



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA-RENORBIO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARINA HELENA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE
Libidibia ferrea VAR *ferrea* (MART. EX TUL.) L. P. QUEIROZ E DE *Cratylia mollis*
(MART. EX.) BENTH SOBRE *Leishmania* SPP

Recife

2018

CARINA HELENA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE
Libidibia ferrea VAR *ferrea* (MART. EX TUL.) L. P. QUEIROZ E DE *Cratylia mollis*
(MART. EX.) BENTH SOBRE *Leishmania* SPP

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO - Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Coorientadoras: Profa Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Dra: Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Carina Helena da

Avaliação do potencial biotecnológico de compostos bioativos de *Libidibia ferrea* var *ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz e de *Cratylia mollis* (Mart. ex.) Benth sobre *Leishmania* spp / Carina Helena da Silva - 2018.

136 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria das Graças Carneiro da Cunha

Coorientadoras: Maria Tereza dos Santos Correia

Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo.

1. Leishmaniose 2. Lectina 3. Metabólitos secundários

I. Cunha, Maria das Graças Carneiro da (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient.) III. Figueiredo, Regina Célia Bressan Queiroz de (coorient.) IV. Título

614.534

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-195

CARINA HELENA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE
Libidibia ferrea VAR *ferrea* (MART. EX TUL.) L. P. QUEIROZ E DE *Cratylia mollis*
(MART. EX.) BENTH SOBRE *Leishmania* SPP

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO - Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 24/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

(Examinador Interno – Titular, Presidente) – Departamento de Bioquímica – CB/UFPE

Profa. Dra. Terezinha Gonçalves da Silva (UFPE)

(Examinador Interno – Titular) - Departamento de Antibióticos - CB/UFPE

Profa Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

(Examinador Externo - Titular) Departamento de Bioquímica – CB/UFPE

Dra. Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque

(Examinador Externo – Titular) – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

(Examinador Externo - Titular) - Departamento de Bioquímica – CB/UFPE

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

(Examinador Interno – Suplente) – Departamento de Bioquímica – CB/UFPE

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

(Examinador Externo - Suplente) - Departamento de Bioquímica – CB/UFPE

Aquele que me proporcionou a vida e a coragem para lutar por ela... O meu Deus. Aqueles escolhidos por Deus para estarem ao meu lado... Antônio Oreste e Helena Rodrigues, meus pais.

A eles dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Por tudo o que fizestes e tudo o que irás fazer, eternamente grata serei... Ao meu Deus, por conceder-me incontáveis bênçãos. A vida e tantas oportunidades, como a realização deste sonho, o Doutorado. Agradeço pela constante companhia em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis, sempre pude sentir a presença do soberano Deus, invisível, mas real, fazendo-me feliz independente das circunstâncias.

Aos meus queridos pais Antônio Oreste e Helena Rodrigues, pelo amor, cuidados, carinho e dedicação em todos os anos da minha vida. A pessoa que me tornei, o caráter que tenho e as metas que já alcancei, são frutos de seus constantes esforços.

Agradeço aos meus queridos irmãos Carlos, Cláudio e Cezar, pelos cuidados, apoio, por acreditarem na conquista dos meus ideais. Aos amores da minha vida, minhas lindas sobrinhas Camile, Ridyny e Radassa, por tornarem minha vida mais bonita, pois sabem o segredo de meu sorriso. As minhas cunhadas Maria, Gerlane e Mariana, pois também são participantes desta conquista.

Aos meus amados amigos do grupo jovem Filadélfia, minha gratidão, por durante estes anos sempre me apoiar, incentivar e acima de tudo orar, sei que contribuíram profundamente para esta conquista. Ao meu querido presbítero Samuel e família, pela força e incentivo e ao meu amado pastor Ismael de Oliveira por me compreender, apoiar e cuidar, sobretudo em orações.

Minha querida amiga Rosy, que esteve comigo desde o início da graduação, com quem pude dividir alegrias, ansiedades, angústias e trabalhos. Não tenho dúvidas que Deus a colocou em minha vida para ajudar-me, pois sabia que sozinha não conseguiria.

Agradeço a minha querida professora Dra Maria das Graças, por aceitar orientar-me e atenciosamente sempre ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço especialmente pelos conselhos que me deu para a vida.

Minha sincera gratidão a minha querida professora Dra Maria Tereza, pela co-orientação. Por se preocupar com minha satisfação na pesquisa.

A Dra Regina Bressan por acompanhar o meu trabalho bem de perto e me ter acolhido para desenvolver esta pesquisa no laboratório de Biologia Celular de Patógenos (LBCP) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz.

Agradeço aos meus companheiros do LBCP e aos companheiros do laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

Agradeço a Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO e a UFPE pela grande oportunidade de realização deste curso, bem como pelas instalações onde foi desenvolvida esta pesquisa. Agradeço a cada professor pela grande contribuição científica, em especial a professora Dra Terezinha Gonçalves, coordenadora do ponto focal RENORBIO-UFPE.

A FACEPE, pelo apoio financeiro.

Sei que cada situação vivenciada, cada pessoa que conheci e cada experiência, foram permitidas por Deus, a Ele minha gratidão maior.

