously had been injected i.p. with 2 ml of sterile thioglycollate solution (3% w/v in PBS). The cells were plated at 2×10^5 cells/0.2 ml in RPMI 1640 plus 10% FBS, 100 U/ml penicillin and streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) in 96 well microtiter plates and were incubated overnight at 37 $^\circ\text{C}$ in an atmosphere of 5% CO_2 . Then, plates were washed prior to being cultured for 44 h at 37 $^\circ\text{C}$ in RPMI or medium plus different concentrations of *Hypericum* extracts (0 – 1000 $\mu\text{g/ml}$). Subsequently, MTT (5 mg/ml in PBS) was added (20 $\mu\text{l/well}$) and incubations were continued 4 h afterwards. The purple formazan product which is formed by the action of mitochondrial enzymes in living cells was solubilized by addition of acidic isopropanol, and the absorbance at 570 nm measured using a Spectramax M2 (Pal et al., 2011; Romão et al., 1999). The concentration of extract that causes 50% of macrophage cytotoxicity (CC_{50}) was determined by linear regression analysis using

GraphPad Software, version 5.0. The selectivity index (SI) of the extracts was determined considering the following equation: CC_{50} against mammalian cells/ IC_{50} against *L. amazonensis*.

Statistical analysis

The statistical analysis was determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. The analyses were performed with GraphPad Software and values of $p < 0.05$ were considered significant. All experiments were performed at least three times and in quadruplicate.

Results

The addition of *H. linoides*, *H. carinatum* and *H. polyanthemum* extracts directly to promastigotes of *L. amazonensis* resulted in dose-dependent parasite killing (Fig. 2A). After 48 h incubation, *H. polyanthemum* at concentrations 31.2 and 62.5 $\mu\text{g/ml}$ showed moderate to high leishmanicidal activity reducing the parasite viability in an order of 27.5% and 98.8%, respectively (Fig. 2A). The IC_{50} value of *H. polyanthemum* was calculated to be 36.1 $\mu\text{g/ml}$ (Table 2). As illustrated in Fig. 2C and D, *H. polyanthemum* at 125 $\mu\text{g/ml}$ led to total lysis of the parasites. In addition, it was observed that *H. carinatum* and *H. linoides* at 62.5 $\mu\text{g/ml}$ killed the parasite in 42.2% and 31.6%, respectively when compared to the control group (Fig. 2A). As expected, amphotericin B, the reference antileishmanial drug, was the most active against *L. amazonensis* (IC_{50} 48 h = 0.12 $\mu\text{g/ml}$) (data not shown).

The effect on the viability of macrophages of the most active extracts (*H. carinatum*, *H. linoides* and *H. polyanthemum*) against infective forms of *L. amazonensis* was also investigated. In general, these extracts showed low cytotoxicity (Fig. 2B). It was verified that the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}), and selectivity index

Table 1
Collection data of the *Hypericum* species.

Species (voucher number)	Collection locality (harvest)
<i>H. andinum</i> Gleason (Ccana-Ccapatinta et al. 05)	Amparaes, Cuzco, Peru (May, 2008)
<i>H. brevistylum</i> Choisy (Ccana-Ccapatinta et al. 03)	Pumahuanca, Cuzco, Peru (May, 2008)
<i>H. caprifoliatum</i> Cham. & Schltdl. (Bordignon et al. 2287)	Porto Alegre, RS, Brazil (October – December, 2008)
<i>H. carinatum</i> Griseb. (Bordignon and Ferraz 2309)	Glorinha, RS, Brazil (October – December, 2008)
<i>H. linoides</i> A. St.-Hil. (Bordignon et al. 3317)	São José dos Ausentes, RS, Brazil (October – December, 2008)
<i>H. myrianthum</i> Cham. & Schltdl. (Bordignon et al. 3059)	Paraíso do Sul, RS, Brazil (October – December, 2008)
<i>H. polyanthemum</i> Klotzsch ex Reichardt (Bordignon et al., 3118)	Caçapava do Sul, RS, Brazil (October – December, 2008)
<i>H. silenoides</i> Juss. (Ccana-Ccapatinta et al. 01)	Pumahuanca, Cuzco, Peru (May, 2008)

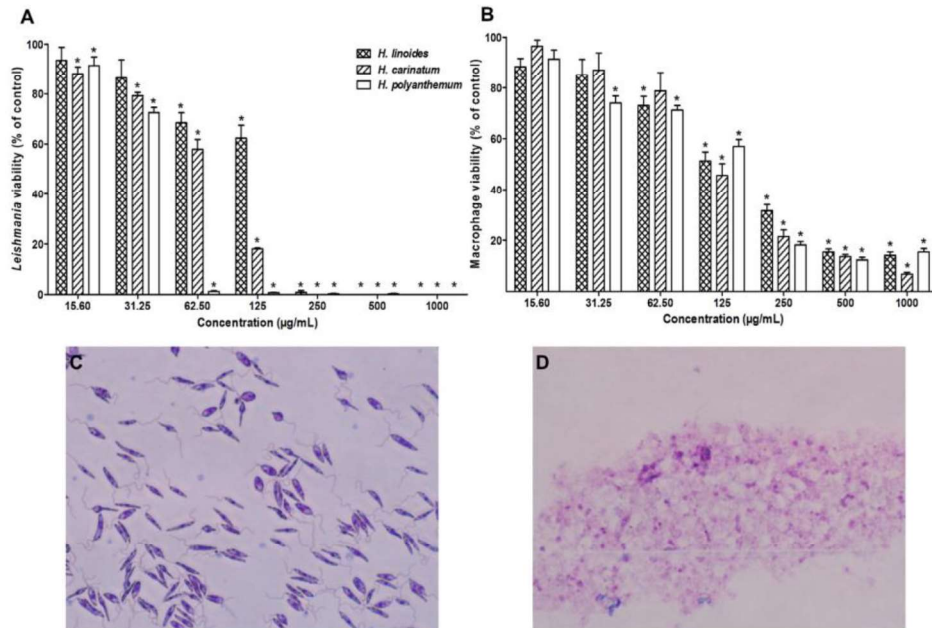


Fig. 2. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *H. polyanthemum*, *H. carinatum* and *H. linoides* extracts. Promastigote forms of *L. amazonensis* (A) and peritoneal murine macrophages (B) were treated with medium or *Hypericum* extracts (15.6 – 1000 µg/ml) for 48 h. *Leishmania* survival was determined using a hemocytometer and the macrophages viability by the MTT assay. *L. amazonensis* integrity after exposure to medium or *H. polyanthemum* at 125 µg/ml can be visualized in panels C and D, respectively (panoptic stain – 400× magnification). Data are reported as means ± SEM of four replicates and are representative of three experiments. Statistically significant different with **p* < 0.05 compared with control (ANOVA followed by Bonferroni's test).

values (CC₅₀/IC₅₀) ranged from 118.6 to 144.7 µg/ml and 1.2 to 4, respectively (Table 2).

The leishmanicidal activity of *H. myrianthum* was significantly lower than those found for *H. polyanthemum*, *H. carinatum* and *H. linoides* independently of the tested concentration (data not shown). *Hypericum brevistylum* and *H. caprifoliatum* showed significant leishmanicidal activity only at high concentrations. These extracts at 500 µg/ml were able to reduce the viability in an order of 90% and 55%, respectively. In addition, the concentration of 1000 µg/ml induced 100% and 82.5% of mortality, respectively. In contrast, *H. andinum* and *H. silenoides* did not show significant leishmanicidal effect even at the highest concentration (data not shown).

The results of HPLC analysis are shown in Table 3. HPLC profile of the most active extract (*H. polyanthemum*) can be visualized in Fig. 3. All the plants presented the dimeric phloroglucinol **8**. The extracts of *H. linoides* and *H. myrianthum* presented the highest concentration of **6** and **7**, respectively. Confirming previous reports (Barros et al., 2013b; Bernardi et al., 2005; Cargnin et al., 2013; Ferraz et al., 2001), benzophenones **1** and **2** were found exclusively in *H. carinatum*, while benzopyrans **3**, **4** and **5** were detected only in *H. polyanthemum*.

Discussion

This is the first study reporting the leishmanicidal activity for *Hypericum* species on *L. amazonensis*. Here, it was demonstrated that depending on the dose, the lipophilic extracts of *H. polyanthemum*, *H. carinatum*, *H. linoides*, *H. myrianthum*, *H. caprifoliatum* and *H. brevistylum* were able to kill infective forms of *L. amazonensis*, one of the main agent of cutaneous leishmaniasis in the world (Carvalho et al., 1994; França-Costa et al., 2012). The current treatment of leishmaniasis presents problems such as drug resistance, variable or low efficacy, high cost, side effects, besides others (Sánchez-Cañete et al., 2009; Sundar, 2001; WHO, 2010). Considering this, the search for new active compounds may lead to the discovery of more efficient medicines for the treatment of leishmaniasis. It is interesting to note that different extracts of *Hypericum* spp. present activity against protozoa as *Plasmodium* sp., *Trypanosoma* sp. and *Trichomonas* sp. (Cargnin et al., 2013; Moon, 2010; Orhan et al., 2013; Verotta et al., 2007; Zofou et al., 2011), confirming this potential.

Significant differences in the leishmanicidal activity of extracts obtained from different *Hypericum* species were observed. *Hypericum polyanthemum* presented the highest activity

Table 2
Leishmanicidal activity and macrophages cytotoxicity of extracts of *Hypericum* species at 48 h.

<i>Hypericum</i> species	IC ₅₀ ^a , µg/ml (95% CI)	CC ₅₀ ^b , µg/ml (95% CI) ^c	SI ^d
<i>H. polyanthemum</i>	36.12 (30.25 – 43.13)	144.7 (91.68 – 228.3)	4
<i>H. carinatum</i>	64.99 (51.90 – 81.38)	118.6 (87.34 – 161)	1.8
<i>H. linoides</i>	111.9 (65.04 – 192.70)	137.1 (108.4 – 173.4)	1.2

^a IC₅₀: concentration of extract that causes 50% of mortality of *L. amazonensis*.

^b CC₅₀: concentration of extract that causes 50% of macrophage cytotoxicity.

^c 95 CI: 95% confidence interval.

^d SI: selectivity index, calculated as ratio of CC₅₀ for macrophage/IC₅₀ for *L. amazonensis*.

Table 3
Content of the major compounds present in the lipophilic extract of the investigated *Hypericum* species.

<i>Hypericum</i> species	Compounds (mg/g extract)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>H. andinum</i>	–	–	–	–	–	–	–	16.60
<i>H. brevistylum</i>	–	–	–	–	–	1.08	–	68.98
<i>H. caprifoliatum</i>	–	–	–	–	–	–	2.79	0.60
<i>H. carinatum</i>	0.83	5.76	–	–	–	–	–	16.48
<i>H. linoides</i>	–	–	–	–	–	13.98	14.41	1.92
<i>H. myrianthum</i>	–	–	–	–	–	–	70.51	35.97
<i>H. polyanthum</i>	–	–	356.99	426.84	109.77	–	–	0.54
<i>H. silenoides</i>	–	–	–	–	–	–	–	42.27

1 = cariphenone A; **2** = cariphenone B; **3** = 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP1); **4** = 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP2); **5** = 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP3); **6** = hyperbrasilol B; **7** = japonicin A; **8** = uliginosin B; –, not detected.

(*H. polyanthum* > *H. carinatum* > *H. linoides* > *H. myrianthum* > *H. brevistylum* > *H. caprifoliatum*). It is noteworthy to notice that this is the only species that accumulate benzopyrans **3** – **5** (Table 3, Fig. 3) (Barros et al., 2013a,b; Cargnin et al., 2013; Ferraz et al., 2001).

In the present study, the IC₅₀ values of *H. polyanthum*, *H. carinatum* and *H. linoides* *n*-hexane extracts against promastigotes of *L. amazonensis* ranged from 36 to 112 µg/ml. Recently, Cargnin et al. (2013) demonstrated that the supercritical fluid extract of *H. polyanthum* at 206.98 µg/ml reduced the viability of *Trichomonas vaginalis* in 50%, while its main isolated compounds (**3**, **4**, **5** and **8**) at 62.5 µg/ml decreased the parasite viability in 50%, 20%, 10% and 50%, respectively. In the present study, at 62.5 µg/ml the *n*-hexane extract of *H. polyanthum* caused an inhibition of 90% in

the *Leishmania* viability, showing an IC₅₀ value of 5.7 times lower. It is important to consider that the difference in the susceptibility of these pathogens might be due to a higher selectivity of *H. polyanthum* extract against *L. amazonensis* and/or a synergistic effect of its compounds. In this context, Grivicich et al. (2008) demonstrated that in association, **3**, **4** and **5** were more potent in inhibiting the growth of U-373 MG cells, a glioblastoma cell line, when compared to the independent effect of each isolated one. Thus, such compounds seem to be very interesting candidates to future studies against protozoa pathogens.

According to the literature, extracts and more lipophilic compounds tend to favor the anti-protozoa activity (Cargnin et al., 2013; Maciel-Rezende et al., 2013). Alkyl-substituted benzophenones, for example, demonstrated to be more active than their hydroxylated

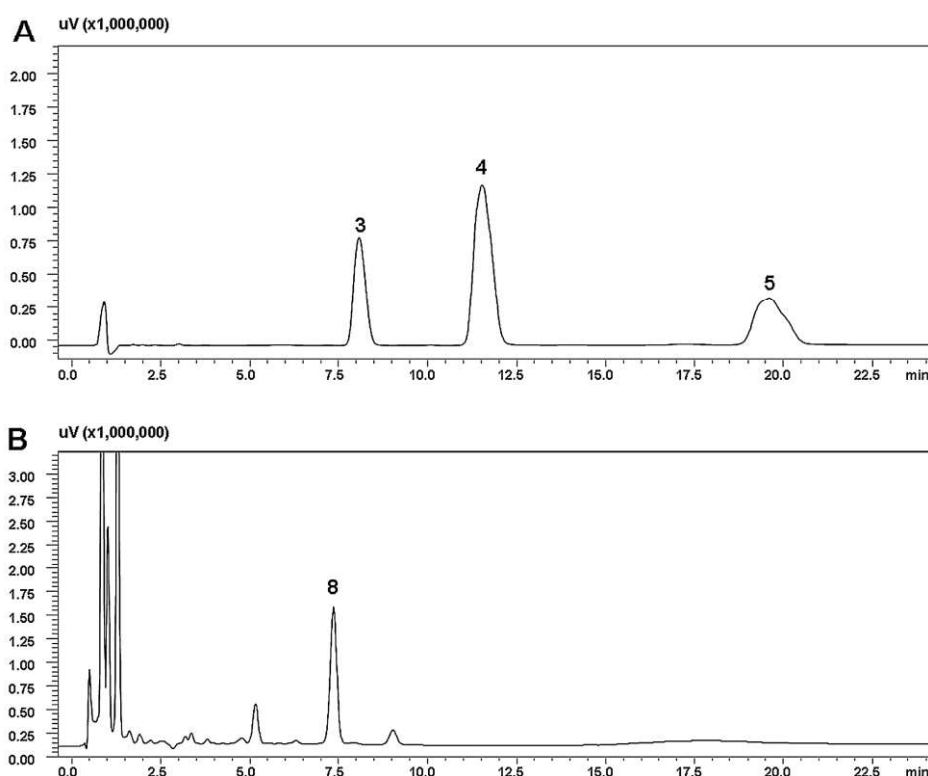


Fig. 3. HPLC profile of *n*-hexane extract of *Hypericum polyanthum*. Stationary phase: Waters Nova Pack C18 column (4 µm, 3.9 mm × 150 mm) and Waters Nova-Pack C18 60 Å guard column (3.9 mm × 20 mm). (A) Isocratic elution (60% CH₃CN, 40% H₂O) and detection at 270 nm. **3**, HP1 (8.2 min); **4**, HP2 (11.5 min); **5**, HP3 (19.4 min). (B) Isocratic elution (95% CH₃CN, 5% H₂O, 0.01% TFA) and detection at 220 nm. **8**, Uliginosin B (7.3 min).

precursors suggesting that an increase in lipophilicity of these compounds could facilitate the protozoa membrane permeation (Maciel-Rezende et al., 2013). Similar hypothesis was confirmed by Cargnin et al. (2013) that demonstrated the action of **3**, **4**, **5** and **8** on membranes of *T. vaginalis*. Alterations in respiratory chain of *L. donovani* were also observed to benzophenone-derived bisphosphonium salts with intermediate hydrophobicity (Luque-Ortega et al., 2010).

Considering the wide occurrence of phloroglucinol derivatives in *Hypericum*, other species of the genus should be investigated. The well-studied species *H. perforatum*, for example, contains very lipophilic phloroglucinol derivatives such as hyperforin and adhyperforin that were not still investigated for leishmanicidal activity.

Conclusion

The results of the present research exhibit for the first time that *H. polyanthemum*, *H. carinatum* and *H. linooides* present significant activity against *L. amazonensis*. Under this point of view *H. polyanthemum* extract might be investigated as a promising candidate for antileishmanial treatment. Further studies are being conducted to elucidate the mechanism of action.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, CAPES-PNPD-23038007200/11-08), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-307277/2013-5) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS-1017479) for financial support and by fellowships from CAPES (APD, FMCB, JSP) and CNPq (PRTR, GLvP) and the PEC-PG program of CAPES/CNPq (GVCC).

References

- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Júnior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M., Johnson Jr., W.D., 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 536–546.
- Barros, F.M.C., Pippi, B., Dresch, R.R., Dauber, B., Luciano, S.C., Apel, M.A., Fuentesfria, A.M., von Poser, G.L., 2013a. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. *Industrial Crops and Products* 44, 294–299.
- Barros, F.M.C., Ccana-Capatinta, G.V., Meirelles, G.C., Nunes, J.M., Cargnin, S.T., Sakamoto, S., Bordignon, S., del Carpio, C., Crockett, S.L., von Poser, G.L., 2013b. Determination of phenolic compounds in flowers of *Hypericum* species native to South Brazil and Peruvian Páramos. *Plant Syst. Evol.* 299, 1865–1872.
- Bernardi, A.P.M., Ferraz, A.B.F., Albring, D.V., Bordignon, S.A.L., Schripsema, J., Bridi, R., Dutra-Filho, C.S., Henriques, A.T., von Poser, G.L., 2005. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. *J. Nat. Prod.* 68, 784–786.
- Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2141–2153.
- Cargnin, S.T., Vieira Pde, B., Cibulski, S., Cassel, E., Vargas, R.M., Montanha, J., Roehle, P., Tasca, T., von Poser, G.L., 2013. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitol. Int.* 62, 112–117.
- Carvalho, E.M., Barral, A., Costa, J.M., Bittencourt, A., Marsden, P., 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 56, 315–325.
- Convit, J., Ulrich, M., Fernández, C.T., Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Castés, M., Rondón, A.J., 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 444–448.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3670–3695.
- Dall'agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A.P., Albring, D., Nör, C., Schapoval, E.E., von Poser, G.L., 2005. Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytother. Res.* 19, 291–293.
- Ferraz, A.B.F., Bordignon, S., Staats, C., Schripsema, J., von Poser, G., 2001. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry* 57, 1227–1230.
- França-Costa, J., Wanderley, J.L., Deolindo, P., Zarattini, J.B., Costa, J., Soong, L., Barcinski, M.A., Barral, A., Borges, V.M., 2012. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS One* 7, e36595.
- García-Hernández, R., Manzano, J.L., Castans, S., Gamarro, F., 2012. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1974.
- Grivicich, I., Ferraz, A., Faria, D.H., Regner, A., Schwartzmann, G., Henriques, A.T., von Poser, G.L., da Rocha, A.B., 2008. Synergistic effect of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum* in U-373 MG glioblastoma cell line. *Phytother. Res.* 22, 1577–1580.
- Luque-Ortega, J.R., Reuther, P., Rivas, L., Dardonville, C., 2010. New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II. *J. Med. Chem.* 53, 1788–1798.
- Maciel-Rezende, C.M., de Almeida, L., Costa, E.D., Pires, F.R., Alves, K.F., Viegas Junior, C., Dias, D.F., Doriguetto, A.C., Marques, M.J., dos Santos, M.H., 2013. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3114–3119.
- McMahon-Pratt, D., Alexander, J., 2004. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol. Rev.* 201, 206–224.
- Moon, H.L., 2010. Antiplasmodial and cytotoxic activity of phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum* thunb. *Phytother. Res.* 24, 941–944.
- Mutiso, J.M., Macharia, J.C., Kiio, M.N., Ichagichu, J.M., Rikoi, H., Gicheru, M.M., 2013. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *J. Biomed. Res.* 27, 85–102.
- Nör, C., Albring, D., Ferraz, A.B.F., Schripsema, J., Pires, V., Sonnet, P., Guillaume, D., von Poser, G.L., 2004. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. *Biochem. Syst. Ecol.* 32, 517–519.
- Orhan, I.E., Kartal, M., Gulpinar, A.R., Cos, P., Matheussen, A., Maes, L., Tadmair, D., 2013. Assessment of antimicrobial and antiprotozoal activity of the olive oil macerate samples of *Hypericum perforatum* and their LC – DAD – MS analyses. *Food Chem.* 138, 870–875.
- Pal, D., Bhattacharya, S., Baidya, P., De, B.K., Pandey, J.N., Biswas, M., 2011. Antileishmanial activity of *Polyalthia longifolia* leaf extract on the *in vitro* growth of *Leishmania donovani* promastigotes. *Glob. J. Pharmacol.* 5, 97–100.
- Romão, P.R., Fonseca, S.G., Hothersall, J.S., Noronha-Dutra, A.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 1999. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology* 118, 559–566.
- Romão, P.R., Tovar, J., Fonseca, S.G., Moraes, R.H., Cruz, A.K., Hothersall, J.S., Noronha-Dutra, A.A., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2006. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 355–363.
- Sánchez-Cañete, M.P., Carvalho, L., Pérez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Castans, S., 2009. Low Plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1305–1313.
- Sundar, S., 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* 6, 849–854.
- Verotta, L., Appendino, G., Bombardelli, E., Brun, R., 2007. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure – activity study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1544–1548.
- von Poser, G.L., Rech, S.B., Rates, S.M.K., 2006. Chemical and pharmacological aspects of Southern Brazilian *Hypericum* species. In: Silva, J.T. (Ed.), *Floriculture. Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. London, pp. 510 – 516.
- World Health Organization (WHO), 2010. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. (http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf) (accessed 24.03.13).
- Zofou, D., Kowa, T.K., Wabo, H.K., Ngemenya, M.N., Tane, P., Titanji, V.P., 2011. *Hypericum lanceolatum* (Hypericaceae) as a potential source of new anti-malarial agents: a bioassay-guided fractionation of the stem bark. *Malaria J.* 10, 167.