RESUMO

As plantas e seus extratos são potentes agentes farmacêuticos utilizados por culturas nativas no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias. Dentre estas, destacam-se as leishmanioses, infecções crônicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Diferentes sintomas caracterizam este complexo de doenças, que se apresentam sob a forma de Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). No Brasil um dos principais agentes etiológicos da LT é a *Leishmania amazonensis*. Nas Américas e consequentemente no Brasil, o principal agente etiológico da LV é a *Leishmania infantum*. As principais drogas utilizadas para o tratamento contra as leishmanioses são antimoniais pentavalentes, que induzem graves efeitos colaterais. O potencial biotecnológico de lectinas e metabólitos secundários extraídos de plantas, sugere sua utilização como alternativas ao tratamento para as leishmanioses. A lectina de *Cratylia mollis*, Cramoll 1,4, bem como compostos extraídos da vagem e entrecasca de *Libidibia ferrea*, apresentam várias aplicações biológicas. Nesta pesquisa avaliamos os efeitos de Cramoll 1,4 e dos extratos metanólicos da entrecasca (EME) e da vagem (EMV) de *L. ferrea*, assim como o metabólito secundário ácido gálico detectado nos extratos, contra *L. amazonensis* e *L. infantum*. A caracterização química dos extratos de *L. ferrea* através de HPLC revelou os Ácidos Gálico (AG) e Elágico (AE) como os principais metabólitos secundários constituintes. Cramoll 1,4 e os extratos de *L. ferrea* não apresentaram efeitos citotóxicos para macrófagos intraperitoneais de camundongos Balb/c, com valores de $CC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. O tratamento com $43,2 \mu\text{g/mL}$ de Cramoll 1,4 induziu alterações morfológicas em macrófagos, e redução da atividade fagocítica detectada. O AG apresentou citotoxicidade em macrófagos a partir da concentração de $25 \mu\text{g/mL}$, causando redução nos níveis de ATP e importantes alterações morfológicas nos macrófagos. A CC_{50} para o AG foi $126 \pm 36,8 \mu\text{g/mL}$. EMV apresentou efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células Vero. Tanto a lectina quanto os extratos e o ácido gálico, apresentaram atividade antileishmania. A IC_{50} para Cramoll 1,4 em *L. infantum*, foi $7,19 \mu\text{g/mL}$. EME foi efetivo contra *L. amazonensis*, com IC_{50} de $79,21 \pm 7,48 \mu\text{g/mL}$, não sendo efetivo contra *L. infantum*. A IC_{50} de EMV contra *L. infantum* foi $23,3 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$. EMV não apresentou atividade contra *L. amazonensis*. AG foi capaz de inibir o crescimento e viabilidade celular em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com IC_{50} de $8,95 \pm 1,95 \mu\text{g/mL}$ e $18,8 \pm 5,1 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. A análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e varredura (MEV) revelou alterações causadas nos promastigotas de *L. infantum* após tratamentos com Cramoll 1,4, como surgimento de

vacúolos e desintegração das membranas celular e nuclear, bem como aglutinação celular. A análise por MEV tanto em promastigotas de *L. amazonensis*, quanto em *L. infantum* submetidas ao tratamento com o AG apresentaram alterações morfológicas, como arredondamento e perda do material citoplasmático. Cramoll 1,4 reduziu o índice de sobrevivência de amastigotas intracelulares de *L. infantum*. Nossos resultados apontam para Cramoll 1,4 e extratos de *L. ferrea*, como possíveis candidatos a novos fármacos para o tratamento adequado das leishmanioses.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Cramoll 1,4. Metabólitos secundários. Ácido Gálico.

ABSTRACT

Plants and their extracts are potent pharmaceutical agents used by native cultures in the treatment of infectious and parasitic diseases. Among these, stand out *leishmaniasis*, chronic infections caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Different symptoms characterize the main forms of this complex of diseases, the Cutaneous Leishmaniasis (CL) and the Visceral Leishmaniasis (VL). In Brazil, one of the main etiological agents of (CL) is the *Leishmania amazonensis*. In the Americas and consequently in Brazil, the main etiological agent of (VL) is the *Leishmania*. The main drugs used for treatment against the leishmaniasis are pentavalent antimonials, which induce serious side effects due to its toxicity. The biotechnological potential of lectins and secondary metabolites extracted from plants suggests the use as alternatives to treatment for leishmaniasis. The *Cratylia mollis* lectin, Cramoll 1,4, as well as compounds extracted from the *string bean* and *Libidibia ferrea* bast, present various biological applications. In this research we evaluated the effects of Cramoll 1,4 and the methanolic extracts of the bast (MEB) and pod (MEP) of *Libidibia ferrea*, as well as the secondary metabolite (gallic acid) detected in extracts, against *L. amazonensis* e *L. infantum*. The extracts chemical characterization of *L. ferrea* through (HPLC) High performance liquid chromatography revealed Gallic Acid (GA) and Ellagic Acid (EA) as the secondary main metabolites Components. Cramoll 1,4 and *L. ferrea* extracts showed no cytotoxic effects for intraperitoneal macrophages murines, values of $CC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. The treatment of $43,2 \mu\text{g/mL}$ Cramoll 1,4 induced morphological changes in macrophages, and reduction of detected phagocytic activity. The pattern (GA) showed cytotoxicity in macrophages from the concentration of $25 \mu\text{g/mL}$, causing reduced levels of ATP and important morphological changes in macrophages. The CC_{50} to GA was $126 \pm 36,8 \mu\text{g/mL}$. MEP presented a protective effect against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in Vero cells. Both lectin and extracts and Gallic acid showed anti-leishmania activity. The IC_{50} to Cramoll 1,4 in *L. infantum*, was $7.19 \mu\text{g/mL}$. MEB was effective against *L. amazonensis*, with IC_{50} of $79.21 \pm 7.48 \mu\text{g/mL}$, not being effective against *L. infantum*. The IC_{50} of (MEP) against *L. infantum* was $23.3 \pm 5.8 \mu\text{g/mL}$. (MESB) showed no activity against *L. amazonensis*. GA was able to inhibit the growth and viability cell in promastigotes of *L. amazonensis* and *L. infantum* with IC_{50} of $8.95 \pm 1.95 \mu\text{g/mL}$ and $18.8 \pm 5.1 \mu\text{g/mL}$ respectively. The analysis by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) revealed changes caused in promastigotes of *L. infantum* after treatment with Cramoll 1,4, like emergence of vacuoles and disintegration of cellular and nuclear membranes, as well as agglutination. The

analysis by (SEM) in promastigotes of *L. amazonensis* and *L. infantum* submitted to the treatment with GA presented morphological alterations, as rounding and loss of cytoplasmic material. Cramoll 1,4 reduced the survival rate of intracellular amastigotes of *L. infantum*. Our results point to Cramoll 1,4 and extracts of *L. ferrea* likepotential candidates to new drugs for the proper treatment of leishmaniasis.

Key words: *Leishmania amazonensis*. *Leishmania infantum*. Cramoll 1,4. Secondary metabolites. Gallic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

Figura 1 -	Vale do Catimbau - Pernambuco.....	27
Figura 2 -	<i>Cratylia mollis</i> (a) e sementes (b).....	33
Figura 3 -	<i>Libidibia ferrea ferrea</i> (Mart. ex. Tul.) L. P. Queiroz e suas vagens...	35
Figura 4 -	Estrutura química do ácido gálico (a) e ácido elágico (b).....	36
Figura 5 -	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	38
Figura 6 -	Eletromicrografia em microscópio eletrônico de transmissão de promastigota de <i>Leishmania infantum</i> - presença de núcleo (n) e cinetoplasto (k).....	39
Figura 7 -	Eletromicrografia em microscópio eletrônico de varredura de promastigota de <i>Leishmania infantum</i>	40
Figura 8 -	Eletromicrografia em microscópio eletrônico de varredura de amastigota de <i>Leishmania</i> sp no interior de vacúolos parasitóforos em macrófago.....	40
Figura 9 -	Insetos vetores.....	42
Figura 10 -	Casos de Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea.....	43
Figura 11 -	Caso de Leishmaniose Mucocutânea.....	44
Figura 12 -	Casos de Leishmaniose cutânea difusa.....	44
Figura 13 -	Distribuição geográfica de leishmaniose tegumentar, 2015.	46
Figura 14 -	Caso de Leishmaniose Visceral.....	47
Figura 15 -	Distribuição geográfica de leishmaniose visceral, 2015.....	48
Figura 16 -	Estrutura bidimensional de drogas mais comumente utilizadas contra as leishmanioses.....	49

Artigo 1

- Figura 1 - Efeitos de Cramoll na viabilidade de macrófagos peritoneais por MTT. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata * $p < 0,05$ quando comparados com o controle..... 85
- Figura 2 - Efeito de Cramoll 1,4 na ultraestrutura de macrófagos. (A-B) Células de controle não tratadas apresentando uma morfologia plana espalhada. Notar em B a presença de membrana eriçada formando filopódios e lamelopódios bem desenvolvidos. (C-D) macrófagos tratados com 14,4 $\mu\text{g/mL}$ de Cramoll 1,4 mostrando um encurtamento do corpo celular (C). No maior aumento foi possível observar a presença de estruturas intracelulares arredondadas semelhantes a vesículas endocíticas no córtex do corpo celular (seta). (E-F) Macrófagos tratados com 28,8 $\mu\text{g/mL}$ mostrando corpo celular arredondado ou fusiforme com perda de filopódia e lamelopódio. Note que as organelas do tipo endossoma ainda estão presentes no citoplasma de uma célula tratada..... 87
- Figura 3 - Efeitos de Cramoll 1,4 na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais murinos. Todos os valores são médias de ± 280 células contadas * $p < 0,01$, diferença significativa em comparação com as células não-tratadas. # $p < 0,01$ comparado com 14,4 $\mu\text{g/mL}$ e 28,8 $\mu\text{g/mL}$ 87
- Figura 4 - Curva de crescimento de promastigotas de *L. infantum* tratadas ou não com Cramoll 1,4 por até 72 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata * $p < 0,05$ quando comparados com o controle..... 88

Figura 5 - Efeitos de Cramoll 1,4 na ultra-estrutura de promastigotas de *Leishmania infantum*. Microscopia eletrônica de transmissão de controle (A) apresentando promastigotas tratadas com Cramol 1,4 (B-E). (A) Célula do controle mostrando ultra-estrutura bem preservada com citoplasma granular homogêneo, corpo celular alongado, núcleo bem definido, mitocôndria e retículo endoplasmático. (B-C) Formas promastigotas tratadas com 1x IC₅₀ mostrando inchaço mitocondrial com perda do conteúdo da matriz, desorganização das cristas mitocondriais com formação de perfis concêntricos de membrana na matriz mitocondrial. Observe a presença de detritos celulares (*). (D-E) Promastigotas tratados com 2x IC₅₀ de Cramoll 1,4 apresentando retículo endoplasmático dilatado (RE) e cinetoplasto alterado (K). (F) Detalhe de um promastigota apresentando uma mitocôndria drasticamente alterada, com perda do conteúdo da matriz e vesículas na membrana interna (*) e grande espaço elétron-lucente no citoplasma..... 90

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com Cramoll 1,4. (A-B) Aspecto geral de um promastigota do controle mostrando uma superfície celular alongada e lisa. (C-F) Culturas de promastigotas tratadas com 1x IC₅₀ (C-D) e 2x IC₅₀ Cramoll 1,4 (E-F) apresentando intensa aglutinação celular. Em (D e F) detalhe de células individuais alteradas drasticamente mostrando a membrana enrugada e ondulada com grandes perfurações (ver seta) e encurtamento do flagelo..... 91