4. APÊNDICE: RESULTADOS PARCIAIS DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS DE ESPÉCIES DE *HYPERICUM*

Este elemento pós-textual refere-se aos resultados de avaliação da atividade leishmanicida de compostos de espécies de *Hypericum*, uma vez que os extratos hexânicos de *H. polyanthemum*, *H. carinatum* e *H. linoides* apresentam potente atividade leishmanicida (artigo publicado). Estes dados serão utilizados para a publicação do próximo artigo.

1. Métodos

1.1. Objeto do estudo

Os compostos uliginosina B, isouliginosina B, carifenona A, japonicina A, 6-isobutiril- 5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP1), 7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) e 5-hidróxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP3) de espécies do gênero *Hypericum* foram gentilmente fornecidos pela Dra. Gilsane von Poser (Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS).

1.2. Obtenção de compostos de espécies de *Hypericum*

Os compostos utilizados neste trabalho foram obtidos a partir das partes aéreas das diferentes espécies de *Hypericum*. Para isto, o material vegetal seco e moído de *H. andinum* Gleason, *H. brevistylum* Choisy, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*, e *H. silenoides* Juss. foi extraído exaustivamente por maceração com *n*-hexano. Os extratos foram filtrados e rotaevaporados até a secura sob pressão reduzida e, em seguida, submetidos à extração sólido-liquído com acetona a fim de remover compostos graxos (ceras). As frações solúveis em acetona foram subsequentemente submetidas à sucessivas cromatografias em coluna usando gel de sílica (70–230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany) como fase estacionária e um gradiente de *n*-hexano:diclorometano (100:0 → 0:100) e/ou *n*-hexano:acetato de etila (100:0 → 90:10) como fase móvel [1-3]. Os compostos, HP1, HP2, HP3 (de *H. polyanthemum*), carifenona A (de *H. carinatum*), japonicina A (de *H. myrianthum*), uliginosin B e isouliginosin B (de *H. brevistylum*) foram identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) em comparação

com dados da literatura [1-3]. Posteriormente, os compostos foram armazenados a -20°C até avaliação biológica.

1.3. Avaliação da atividade leishmanicida de compostos de espécies de *Hypericum* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*

No momento do experimento, 10 mg de cada isolado acima foi diluído em 1 ml de tampão fosfato de sódio (PBS) 1X na presença de TWEEN 80 (concentração final máxima de 0,05% em todos os ensaios de viabilidade).

Formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento foram distribuídas em placas de 96 poços (3×10^6 /poço) e em seguida incubadas com M199 (meio controle) ou com diferentes concentrações dos compostos (15,6-500 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas de incubação a viabilidade dos parasitos foi determinada através da contagem das formas promastigotas viáveis em câmara de Neubauer. Todos os testes foram realizados em quadruplicata e os experimentos repetidos no mínimo duas vezes.

1.4. Avaliação da atividade leishmanicida de macrófagos tratados *in vitro* com compostos de *Hypericum*

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram ajustados para a concentração de 1×10^6 /mL em meio RPMI incompleto e então distribuídos em placas de 96 poços em um volume de 100 μL /poço. Após 2 horas de incubação, a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO_2 , as células não aderentes foram removidas e os macrófagos aderentes cultivados por 16-18 horas em presença de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após este período as células foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* na razão de 5:1 (parasitos/célula) na presença de RPMI incompleto. Após 4 horas de cultura, os macrófagos foram lavados para remoção dos parasitos não internalizados e incubados com RPMI completo, RPMI + LPS (10 ng/mL)/IFN- γ (1 ng/mL) ou com diferentes concentrações dos compostos de carifenona A, isouliginosina B, japonicina A e uliginosina B por 48 horas. Após esse período, o sobrenadante foi removido para determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) e as células aderentes foram incubadas com 100 μL de M199 contendo 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS) durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 μL de M199 suplementado com 30% de SFB para permitir o crescimento de formas promastigotas a 26°C . A atividade leishmanicida dos macrófagos foi avaliada através da determinação do número de

parasitos viáveis em câmara de Neubauer após liberação de formas amastigotas, transformação em promastigotas e crescimento. As análises foram realizadas em quadruplicatas e o experimento foi repetido no mínimo duas vezes.

1.5. Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados e estimulados *in vitro*

A concentração de NO no sobrenadante de macrófagos infectados e ativados como acima descritos foi determinada através da reação de Griess [4].

1.6. Ensaio de hemólise

Este teste foi realizado com os compostos mais ativos contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (carifenona A, isouliginosina B, japonicina A e uliginosina B). O ensaio hemolítico foi realizado de acordo com Gauthier et al. [5] com algumas modificações. Amostra de sangue humano do tipo O+ foi coletado com EDTA e centrifugado a 2000 rpm durante 5 minutos. A fração de hemácias foi submetida a cinco ciclos de lavagens e ressuspendida em PBS 1X para obter uma suspensão de hemácias a 1%. Um volume de 160 µl da solução de hemácias foi distribuído em microplacas de 96 poços e em seguida adicionou-se 40 µl dos diferentes compostos para se obter uma concentração variando de 1,9 – 1.000 µg/mL. A microplaca foi incubada a 37 °C sob agitação (90 rpm) durante 60 min. A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante transferido para outra microplaca. A absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm em espectrofotômetro de placas (Spectramax 2M). Cada experimento foi realizado duas vezes e em triplicada. Como controle positivo foi utilizado SDS 0,1% e como controle negativo PBS 1X. Os testes foram realizados em quadruplicata e o experimento repetidos no mínimo duas vezes. A percentagem de hemólise atribuída aos compostos foi comparada à hemólise induzida por SDS 0,1% (considerada como 100% de hemólise) de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{absorbância do isolado} - \text{absorbância do branco}}{\text{absorbância do controle com SDS 0,1\%}}$$

1.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de no mínimo dois experimentos a partir da média das quadruplicatas de cada medida. Diferenças estatisticamente significativas nos testes de atividade leishmanicida (promastigotas e amastigotas) e de citotoxicidade em hemácias foram determinadas através de análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em todos os testes utilizados, foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças onde $p < 0,05$. A concentração requerida para inibir o crescimento em 50% dos parasitas (IC_{50}) foi determinada por regressão linear. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa de análise estatística Graphpad Prism.

2. Resultados e discussão

Este estudo é o primeiro a demonstrar que compostos de diferentes espécies de *Hypericum* tiveram um efeito inibitório sobre *L. amazonensis*. Dentre os sete compostos testados, carifenona A, isouliginosina B, japonicina A e uliginosina B reduziram de modo dose-dependente a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 1A-1D). Carifenona A na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e isouliginosina B na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ mataram 100% dos parasitos após 48 h de incubação. A mortalidade induzida por isouliginosina B na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ foi de 61,5%. Nesta mesma concentração a uliginosina B e a japonicina A reduziram a viabilidade das formas promastigotas em 51% e 40%, respectivamente.