Figura 7 - Efeito de Cramoll 1,4 em macrófagos infectados com *Leishmania infantum* (A) Índice de sobrevivência de *Leishmania infantum* dentro de macrófagos após 24 h de tratamento com a Cramoll 1,4. * Estatisticamente significativo ($p > 0,05$) em comparação com o controle (0), PMD = pentamidina usada como medicamento de referência. (B) Macrófagos corados com Giemsa infectados com *L.infantum* tratados ou não com diferentes concentrações de

Cramoll 1,4.....	92
------------------	----

Artigo 2

Figura 1 -	Cromatografia obtida para detecção do Ácido Elágico (EA) no comprimento de onda de 254 nm e Ácido Gálico (AG) a 270 nm em amostras de EME em A-B e EMV em C-D.....	111
Figura 2 -	Efeitos citotóxicos dos EME e EMV contra macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Macrófagos foram incubados com EME e EMV por 48 h. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste do MTT. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (0).....	113
Figura 3 -	Efeitos citotóxicos do AG contra macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Macrófagos foram incubados com AG por 48 h. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste do sal de tetrazólio (MTT). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (0).....	114
Figura 4 -	Efeitos do AG sobre a produção de ATP em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (a). Macrófagos foram incubados com AG por 48 h. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (0).....	114
Figura 5 -	Efeito dos EME e EMV sobre a ultraestrutura de macrófagos. (A) Células do controle não tratadas apresentando morfologia plana e espalhada. Presença de filopódios e lamelopódios na superfície	

	externa da membrana. (B) macrófagos tratados com 50 µg/mL de EME. Células planas e espalhadas com filopódios e lamelopódios em sua superfície. (C) Macrófagos tratados com 50 µg/mL de EMV. Células alongadas semelhantes as do controle.....	116
Figura 6 -	Efeitos do AG sobre a ultraestrutura de macrófagos. (A-B) Células do controle não tratadas apresentando morfologia plana e espalhada. Filopódios e lamelopódios são observados na superfície externa da membrana. (C-D) Macrófagos tratados com 3 µg/mL, e 25 µg/mL (E-F) de AG apresentando morfologia arredondada com encurtamento da célula, filopódios e lamelopódios, quando comparadas ao controle. (G-H) Macrófagos tratados com 50 µg/mL de AG apresentaram alterações semelhantes às descritas para os demais tratamentos. Observar em H o surgimento de estruturas arredondadas em todo o corpo celular.....	117
Figura 7 -	Efeitos citotóxicos dos EME (A) e EMV (B) em células Vero. As células foram incubadas com EME e EMV por 24 h. A viabilidade das células foi avaliada pelo teste do sal de tetrazólio (MTT). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * <i>p</i> <0,05 quando comparados com o controle (0).....	119
Figura 8 -	Efeitos citotóxicos do H ₂ O ₂ sobre a viabilidade de células Vero após 1 h de incubação. Células Vero foram incubadas previamente com EME (A) e EMV (B) por 24 h e posteriormente incubadas com H ₂ O ₂ por 1 h. A viabilidade das células foi avaliada pelo teste do sal de tetrazólio (MTT). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * <i>p</i> <0,05 quando comparados com o controle (H ₂ O ₂).....	120
Figura 9 -	Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com AG. (A-B) Aspecto geral de	

uma promastigota de controle mostrando uma superfície celular lisa e alongada. (C-D) Culturas de promastigotas tratadas com IC₅₀ e (E-F) 2x IC₅₀ de AG. (C, D e E) células com morfologia arredondada (*) com divisão incompleta (E). Detalhe de células alteradas drasticamente, com perfuração (F)..... 123

Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *Leishmania infantum* tratada com AG. (A-B) Aspecto geral de promastigota do controle mostrando uma superfie celular lisa e alongada. Culturas de promastigotas tratadas com IC₅₀ (C-D). Células com morfologia drasticamente alterada, com membrana enrugada. (E-F) 2x IC₅₀ AG. (E) células com morfologia arredondada..... 124

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Efeitos da Cramoll 1,4 em macrófagos e formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	85
--	----

Artigo 2

Tabela 1 - Classes de metabólitos secundários e reveladores.....	104
Tabela 2 - Análise fitoquímica dos extratos metanólicos da entrecasca (EME) e vagem (EMV) de <i>Libidibia ferrea</i>	109
Tabela 3 - Valores de área e teor, calculados em g% de ácido gálico e g% de ácido elágico.....	110
Tabela 4 - Efeitos dos EAE, EAV e AG em macrófagos e formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido Gálico
AE	Ácido Elágico
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CC ₅₀	Concentração Citotóxica em 50% das células de mamíferos
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
Cramoll	Lectina de <i>Cratilya mollis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EME	Extrato Metanólico da Entrecasca
EMV	Extrato Metanólico da Vagem
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir em 50% o crescimento das formas promastigotas
IS	Índice de sobrevivência
LC	Leishmaniose Cutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de Sódio
NO	Óxido Nítrico
OsO ₄	Tetróxido de Ósmio

PBS Tampão fosfato-salino

PMD Pentamidina

spp espécies

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	OBJETIVOS.....	25
1.1.1	Objetivo Geral.....	25
1.1.2	Objetivos Específicos.....	25
2	REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS.....	26
2.2	LECTINA DE <i>Cratylia mollis</i>	32
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Leishmania ferrea ferrea</i>	34
2.4	<i>Leishmania</i>	38
2.5	LEISHMANIOSES.....	41
2.5.1	Leishmaniose Tegumentar.....	43
2.5.2	Leishmaniose Visceral.....	46
2.6	TRATAMENTOS PARA AS LEISHMANIOSES.....	49
2.7	RADICAIS LIVRES E DANOS CELULARES.....	52
3	MÉTODOS.....	67
3.1	ISOLAMENTO DA CRAMOLL 1,4.....	67
3.2	PARASITAS.....	67
3.3	CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	67
3.4	EFEITOS DA CRAMOLL 1,4 NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	67

3.5	EFEITOS DA CRAMOLL 1,4 NA ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS.....	68
3.6	ATIVIDADE ANTILEISHMANIA <i>IN VITRO</i> DE CRAMOLL 1,4 EM <i>Leishmania infantum</i>	68
3.7	ENSAIO ULTRAESTRUTURAL.....	69
3.8	MATERIAL	70
3.9	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS - SOLUÇÃO ESTOQUE.....	70
3.10	ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	70
3.11	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODOS (CLAE-DAD).....	71
3.12	PARASITAS.....	73
3.13	CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	73
3.14	ENSAIO DE MTT- EFEITO DE EME, EMV E AG SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	73
3.15	QUANTIFICAÇÃO DE ATP.....	74
3.16	ATIVIDADE ANTILEISHMANIA <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS DE <i>L. ferrea</i> E AG EM <i>L. amazonensis</i> E <i>L. infantum</i>	74
3.17	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	74
3.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
3.19	PADRÕES ÉTICOS.....	75
4	RESULTADOS.....	76

4.1	EFEITO DA LECTINA DE SEMENTES DE <i>Cratylia mollis</i> EM <i>Leishmania infatum</i>	76
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE <i>Libidibia ferrea</i> VAR ferrea.....	97
6	CONCLUSÃO.....	131
	REFERÊNCIAS.....	132
	ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	136

1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem metabólitos primários e secundários. Essencial à sobrevivência, o metabolismo primário é responsável pela síntese dos ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e proteínas. Algumas destas proteínas, tais como as lectinas, estão relacionadas com os mecanismos de defesa dos vegetais, devido à sua capacidade de reconhecimento de patógenos e sinalização celular.

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, caracterizadas por sua capacidade de ligar-se especificamente a carboidratos presentes em superfícies celulares, que possuem importantes atividades biológicas. São largamente distribuídas na natureza sendo encontradas em vírus, bactérias, fungos e animais, porém as plantas constituem a fonte mais explorada para obtenção destas moléculas, principalmente as encontradas em sementes, pelo melhor rendimento.

Sementes de *Cratylia mollis* Mart. Ex. Benth, uma forrageira nativa do território brasileiro, contém 4 isoformas da lectina denominada de Cramoll (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4). Preparações contendo as isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4) têm revelado apresentarem diversas atividades biológicas, tais como: mitogênica, cicatrizante, imunomoduladora, indutora de permeabilização interna da membrana mitocondrial, antifúngica contra *Cryptococcus gattii*, causador da criptococose e antiparasitária contra *Schistosoma mansoni*.

Os metabólitos secundários, por sua vez, são sintetizados em menor quantidade pelos vegetais quando comparados aos primários. Estes estão relacionados geralmente com os mecanismos de defesa da planta. Importantes atividades biológicas com aplicação de metabólitos secundários têm sido estudadas.

Libidibia ferrea var. *ferrea* (Mart. ex. Tul.) L. P. Queiroz é uma planta pertencente à família Leguminosae encontrada em boa parte do território brasileiro. Pesquisas utilizando partes desta planta comprovam suas importantes aplicações biológicas, tais como: atividade antioxidante, cicatrizante e antifúngica. Segundo a medicina popular, *L. ferrea* apresenta propriedades antiúlcera, homeostática, expectorante e antiparasitária.

Dentre as doenças causadas por parasitas, destacam-se as leishmanioses, infecções parasitárias crônicas provocadas por protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes à família Trypanosomatidae. As leishmanioses tornaram-se principais doenças tropicais negligenciadas, representando sérios problemas de saúde pública, em quase todos os continentes, com altos índices de mortalidade e morbidade.

Cerca de 22 diferentes espécies de *Leishmania* são responsáveis por causar leishmanioses através de 93 espécies de vetores flebotomíneos. Os diferentes sintomas caracterizam as principais formas deste complexo de doenças: Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral.

O tratamento para as leishmanioses vem sendo realizado principalmente através do uso de antimoniais pentavalentes, os quais apresentam elevada toxicidade, com indução de graves efeitos colaterais. A resistência dos parasitas às drogas utilizadas, bem como a recidiva da doença, inviabilizam a terapia, tornando-se necessária a utilização de novos agentes quimioterápicos para o tratamento adequado da doença.

Assim, as plantas, seus extratos e compostos purificados a partir deles são potentes agentes farmacêuticos que vêm sendo utilizados tradicionalmente por culturas nativas e na própria medicina para o tratamento de diversas doenças infecciosas e parasitárias.

Pesquisas demonstram o potencial biológico de lectinas e extratos como alternativas eficientes para o tratamento de doenças já convencionalmente tratadas. Estudos utilizando a Cramoll 1,4, bem como compostos extraídos de *L. ferrea*, têm revelado importantes aplicações biológicas. Portanto, nosso estudo visou avaliar o potencial leishmanicida, de compostos bioativos de *Libidibia ferrea* var *ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz e de *Cratylia mollis* (Mart. ex.) Benth, com baixa toxicidade ao hospedeiro mamífero, visando definir o potencial de uso, apontando para um tratamento mais adequado contra as leishmanioses.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar o efeito da compostos bioativos extraídos de *Cratylia mollis* e *Libidibia ferrea* var *ferrea* sobre formas evolutivas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, bem como sobre células de mamífero.