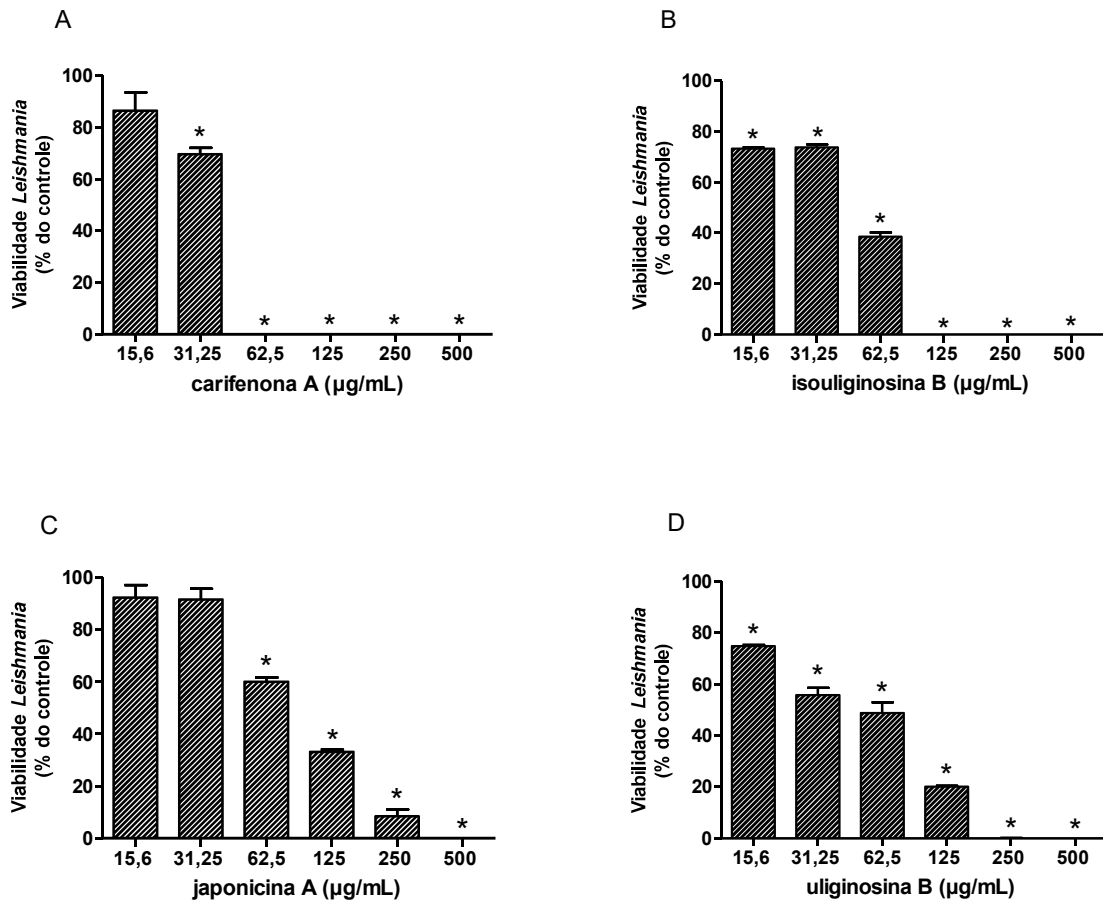


Figura 1: Efeito dos compostos de espécies de *Hypericum* sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas (3×10^6 /mL) a 26°C com meio M199, na ausência ou presença de diferentes concentrações (0-500 µg/mL) de carifenona A (A), isouliginosina B (B), japonicina A (C) e uliginosina B (D) durante 48 horas. A viabilidade parasitária foi determinada através da contagem de formas promastigotas viáveis em câmara de Neubauer. A figura é representativa de 3 experimentos em quadruplicata. O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle (100% viabilidade). Foi utilizada a análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni.

No presente trabalho, polifenóis como isouliginosina B, japonicina A e uliginosina B apresentaram significativa atividade contra promastigotas de *L. amazonensis*. Talvez a similaridade química destes derivados diméricos de floroglucinol possa ter correlação com a ação biológica encontrada, já que estes três compostos apresentam semelhanças químicas como a presença de dois núcleos (benzopirano e/ou ácido filicínico) ligados por uma ponte metilênica (Figura 2) [6].

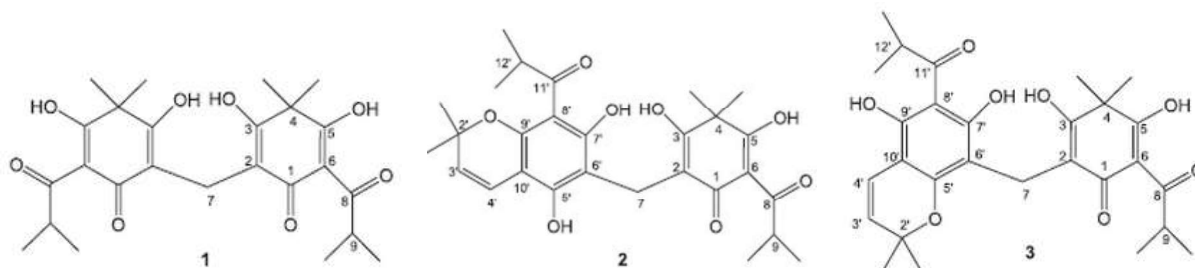


Figura 2. Estrutura química dos derivados de floroglucinóis: japonicina (1), uliginosina B (2) e isouliginosina (3). Fonte: França et al., 2009 [6].

Neste sentido, Hay e colaboradores evidenciaram a ação anti-*Leishmania* de polifenóis isolados de cascas de tronco de *G. vieillardii* Pierre. Pancixantona A, 1,6-dihidroxixantona, clusiacromeno e 3-geranil-2,4,6 trihidroxibenzofenona foram ativas contra formas promastigotas de *L. infantum* e *L. mexicana* com valores de CI_{50} que variam de 3,2 - 28 $\mu\text{g/mL}$ [7].

Através da determinação dos valores de CI_{50} dos compostos carifenona A, isouliginosina B, uliginosina B e japonicina A para formas promastigotas de *L. amazonensis* foi possível concluir que isoladamente os três primeiros compostos apresentam potencial leishmanicida equivalente (Tabela 1), enquanto a japonicina A apresentou um valor de CI_{50} cerca de duas vezes superior a carifenona A.

Tabela 1: Valores de CI_{50} para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Compostos	CI_{50}^a , $\mu\text{g/mL}$ (95% IC^b)
carifenona A	35,46 (28,27 – 44,47)
isouliginosina B	43,96 (28,43 – 67,98)
uliginosina B	42,65 (28,23 – 64,42)
japonicina A	82,18 (70,08 – 96,37)

CI_{50}^a : concentração do isolado que causa 50% da morte do parasito.

IC^b : intervalo de confiança de 95%.

Os resultados encontrados para carifenona A ($CI_{50} = 35,46 \mu\text{g/mL}$) corroboram com os achados de Dagnino e colaboradores [8] em relação à ação leishmanicida do extrato *n*-hexânico de *H. carinatum* (CI_{50} de 64,99 $\mu\text{g/mL}$ sobre promastigotas de *L. amazonensis*), sugerindo que a ação do extrato possa estar relacionada à presença da carifenona A naquele extrato. A ação leishmanicida de outras benzofenonas tem sido descrita. Neste sentido,

demonstrou-se que benzofenonas isoladas de *G. brasiliensis* possuem ação contra promastigotas de *L. amazonensis* (7-epiclusianona $CI_{50}=3,33$; garciniafenona $CI_{50}=5,04$ e guttiferona-a $CI_{50}= 18,12 \mu\text{g/mL}$) [9]. A atividade leishmanicida também foi encontrada para benzofenonas sintéticas com valores de CI_{50} entre 4,9 – 23,8 $\mu\text{g/mL}$ sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* [10]. Diante destes valores de CI_{50} mais baixos que aqueles determinados para carifenona A no nosso estudo, seria interessante testar derivados sintéticos de benzofenonas de *H. carinatum*. Com o aumento da sua lipofilicidade através da mudança de seu radical, a benzofenona sintética poderia apresentar uma maior ação anti-*Leishmania* quando comparada com a benzofenona isolada diretamente da planta.

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o extrato hexânico de *H. polyanthemum* apresentou significativa atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis in vitro* [8]. Entre os compostos majoritários de *H. polyanthemum* destacam-se os benzopiranos chamados HP1, HP2 e HP3 [11]. Diante disto, testou-se a atividade destes compostos contra promastigotas de *L. amazonensis* e apenas o HP2 apresentou uma modesta atividade leishmanicida (Figura 3B).

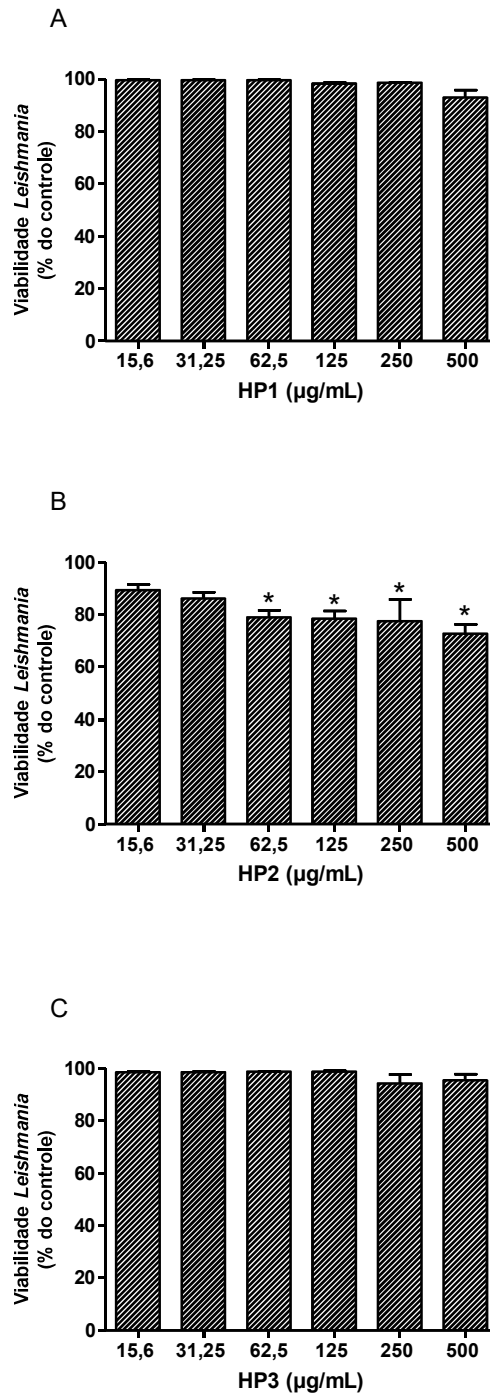


Figura 3: Efeito dos compostos de espécies de *Hypericum* sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas (3×10^6 /mL) a 26°C com meio M199, na ausência ou presença de diferentes concentrações (0-500 µg/mL) de HP1 (A), HP2 (B) e HP3 (C) durante 48 horas. A viabilidade parasitária foi determinada através da contagem de formas promastigotas viáveis em câmara de Neubauer. A figura é representativa de 3 experimentos em quadruplicata. O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle (100% viabilidade). Foi utilizada a análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni.