1.1.2 Específicos

- Purificar a lectina de *Cratylia mollis* - Cramoll 1,4;
- Avaliar a atividade da Cramoll 1,4 sobre a viabilidade, ultraestrutura e proliferação das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*;
- Avaliar o efeito da Cramoll 1,4 sobre macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c;
- Preparar extratos metanólicos da entrecasca e vagem de *L. ferrea* e determinar a composição química dos extratos por cromatografia de camada delgada - CCD e cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC;
- Avaliar o efeito dos extratos e do ácido gálico comercial, sobre macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c e células Vero;
- Avaliar a ação dos extratos de *L. ferrea* sobre a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio em células Vero.
- Avaliar a atividade biológica dos extratos e do ácido gálico comercial sobre a viabilidade, ultraestrutura e proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS

A biotecnologia constitui um campo multidisciplinar com uma vasta gama de utilidades, tais como processos de biorremediação, produção de biocombustíveis, e melhoria da saúde humana (GUPTA et al., 2016).

As plantas são utilizadas pela humanidade desde seus primórdios, para diversas finalidades, tais como fontes de alimentos e produtos funcionais. Estes últimos são compostos químicos encontrados na natureza que apresentam atividade biológica ou farmacológica (MUSTAFA et al., 2017). O primeiro registro da medicina para o uso de plantas como tratamento de doenças encontra-se depositado no museu da Pensilvânia/Estados Unidos. Tal registro data de 2.100 a.C. cujo documento contém fórmulas de trinta diferentes drogas de origem mineral, animal ou vegetal (FIRMO et al., 2011).

Plantas medicinais são grandes fontes de produtos funcionais. Estes vegetais são administrados ao homem ou animal por exercerem alguma função terapêutica, constituindo a matéria-prima para a fabricação de medicamentos, principalmente fitoterápicos (BULUT et al., 2017; LOPES; PANTOJA, 2013). Em países desenvolvidos como França, China e Alemanha diversos extratos de plantas são prescritos como medicamentos devido à presença de compostos bioativos (THOMFORD et al., 2018; JI et al., 2017; RUHSAM; HOLLINGSWORTH, 2017).

O uso de plantas na área medicinal pode trazer importantes benefícios, como baixo custo e baixa incidência de efeitos adversos, com toxicidade reduzida. Estima-se que na natureza existem cerca de 250 mil espécies de vegetais, porém apenas 0,75% de compostos extraídos de plantas medicinais foram testados em ensaios clínicos (MUSHTAQ et al., 2018; JAMEEL et al., 2014; SEN; CHATTERJEE, 2011).

O Brasil, país de dimensões continentais, abriga grande diversidade de fauna e flora, com biomas que apresentam características distintas, como o bioma da Caatinga, localizado exclusivamente neste país. Este bioma constitui um cenário para descoberta de compostos vegetais com propriedades para aplicações biotecnológicas.

Na Caatinga, destaca-se o Vale do Catimbau (Figura 1) localizado no agreste e sertão do estado de Pernambuco, com 62.294 hectares, que se estende pelos municípios de Buíque, Ibimirim, Tupanatinga e Inajá. O semiárido é o clima predominante, com médias de temperaturas anuais de 23°C e índice pluviométrico de até 600 mm anuais (COSTRA et al., 2009).

Figura 1 Vale do Catimbau - Pernambuco.



Fonte: Autoria própria.

As variações climáticas interferem diretamente no funcionamento das células vegetais. Ao conjunto de reações bioquímicas realizadas pelas células dá-se o nome de metabolismo. Substâncias comuns aos seres vivos, essenciais à vida e sintetizadas em grandes quantidades como carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos constituem o metabolismo primário das células. Já substâncias produzidas em menor quantidade constituem o metabolismo secundário (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Em 2014 estimou-se que existem mais de 300.000 metabólitos secundários na natureza (GURNANI et al., 2014).

Cerca de 400.000 espécies de plantas superiores compõem o reino vegetal, no entanto a investigação farmacológica com plantas terrestres atingiu apenas cerca de 5 a 15% desta

diversidade. Estima-se ainda que em torno de 25% dos fármacos existentes são de origem vegetal (GURNANI et al., 2014).

Na busca por compostos bioativos, as lectinas têm se mostrado como novas alternativas para o tratamento de patologias, pois suas diferentes propriedades possibilitam diversas aplicações em sistemas biológicos, como a avaliação de superfícies celulares (GERLACH et al., 2017; SAMAH et al., 2017). Nas plantas, por sua vez, as lectinas podem atuar diretamente na defesa, exercendo função inseticida (CHEN et al., 2017; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

Lectinas são proteínas que apresentam a característica comum de seletividade na interação com carboidratos. Com isto, estas moléculas podem reconhecer e ligar-se a glicanos localizados em superfícies celulares, promovendo aglutinação das células (TERADA et al., 2016). Esta característica confere às lectinas a capacidade de desempenhar diferentes atividades biológicas, como o efeito antiproliferativo contra o carcinoma hepatocelular com regulação positiva da expressão do gene P53 (EL-AASSAR et al., 2014).