Em trabalho publicado por Cargnin e colaboradores foi demonstrado que estes benzopiranos foram ativos contra *T. vaginalis* [12]. Neste estudo os autores demonstraram que na concentração de 62,5 µg/mL tanto uliginosina B como HP1 reduziram em 50% a viabilidade de formas trofozoítas de *T. vaginalis in vitro*, enquanto que os benzopiranos HP2 e HP3 reduziram em torno de 20% e 10% a viabilidade, respectivamente. No nosso estudo, a uliginosina B apresentou potencial leishmanicida superior àquele apresentado pelo isolado HP2. Enquanto que HP1 e HP3 não apresentaram nenhum efeito significativo. Deve-se levar em consideração de que se trata de dois protozoários que apresentam diferenças genéticas e moleculares que podem explicar as diferentes suscetibilidades aos benzopiranos.

Diante disto, testou-se o efeito da associação dos benzopiranos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Quando os compostos HP1, HP2 e HP3 foram testados em associação (figura 4A-D) nas concentrações de 75 e 90 µg/mL houve redução da viabilidade de promastigotas para os níveis de 32% e 43%, respectivamente (figura 4D). Contudo, esta atividade não foi maior que aquela encontrada com o extrato hexânico de *H. polyanthemum* (dados publicados $CI_{50} = 36,12 \mu\text{l/mL}$). Observou-se que a associação de HP1 e HP2, bem como de HP2 e HP3 não apresentou qualquer alteração na viabilidade dos parasitos em nenhuma das concentrações testadas. A associação de HP1 e HP3 nas maiores concentrações testadas reduziu em cerca de 25% a viabilidade de *L. amazonensis*.

Vale salientar, que apesar das baixas concentrações de uliginosina B nos extratos testados, constituindo, portanto um dos compostos minoritariamente presente nos mesmos, a atividade deste isolado se mostrou uma das mais potentes. No extrato de *H. polyanthemum* foi encontrado tanto uliginosina B como os três benzopiranos HP1, HP2 e HP3. Assim, sugere-se que a ação deste extrato sobre *Leishmania* pode ser decorrente da ação conjunta destes compostos uma vez que a uliginosina B embora em baixas concentrações apresenta atividade. É possível que os benzopiranos possam facilitar a entrada da uliginosina B, atuando sobre a membrana lipídica do parasito. Isto porque os compostos estudados são lipofílicos e esta característica de lipofilicidade é de extrema importância no delineamento de drogas antiparasitárias [13, 14]. Desta maneira, testes com a associação de uliginosina B + HP1, uliginosina B + HP2 e uliginosina B + HP3 são necessários para avaliação de possível sinergismo entre os compostos.

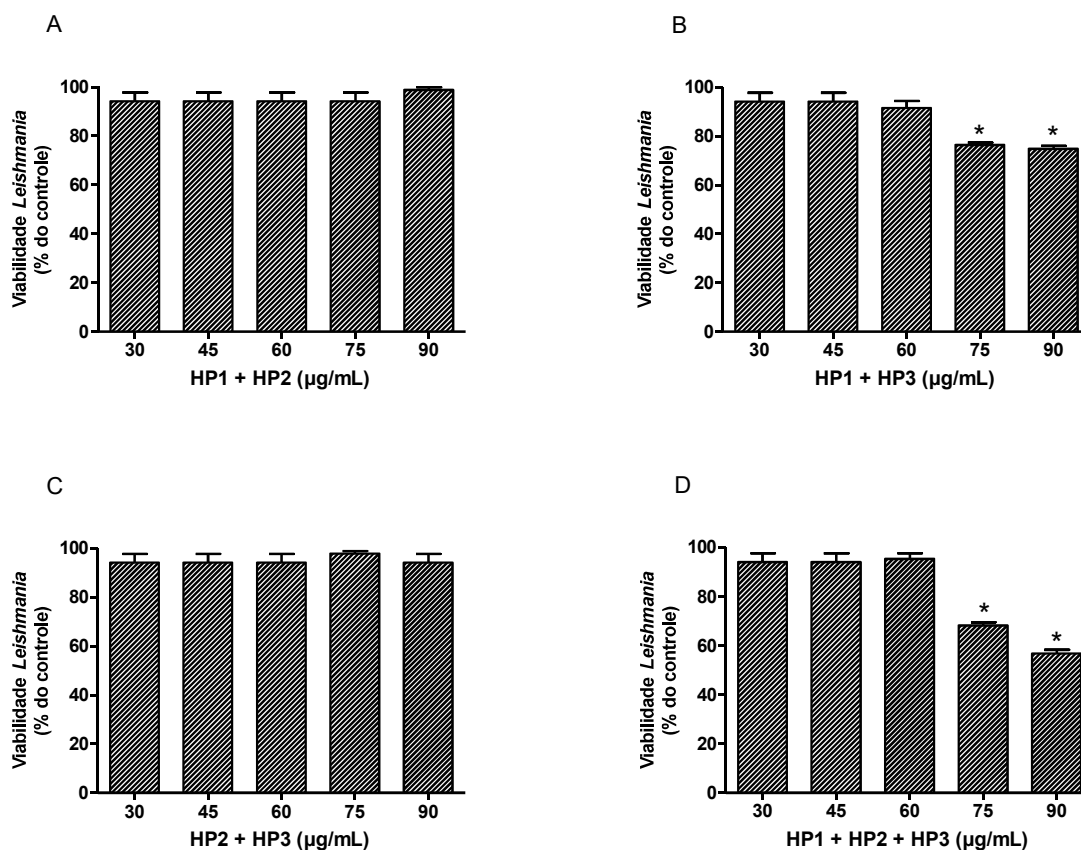


Figura 4: Efeito dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram incubadas (3×10^6 /mL) a 26°C com meio M199, na ausência ou presença de diferentes concentrações (30-90 µg/mL) dos benzopiranos em diferentes combinações durante 48 horas, HP1 e HP2 (A), HP1 e HP3 (B), HP2 e HP3 (C) e HP1, HP2 e HP3 (D). A viabilidade celular foi determinada através da contagem de formas promastigotas viáveis em câmara de Neubauer. A figura é representativa de 3 experimentos em quadruplicata. O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ em relação ao controle (100% viabilidade). Foi utilizada a análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni.

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos sobre células humanas, realizou-se o teste de hemólise utilizando hemácias humanas. Neste teste, isouliginosina B, japonicina A e uliginosina B mostraram baixa taxa de hemólise (figura 5A, B e C). Nas menores concentrações testadas (62,5 e 125 µg/mL) a carifenona A também demonstrou baixa toxicidade sobre as hemácias humanas (figura 5D). Vooturi e colaboradores em estudo utilizando os compostos sintéticos SV1 e SV7 reportaram a baixa taxa de hemólise de benzofenonas sintéticas (ausência de hemólise a 50 µg/mL) [15]. Já a anfotericina B apresentou forte efeito hemolítico induzindo 84% e 100% de hemólise nas concentrações de 15,6 e 125 µg/mL, respectivamente [16]. Em comparação com os valores encontrados para o fármaco anti-*Leishmania* em uso clínico, os compostos na concentração de 125 µg/mL demonstraram baixa hemólise e induziram elevada mortalidade de formas promastigotas:

100% de mortalidade para carifenona A e isouliginosina B, 80% de mortalidade para uliginosina B e 67% de mortalidade para japonicina A (figura 1).

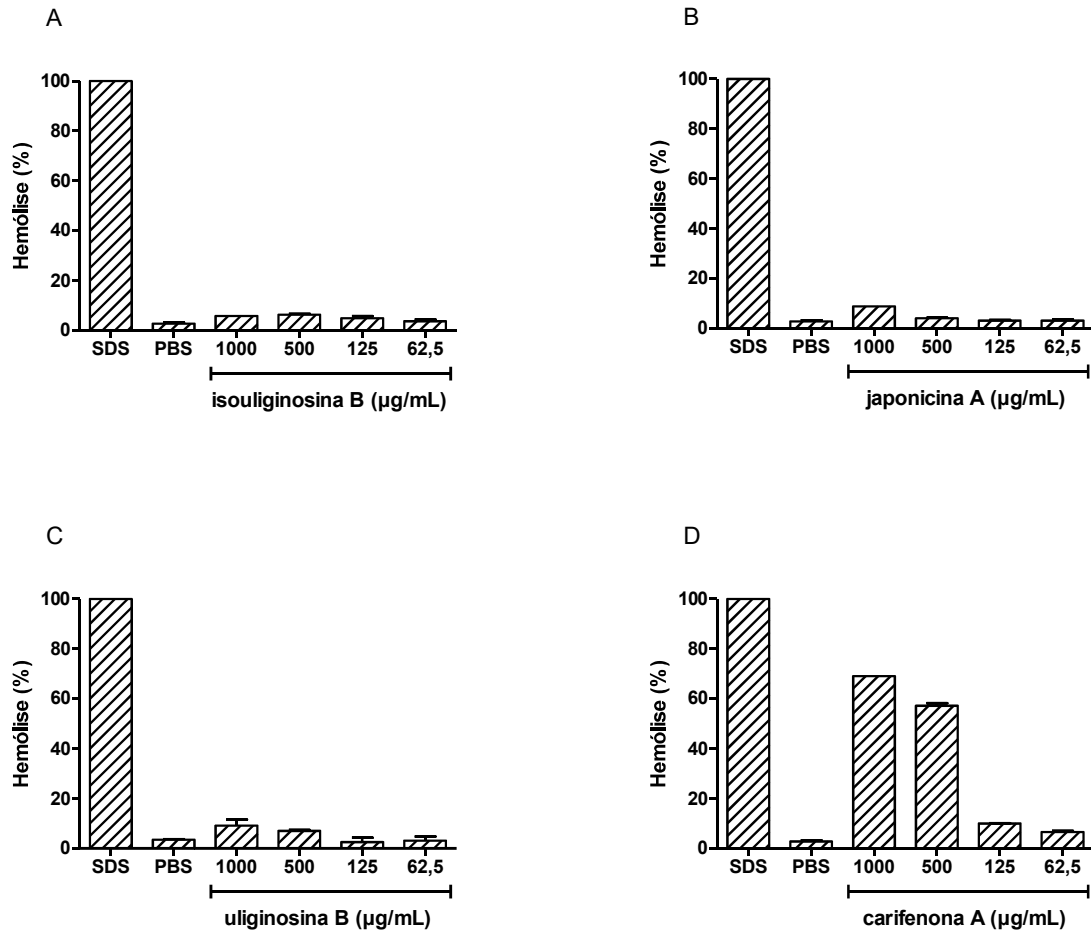


Figura 5: Efeito hemolítico de isouliginosina B (A), japonicina A (B), uliginosina B (C) e carifenona A (D), sobre hemácias humanas. Como controle positivo foi utilizado SDS 0,1% e controle negativo PBS 1X. Os dados são representativos de dois experimentos realizados em sextuplicatas. Foi utilizada a análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni.