Na Caatinga, a família Fabaceae destaca-se por compreender grande número de plantas com propriedades medicinais utilizadas pelas populações que habitam neste bioma (DROZINO et al., 2017; ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010). Tais propriedades podem estar relacionadas às lectinas e metabólitos secundários presentes nas espécies desta família.

Metabólitos secundários em sua grande maioria são moléculas de baixo peso molecular, de estrutura complexa e encontrados em baixas concentrações nos vegetais, com uma frequência inferior a 1% do carbono total. Sua estocagem pode ocorrer em órgãos ou células específicas. Muitas destas moléculas não estão relacionadas ao crescimento, desenvolvimento ou reprodução da planta, no entanto, podem estar diretamente ligadas à sobrevivência. São sintetizados geralmente em resposta aos estímulos do meio ambiente para adequação da planta a este meio. Ao contrário dos metabólitos primários, a ausência dos metabólitos secundários não resulta em morte imediata da planta (TIWARI; RANA, 2015; PEREIRA; CARDOSO, 2012; FUMAGALI et al., 2008).

Os metabólitos secundários provavelmente se originam a partir do metabolismo da glicose através de dois intermediários, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides. Um anel aromático é encontrado na estrutura de todos estes

compostos. Os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos e os alcalóides derivados deles; terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários geralmente são classificados de acordo com a rota biossintética. As três principais famílias destas moléculas são os compostos fenólicos, terpênicos e esteróides e os alcalóides.

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem o grupo com maior número de representantes dentre os metabólitos secundários sintetizados por plantas. Estas moléculas têm como característica a presença de um grupamento hidroxila (OH) ligado a um grupo de hidrocarboneto aromático (IGNAT et al., 2011; ROBARDS et al., 1999). Estes compostos podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis, de acordo com a quantidade de grupamentos fenólicos na molécula.

Um importante grupo de compostos fenólicos são os taninos. São moléculas que não se encontram livres nos tecidos das plantas, mas sob a forma de polímeros. Possuem maior peso molecular e de acordo com a estrutura são classificados em dois grupos, os taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Taninos hidrolisáveis são constituídos por um núcleo central de glicose ou um álcool poliidrico, esterificado com ácido gálico ou elágico. Hidrolizam-se com enzimas, ácidos ou bases. Taninos condensados são constituídos por polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina e não são prontamente hidrolisáveis por ácidos. Os taninos apresentam sabor indesejável, conferindo ao vegetal a sensação de adstringência (SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos são importantes moléculas envolvidas na defesa dos vegetais contra agentes patogênicos, constituindo o sistema antioxidante (NACZK; SHAHIDI, 2004; BRAVO, 1998). Muitos compostos fenólicos integram macromoléculas complexas ou encontram-se como glicosídeos conjugados (MANACH et al., 2004). São moléculas que podem interferir com a digestão, provocar crescimento lento, bloquear atividade enzimática e a divisão celular. Estes metabólitos podem desempenhar atividade antioxidante e inseticida. Alguns interferem na metamorfose de insetos, através da inibição da tirosinase, enzima chave neste processo (PANTOJA; COLMENARES; ISAZA, 2017).

Os flavonóides representam um vasto grupo de compostos fenólicos com cerca de 4500 representantes conhecidos. Podem ser encontrados na maioria dos tecidos vegetais em vacúolos, estando na forma de monômeros, dímeros ou oligômeros (TIWARI; RANA, 2015).

Flavonóides apresentam uma estrutura básica formada por C₆-C₃-C₆. Destacam-se neste grupo as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas (SOARES, 2002).

A análise fitoquímica de extratos metanólicos de *Jatropha curcas*, detectou a presença predominante de compostos de flavonas. Testes biológicos com o mesmo extrato revelaram a potente atividade antioxidante e citoprotetora associada a este flavonóide (PAPALIA; BARRECA; PANUCCIO, 2017).

Terpenos e Esteróides

Terpenos são hidrocarbonetos e constituem um grupo químico bem diversificado de produtos naturais. Apresentam função ecológica (defesa da planta, e atrativos de insetos/animais) e fisiológica no vegetal (hormônios e manutenção da estrutura da membrana) (KEMPINSKI et al., 2015).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de isoprenos que possui (unidades estruturais repetidas de 5 carbonos - isoprenóides). A síntese dos isoprenóides começa a partir dos dois precursores universais de cinco carbonos (C5): isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP). Estas unidades de prenil podem ser utilizadas diretamente para formar hemiterpenos ou polimerizadas em incrementos de cinco unidades de carbono através da adição sucessiva de IPP para gerar prenil-difosfatos de vários comprimentos de cadeia. Esses pré-difosfatos são os precursores universais de todos os terpenos primários encontrados em plantas, como monoterpenos (10 átomos de carbono, C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), carotenóides (C₄₀) e poliprenóis (mais que 45) (JIANG; KEMPINSKI; CHAPPELL, 2016).

Devido a esta diversidade química, os terpenos/terpenóides têm grandes usos industriais como aromas, fragrâncias, lubrificantes de alta qualidade, biocombustíveis, produtos químicos agrícolas e medicamentos (JIANG; KEMPINSKI; CHAPPELL, 2016). Sesterterpenoides, um pequeno grupo dos terpenos, apresentam importantes aplicações, tais como atividade anticâncer e anti-HIV (ZHANG et al., 2017). Saponinas triterpenoides extraídas do cerne de *Castanea sativa* apresentaram potencial para quimioprevenção de câncer de mama (PÉREZ et al., 2017).