Macrófagos liberam mediadores inflamatórios para combater patógenos intracelulares, como *Leishmania*, dentre os quais temos as espécies reativas derivadas de oxigênio e nitrogênio como o óxido nítrico, além de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) [17]. Com a finalidade de avaliar o efeito imunomodulador de compostos de espécies de *Hypericum* sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*, verificou-se inicialmente o efeito destes sobre a atividade leishmanicida de macrófagos.

A produção de óxido nítrico (figura 6A-D) foi correlacionada com a potente atividade leishmanicida induzida pelo tratamento de macrófagos infectados com LPS (10 ng/mL) + IFN- γ (1 ng/mL) (figura 6E -H). Na presença de aminoguanidina, inibidor da síntese de NO, houve redução significativa da produção deste mediador e inibição da atividade leishmanicida

induzida por LPS + IFN- γ . Todos os compostos testados mostraram potente atividade contra formas amastigotas de *L. amazonensis* e esta atividade leishmanicida foi independente da produção de NO, uma vez que todos os compostos inibiram a produção de NO, e mesmo na presença de seu inibidor continuaram apresentando atividade leishmanicida.

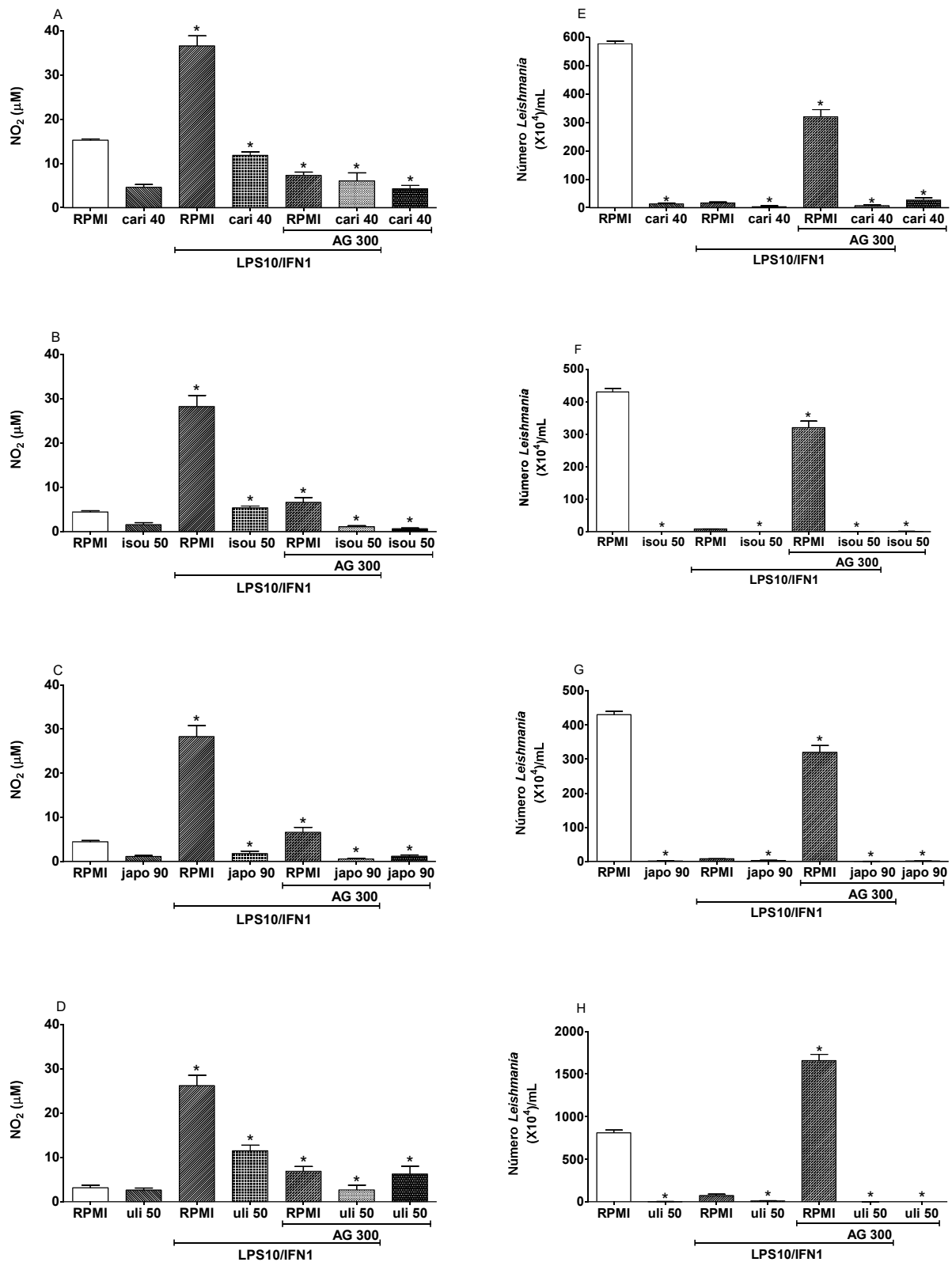


Figura 6: Efeito de carifenona A (painéis A e E), isouliginosina B (painéis B e F), japonicina A (painéis C e G) e uliginosina B (painéis D e H) sobre produção de óxido nítrico e atividade leishmanicida de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e incubados na presença ou ausência de LPS/IFN- γ e/ou aminoguanidina. O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$. Foi utilizada a análise de variância de uma via seguida do teste de Bonferroni.

Entre os mecanismos de controle da *Leishmania* está a produção de NO e ROS por fagócitos [18-21] e a ativação de macrófagos por IFN- γ [22]. No nosso estudo, os compostos estudados inibiram a produção de NO, sugerindo que a atividade leishmanicida observada seja independente de NO, podendo estar correlacionada com a produção de ROS por macrófagos. Neste sentido vários autores demonstraram que substâncias de origem natural e sintética induzem o aumento dos níveis de ROS, importante no controle do crescimento de *Leishmania*, como a hipericina [23], o extrato de tubérculo de batata [24] e os derivados de isobenzofuranona sobre *L. (L.) donovani* [25] e a epigallocatequina 3-gallato sobre *L. brasiliensis* [26].

Em continuidade estão sendo realizadas análises para a investigação do possível mecanismo de ação envolvido na atividade leishmanicida encontrada para os compostos. Estes testes servirão para complementar os resultados obtidos até o momento.

3. Referências Bibliográficas

- [1] Bernardi APM, Ferraz ABF, Albring D, Bordignon S, Schripsema J, Bridi R, et al. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. J Nat Prod. 2005;68(5):784-6.
- [2] Ccana-Ccapatinta GV, Barros FMC, Bridi H, von Poser GL. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections *Brathys* and *Trigynobrathys*. Phytochem Rev. 2013;DOI 10.1007/s11101-013-9332-2.
- [3] Ferraz AC, Bordignon S, Staats C, Schripsema J, von Poser GL. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. Phytochemistry. 2001;57(8):1227-30.
- [4] Romão PRT, Fonseca SG, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide mediated cytotoxicity. Parasitology. 1999;118(Pt 6):559-66.
- [5] Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, Mshvildadze V, Pichette A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. Bioorg Med Chem. 2009;17(5):2002–8.
- [6] França HS, Kuster RM, Rito PN, de Oliveira AP, Teixeira LA, Rocha L. Antibacterial activity of the phloroglucinols and hexanic extract from *Hypericum brasiliense* Choisy. Quim Nova. 2009;32(5):1103-6.
- [7] Hay A, Merza J, Landreau A, Litaudon M, Pagniez F, Pape PL, et al. Antileishmanial polyphenols from *Garcinia vieillardii*. Fitoterapia. 2008;79(1):42–6.
- [8] Dagnino AP, Barros FMC, Ccana-Ccapatinta GV, Prophiro JS, von Poser GL, Romão PRT. Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* Species. Phytomedicine. 2015;22(1):71–6.
- [9] Pereira IO, Marques MJ, Pavan ALR, Codonho BS, Barbiéri CL, Beijo LA, et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. Phytomedicine. 2010;17(5):339-45.
- [10] Maciel-Rezende CM, de Almeida L, Costa ED, Pires FR, Alves KF, Junior CV. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. Bioorg Med Chem. 2013;21(11):3114–19.

- [11] Bernardi APM, Maurmann N, Rech S, von Poser GL. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. *Acta Physiol Plant*. 2007;29(2):165-170.
- [12] Cargnin ST, Vieira PDB, Cibulski S, Cassel E, Vargas RMF, Montanha J, et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitol Int*. 2013;62(2):112–7.
- [13] Basselin M, Robert-Gero M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine resistant *Leishmania*. *Parasitol Res*. 1998;84(1):78-83.
- [14] Del Olmo E, Alves M, Lopéz JL, Inchausti A, Yaluff G, Rojas de Arias A, et al. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and aminoalcohols. *Bioorg Med Chem Lett*. 2002;12(4):659-62.
- [15] Vooturi SK, Dewal MF, Firestine SM. Examination of a synthetic benzophenone membrane-targeted antibiotic. *Org Biomol Chem*. 2011;9(18):6367–72.
- [16] Mello TFP, Bitencourt HR, Pedroso RB, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Silveira TGV. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Exp Parasitol*. 2014;136:27–34.
- [17] Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci*. 2006;31(9):509-15.
- [18] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-16.
- [19] Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(4):669-75.
- [20] Olekhnovitch R, Ryffel B, Müller AJ, Bouso P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *J Clin Invest*. 2014;124(4):1711-22.
- [21] Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:151-77.

- [22] Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
- [23] Singh S, Sarma S, Katiyar SP, Das M, Bhardwaj R, Sundar D, et al. Probing the molecular mechanism of hypericin-induced parasite death provides insight into the role of spermidine beyond redox metabolism in *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):15-24.
- [24] Paik D, Das P, De T, Chakraborti T. *In vitro* anti-leishmanial efficacy of potato tuber extract (PTEx): Leishmanial serine protease(s) as putative target. *Exp Parasitol.* 2014;146:11-9.
- [25] Mishra A, Vinayagam J, Saha S, Chowdhury S, Roychowdhury S, Jaisankar P, et al. Isobenzofuranone derivatives exhibit antileishmanial effect by inhibiting type II DNA topoisomerase and inducing host response. *Pharmacol Res Perspect.* 2014;2(6):e00070.
- [26] Inacio JDF, Gervazoni L, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. The effect of (-)-epigallocatechin 3-O *in vitro* and *in vivo* in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(8):e3093.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez a ação leishmanicida de extratos hexânicos e compostos de espécies de *Hypericum*. Dentre os extratos, *H. polyanthemum* apresentou a maior atividade (*H. polyanthemum* > *H. carinatum* > *H. linoides* > *H. myrianthum* > *H. brevistylum* > *H. caprifoliatum*) sobre promastigotas de *L. amazonensis*. Quatro compostos de *Hypericum* (carifenona A, isouliginosina B, uliginosina B e japonicina A) foram ativos sobre formas promastigotas e amastigotas do parasito. As associações dos compostos HP1 + HP3 e HP1 + HP2 + HP3 apresentaram atividade sobre formas promastigotas nas maiores concentrações testadas. Mais estudos *in vitro* são necessários para entender o mecanismo de ação destes compostos. Além de estudos utilizando modelo experimental de infecção *in vivo* que são fundamentais para avaliação da eficácia terapêutica de extratos e compostos de espécies de *Hypericum*.

6. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos até o presente momento, novas análises serão realizadas para a busca do possível mecanismo de ação envolvido na atividade leishmanicida apresentada pelos compostos das diferentes espécies de *Hypericum* sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Para este fim, serão realizados os seguintes testes:

- Investigar a possível atividade leishmanicida de uliginosina B + HP1, uliginosina B + HP2 e uliginosina B + HP3 sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Estes dados serão necessários para confirmar se a uliginosina B tem uma potência elevada, sendo a principal responsável pela atividade leishmanicida encontrada nos extratos hexânicos;

- Investigar a possível atividade leishmanicida de carifenona A + uliginosina B sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Estes dados serão investigados, pois carifenona A e uliginosina B demonstraram os melhores valores de IC₅₀ dentre os compostos testados.

- Investigar a possível atividade leishmanicida de uliginosina B + HP1, uliginosina B + HP2 e uliginosina B + HP3 sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Estes dados serão necessários para confirmar se a uliginosina B tem uma potência elevada, sendo a principal responsável pela atividade leishmanicida encontrada nos extratos hexânicos;

- Investigar se HP1, HP2 e HP3 possuem efeito sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis* comparativamente a macrófagos estimulados com LPS/IFN- γ , pois mesmo não tendo apresentando atividade significativa sobre formas promastigotas, não esta descartada a possibilidade de estimularem a atividade leishmanicida de macrófagos.

- Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados e estimulados *in vitro* com HP1, HP2 e HP3;

- Investigar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade leishmanicida dos compostos através da quantificação dos níveis de ROS em macrófagos infectados e tratados com os compostos mais ativos ou associação dos mesmos por citometria de fluxo com utilização de H₂DCFDA, um corante não fluorescente que é convertido a um corante fluorescente (diclorofluoresceína) por radicais livres.

- Avaliar a apoptose de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratados com os compostos através da marcação por anexina-V e iodeto de propídio por citometria de fluxo.

- Investigar alterações no potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis* incubadas na presença dos compostos mais ativos.

Estes estudos permitirão prospectar sobre a utilização de extratos e compostos de *Hypericum* como compostos para a descoberta de novos medicamentos contra a leishmaniose. Contudo, mais estudos (*in vitro* e *in vivo*) são necessários para avaliar sua toxicidade para os seres humanos antes que esses agentes possam ser explorados clinicamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. 2009;324(5924):265-8.
- [2] WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser 2010;949(xii-xiii):1e186.
- [3] Shi XL, Ge JF, Liu BQ, Kaiser M, Wittlin S, Brun R, et al. Synthesis and *in vitro* antiprotozoal activities of 5-phenyliminobenzo[a]phenoxazine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(19):5804-7.
- [4] Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11(4):340-4.
- [5] Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604-15.
- [6] Walker DM, Oghumu S, Gupta G, McGwire BS, Drew ME, Satoskar AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(7):1245-63.
- [7] Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(10):e313.
- [8] Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014;69 Suppl 1:S10-8.
- [9] Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999;17(3):279-89.
- [10] Oshaghi MA, Ravasan NM, Hide M, Javadian EA, Rassi Y, Sadraei J, et al. *Phlebotomus perfiliewi transcaucasicus* is circulating both *Leishmania donovani* and *L. infantum* in northwest Iran. *Exp Parasitol*. 2009;123(3):218-25.
- [11] Volf P, Hostomska J, Rohousova I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*. 2008;15(3):237-43.

- [12] Dobson DE, Kamhawi S, Lawyer P, Turco SJ, Beverley SM, Sacks DL. *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. PLoS Pathog. 2010;6(11):e1001185.
- [13] Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, Beverley SM, Volf P. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(1):e580.
- [14] Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martinez S, Pratlong F, Balard Y, et al. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009;9(6):687-94.
- [15] Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis. 2008;14(7):1013-8.
- [16] Fischer D, Thomas SM, Beierkuhnlein C. Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. Geospat Health. 2010;5(1):59-69.
- [17] Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. Euro Surveill. 2010;15(10):19505.
- [18] Alborzi A, Rasouli M, Shamsizadeh A. *Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. Am J Trop Med Hyg. 2006;74(2):306-7.
- [19] Bañuls AL, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniases, with special mention of asymptomatic infection. Clin Microbiol Infect. 2011;17(10):1451-61.
- [20] Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):293-307.
- [21] Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. Int J Infect Dis. 2013;17(8):e572-6.

- [22] Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(7):735-7.
- [23] Mayrink W, Mendonça-Mendes A, de Paula JC, Siqueira LM, Marrocos Sde R, Dias ES, et al. Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(4):212-9.
- [24] McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.* 2014;107(1):7-14.
- [25] Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2012;34(12):551-61.
- [26] Paniz Mondolfi AE, Duffey GB, Horton LE, Tirado M, Reyes Jaimes O, Perez-Alvarez A, et al. Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 2013;52(4):446-55.
- [27] David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther.* 2009;22(6):491-502.
- [28] de Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol.* 2012;3:145.
- [29] Bari AU. Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: an overview from Pakistan. *Dermatol Online J.* 2012;18(2):4.
- [30] Cascio A, Colomba C. La leishmaniosi viscerale in età pediátrica (Childhood Mediterranean visceral leishmaniasis). *Infez Med.* 2003;11(1):5-10.
- [31] Cascio A, Colomba C, Antinori S, Orobello M, Paterson D, Titone L. Pediatric visceral leishmaniasis in Western Sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21(4):277-82.
- [32] Barrett MP, Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Br Med Bull.* 2012;104:175-96.

- [33] Soong L, Henard CA, Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol.* 2012;34(6):735-51.
- [34] Channon JY, Roberts MB, Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology.* 1984;53(2):345-55.
- [35] Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(4):669-75.
- [36] Passwell JH, Shor R, Smolen J, Jaffe CL. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *Int J Exp Pathol.* 1994;75(4):277-84.
- [37] Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(2):337-51.
- [38] Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol.* 1992;52(2):135-42.
- [39] Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* 2001;190(1-2):73-6.
- [40] Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Khouri M, Barral-Netto M. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop.* 1991;48(3):185-93.
- [41] Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2(59).
- [42] van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun.* 2002;70(8):4177-84.

- [43] de Moura TR, Oliveira F, Rodrigues GC, Carneiro MW, Fukutani KF, Novais FO, et al. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(6):e712.
- [44] Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. J Immunol. 2005;175(12):8346-53.
- [45] Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science. 2008;321(5891):970-4.
- [46] Tavares NM, Araújo-Santos T, Afonso L, Nogueira PM, Lopes UG, Soares RP, et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection *in vitro*: the role of LTB4 derived from human neutrophils. J Infect Dis. 2014;210(4):656-66.
- [47] Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. J Leukoc Biol. 2008;84(2):389-96.
- [48] da Silva Santos C, Brodskyn CI. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. Front Public Health. 2014;2(165).
- [49] Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? Trends Microbiol. 2003;11(5):210-4.
- [50] Pereira LI, Dorta ML, Pereira AJ, Bastos RP, Oliveira MA, Pinto SA, et al. Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(3):378-83.
- [51] Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. Trop Med Int Health. 1999;4(12):801-11.

- [52] Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995;182(5):1259-64.
- [53] Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, et al. IFNG+874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis*. 2007;7(33).
- [54] Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest*. 1993;92(1):324-9.
- [55] Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(5):561-7.
- [56] Hailu A, van Baarle D, Knol GJ, Berhe N, Miedema F, Kager PA. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol*. 2005;117(2):182-91.
- [57] Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci*. 2006;31(9):509-15.
- [58] Alexander J, Brombacher F. T helper 1/t helper 2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol*. 2012;3(80).
- [59] McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunol Rev*. 2004;201:206-24.
- [60] Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(6):1533-40.
- [61] Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2009;200(1):75-8.

- [62] Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kalaazar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest*. 2009;119(8):2379-87.
- [63] Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol*. 2002;12(5):449-51.
- [64] Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009;31(8):432-9.
- [65] Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):139-42.
- [66] Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994;62(6):2614-8.
- [67] Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun*. 1998;66(6):2698-704.
- [68] Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2004;199(11):1559-66.
- [69] Bourreau E, Prévot G, Gardon J, Pradinaud R, Hasagewa H, Milon G, et al. LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun*. 2002;70(6):3122-9.
- [70] Gaafar A, Veress B, Permin H, Kharazmi A, Theander TG, el Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol*. 1999;91(3):314-20.
- [71] Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol*. 2007;149(3):440-4.

- [72] Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr, Schriefer A, Machado PR, Lessa H, et al. Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun*. 2005;73(12):7853-9.
- [73] Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2010;5(4):e10107.
- [74] Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2006;193(9):1313-22.
- [75] Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502-7.
- [76] Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*. 2004;200(2):201-10.
- [77] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-128.
- [78] Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380(9859):2197-223.
- [79] BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>. Acesso em 10 janeiro. 2015.
- [80] BRASIL. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf>>. Acesso em 10 janeiro. 2015.

- [81] Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
- [82] Centro Estadual de Vigilância em Saúde. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. *BE*. 2011;103(1):1-8.
- [83] de Oliveira Riboldi E. Epidemiologia da leishmaniose visceral canina na região metropolitana de Porto Alegre [dissertação]. Porto Alegre; 2015.
- [84] Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2006;61:223-74.
- [85] Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001;6(11):849-54.
- [86] Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1478-83.
- [87] Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):111e26.
- [88] Singh N, Singh RT, Sundar S. Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. *J Infect Dis*. 2003;188(4):600-7.
- [89] Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem*. 2014;22(1):18-45.
- [90] Ferreira Cdos S, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frézard F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals*. 2003;16(3):441-6.
- [91] Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(3):913-6.

- [92] Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J.* 2004;381(Pt 2):405-12.
- [93] Chakraborty AK, Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152(2):605-11.
- [94] Walker J, Saravia NG. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *J Parasitol.* 2004;90(5):1155-62.
- [95] Sundar S, Olliaro PL. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(5):733-40.
- [96] Kamiński DM. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *Eur Biophys J.* 2014;43(10-11):453-67.
- [97] Hartsel S, Bolard J. Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17(12):445-9.
- [98] de Kruijff B, Demel RA. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1974;339(1):57-70.
- [99] Saha AK, Mukherjee T, Bhaduri A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1986;19(3):195-200.
- [100] Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;416(1-2):7-12.
- [101] Das VN, Ranjan A, Sinha AN, Verma N, Lal CS, Gupta AK, et al. A randomized clinical trial of low dosage combination of pentamidine and allopurinol in the treatment of antimony unresponsive cases of visceral leishmaniasis. *J Assoc Physicians India.* 2001;49:609-13.

- [102] Das VN, Siddiqui NA, Pandey K, Singh VP, Topno RK, Singh D, et al. A controlled, randomized nonblinded clinical trial to assess the efficacy of amphotericin B deoxycholate as compared to pentamidine for the treatment of antimony unresponsive visceral leishmaniasis cases in Bihar, India. *Ther Clin Risk Manag.* 2009;5(1):117-24.
- [103] Croft SL, Brazil RP. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1982;76(1):37-43.
- [104] Hentzer B, Kobayasi T. The ultrastructural changes of *Leishmania tropica* after treatment with pentamidine. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997;71(2):157-66.
- [105] Jean-Moreno V, Rojas R, Goyeneche D, Coombs GH, Walker J. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. *Exp Parasitol.* 2006;112(1):21-30.
- [106] Cortázar TM, Coombs GH, Walker J. *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. *Exp Parasitol.* 2007;116(4):475-82.
- [107] Shapiro TA, Englund PT. Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(3):950-4.
- [108] Bitonti AJ, Dumont JA, McCann PP. Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Biochem J.* 1986;237(3):685-9.
- [109] Vercesi AE, Docampo R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem J.* 1992;284(Pt 2):463-7.
- [110] Shakya N, Bajpai P, Gupta S. Therapeutic switching in *Leishmania* chemotherapy: a distinct approach towards unsatisfied treatment needs. *J Parasit Dis.* 2011;35(2):104-12.
- [111] Soto J, Toledo J, Gutierrez P, Nicholls RS, Padilla J, Engel J, et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis.* 2001;33(7):E57-61.

- [112] Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;111(1):1-14.
- [113] Sundar S, Kumar K, Chakravarty J, Agrawal D, Agrawal S, Chhabra A, et al. Cure of antimony-unresponsive Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis with oral miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100(7):698-700.
- [114] Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis*. 2012;55(4):543-50.
- [115] Llanos-cuentas A, Echevarria J, Seas C, Chang E, Cruz M, Alvarez E, et al. Parenteral aminosidine is not effective for peruvian mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(6):1128-31.
- [116] Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res*. 1997;232(2):339-48.
- [117] Alviano DS, Alviano CS. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(1):106-21.
- [118] Alviano DS, Barreto AL, Dias Fde A, Rodrigues Ide A, Rosa Mdo S, Alviano CS, et al. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. *Front Microbiol*. 2012;3:283.
- [119] O'Neill PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem*. 2004;47(12):2945-64.
- [120] Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(4):209-18.
- [121] Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6):3670-95.
- [122] Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*. 2001;109 Suppl 1:69-75.

- [123] Bruneton J. Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales. 2^a ed. Zaragoza: Acribia; 2001.
- [124] Simões CMO, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6^a ed. Porto Alegre: UFRGS; 2010.
- [125] Ribeiro TG, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Franca JR, Lage PS, Duarte MC, et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp Parasitol.* 2014;143:60-8.
- [126] De Queiroz AC, Dias Tde L, Da Matta CB, Cavalcante Silva LH, de Araújo-Júnior JX, de Araújo GB, et al. Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:478290.
- [127] Lage PS, de Andrade PH, Lopes Ade S, Chávez Fumagalli MA, Valadares DG, Duarte MC, et al. *Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective *in vitro* antileishmanial activity. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:304354.
- [128] Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis.* 2011;15(8):e525-32.
- [129] Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. *Phytomedicine.* 2011;18(12):1056-69.
- [130] Ishiguro K, Yamaki M, Kashihara M, Takagi S. Sarothralen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. *Planta Med.* 1986;(4):288-90.
- [131] Jayasuriya H, Clark AM, McChesney JD. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. *J Nat Prod.* 1991;54(5):1314-20.
- [132] Verotta L, Appendino G, Belloro E, Jakupovic J, Bombardelli E. Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from st. John's wort (*Hypericum perforatum*). *J Nat Prod.* 1999;62(5):770-2.
- [133] Tian J, Zhang F, Cheng J, Guo S, Liu P, Wang H. Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of *Hypericum perforatum* L. *Sci Rep.* 2014;4:5632.

- [134] Stojanović G, Đorđević A, Šmelcerović A. Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's wort (*Hypericum perforatum*)? *Curr Med Chem*. 2013;20(18):2273-95.
- [135] Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, Sarmiento L, et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*. 2003;10(6-7):511-6.
- [136] Ribeiro VL, Toigo E, Bordignon SA, Gonçalves K, von Poser G. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*. 2007;147(1-2):199-203.
- [137] da Silva FC, de Barros FM, Prophiro JS, da Silva OS, Pereira TN, de Loreto Bordignon AS, et al. Larvicidal activity of lipophilic extract of *Hypericum carinatum* (Clusiaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and benzophenones determination. *Parasitol Res*. 2013a; 112(6):2367-71.
- [138] da Silva OS, da Silva FC, de Barros FMC, da Silva JLR, de Loreto Bordignon SA, Eifler-Lima VL, et al. Larvicidal and growth-inhibiting activities of extract and benzopyrans from *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Ind Crops Prod*. 2013b; 45:236-9.
- [139] Ferraz A, Faria DH, Benneti MN, da Rocha AB, Schwartzmann G, Henriques A. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine*. 2005a;12(1-2):112-5.
- [140] Viana A, do Rego JC, von Poser G, Ferraz A, Heckler AP, Costentin J, et al. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology*. 2005;49(7):1042-52.
- [141] von Poser GL, Rech SB, Rates SMK. Chemical and pharmacological aspects of Southern Brazilian *Hypericum* species. In: Teixeira da Silva, J. A. Floriculture, ornamental and plant biotechnology. Global Science Books, Ltd; 2006;4(56):510-16.
- [142] Ferraz AC, Bordignon S, Staats C, Schripsema J, von Poser GL. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*. 2001;57(8):1227-30.
- [143] Ferraz ABF, Schripsema J, Pohlmann AR, von Poser GL. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. *Biochem Syst Ecol*. 2002;30:989-91.

- [144] Nör C, Albring D, Ferraz ABF, Schripsema J, Pires V, Sonnet P, et al. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* Section. *Biochem Syst Ecol.* 2004;32(5):517-9.
- [145] Nör C, Bernardi APM, Haas JS, Schripsema J, Rech SB, von Poser GL. Phenolic constituents of *Hypericum* flowers. *Nat Prod Commun.* 2008;3:237-40.
- [146] Bernardi APM, Ferraz ABF, Albring D, Bordignon S, Schripsema J, Bridi R, et al. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. *J Nat Prod.* 2005;68(5):784-6.
- [147] Verotta L, Appendino G, Bombardelli E, Brun R. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17(6):1544-8.
- [148] Moon HI. Antiplasmodial and cytotoxic activity of phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum* Thunb. *Phytother Res.* 2010;24(6):941-4.
- [149] Pereira IO, Marques MJ, Pavan ALR, Codonho BS, Barbiéri CL, Beijo LA, et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. *Phytomedicine.* 2010;17(5):339-45.
- [150] Cargin ST, Vieira PDB, Cibulski S, Cassel E, Vargas RMF, Montanha J, et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitol Int.* 2013;62(2):112-7.
- [151] Dall'agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, Schapoval EE, et al. Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytother Res.* 2005;19(4):291-3.
- [152] França HS, Kuster RM, Rito PN, de Oliveira AP, Teixeira LA, Rocha L. Antibacterial activity of the phloroglucinols and hexanic extract from *Hypericum brasiliense* Choisy. *Quim Nova.* 2009;32(5):1103-6.
- [153] Ferraz AB, Grivicich I, von Poser GL, Faria DH, Kayser GB, Schwartzmann G, et al. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. *Fitoterapia.* 2005b;76(2):210-5.

- [154] Pinhatti AV, de Barros FM, de Farias CB, Schwartzmann G, Poser GL, Abujamra AL. Antiproliferative activity of the dimeric phloroglucinol and benzophenone derivatives of *Hypericum* spp. native to southern Brazil. *Anticancer Drugs*. 2013;24(7):699-703.
- [155] Haas JS, Viana AF, Heckler AP, von Poser GL, Rates SM. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. *Planta Med*. 2010;76(13):1419-23.
- [156] Stolz ED, Viana AF, Hasse DR, von Poser GL, do Rego JC, Rates SM. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;39(1):80-7.
- [157] Stein AC, Viana AF, Müller LG, Nunes JM, Stolz ED, Do Rego JC, et al. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behav Brain Res*. 2012;228(1):66-73.

ANEXO A

Normas Revista Científica Phytomedicine

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Preparation and Format of Manuscripts

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables

and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Vitae

Include in the manuscript a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number

consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Provide captions to illustrations separately.

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.

- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color**

reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '.... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data deposit and linking

Elsevier encourages authors to deposit raw data sets underpinning their research publication in data repositories, and to enable interlinking of articles and data. Please visit <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information on depositing and linking your data with a supported data repository.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

ANEXO B**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UFCSPA**

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 11-061

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

PEDRO ROOSEVELT TORRES ROMÃO

ANA PAULA AQUISTAPASE DAGNINO

Título: INVESTIGAÇÃO DE ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE ESPÉCIES DE HIPERICUM NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 26 de janeiro de 2012.



Alexandre T. D. de Oliveira
Vice-Coordenador CEUA/UFCSPA