Os esteróides, por sua vez, desempenham importantes funções hormonais nas plantas. Os brassinosteróides são encontrados amplamente nas várias partes de plantas angiospermas e gimnospermas, com exceção das raízes. Estes hormônios estão diretamente relacionados à

regulação do desenvolvimento e crescimento do vegetal. Podem ser aplicados de forma exógena, estimulando assim o crescimento da planta, podendo também induzir o alongamento da célula e consequente crescimento do caule, estimular ou inibir o crescimento e desenvolvimento das raízes (dependendo da concentração aplicada), flexão de folhas, produção de etileno e ativação de respostas ao estresse (LASHAK et al., 2018; ZHANG; AHMADI MOUSAVI; KALANTARI; TORKZADEH, 2005; YANG; TSAO, 1991). Esteróides também foram detectados em extratos de plantas e de fungos endofíticos com atividade antibacteriana (SILVA et al., 2017; ALVA et al., 2014).

Alcalóides

Alcaloides são substâncias de caráter básico principalmente derivadas de plantas, mas podendo ser também derivadas de fungos, bactérias e até mesmo de animais. São constituídas basicamente por nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. São geralmente sólidos brancos (com exceção da nicotina) e podem existir nas plantas, no estado livre, como sais ou como óxidos.

Os alcaloides podem ser classificados quanto à sua atividade biológica, estrutura química e origem biossintética, podendo ser divididos em três grupos: alcaloides verdadeiros, que possuem anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio e sua biossíntese se dá através de um aminoácido; protoalcaloides, aqueles em que o átomo de nitrogênio não pertence ao anel heterocíclico e se originam de um aminoácido (ex: mescalina e efedrina), e pseudoalcaloides, aqueles derivados de terpenos ou esteroides e não de aminoácidos (ex: solasodina).

Os alcalóides possuem diversas propriedades farmacológicas, ou seja, podem ser usados na fabricação de medicamentos. Grande parte dos alcaloides é usada na medicina como analgésicos e anestésicos. Seus principais efeitos podem ser bloqueios de canais iônicos, inibição enzimática ou interferência na neurotransmissão, produzindo alucinações, perda de coordenação, convulsões, vômitos, podendo ocasionar a morte (TIWARI; RANA, 2015).

Os efeitos biológicos de diferentes metabólitos secundários de origem vegetal têm sido comprovados tais como agente antioxidante, antibacteriano, anticancerígeno, repelente e inseticida (YEASH, 2017). Diversos grupos químicos presentes nesses metabólitos secundários de extratos vegetais, como alcalóides, flavonóides, taninos, esteroides, chalconas

e naftoquinonas estão diretamente relacionados com os efeitos contra *Leishmania* (KLEIN et al., 2009).

As plantas são importantes fontes de pesquisa para descoberta de drogas, principalmente no que diz respeito a drogas antiparasitárias, devido à associação entre a coexistência dos parasitas e plantas medicinais (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005).

Dentre as espécies vegetais das quais são extraídos compostos para a formulação de drogas com ação antiparasitária, destaca-se a *Cinchona succirubra*. A Quinina é extraída a partir da casca de *C. succirubra*, possuindo ação antimalárica, antifebril, ação contra doenças na garganta e anticâncer (MUSHTAQ et al., 2018; DIAS et al., 2012; DELEU et al., 2004).

Grandes esforços são destinados à descoberta de compostos naturais para formulações de novos medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas causadas por parasitas, como as leishmanioses (JOSHI et al., 2016).

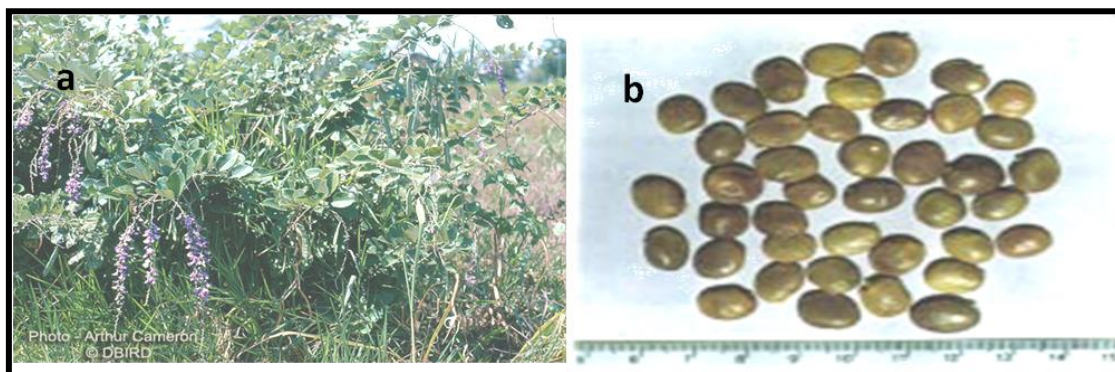
Frações hexânicas das folhas de *Lacistema pubescens* foram testadas contra formas promastigostas de diferentes espécies de *Leishmanias* e apresentaram IC₅₀ de 3,5 µg/mL para *Leishmania amazonensis*, 4,2 µg/mL para *Leishmania major* e 17 µg/mL para *Leishmania braziliensis* (SILVA et al., 2014). Em outro estudo, frações hexânicas ricas em fitol, metabólito secundário mais abundante (87%) das folhas de *L. pubescens*, apresentaram atividade antileishmania contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com valores de IC₅₀ de 44,0 e 25,8 µg/mL respectivamente. Os principais danos causados à célula foram diminuição acentuada no potencial da membrana mitocondrial e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (SILVA et al., 2015).

2.2 LECTINA DE *Cratylia mollis*

Cratylia mollis é uma forrageira nativa do Semiárido do Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como feijão camaratu ou camaratuba (Figura 2), pertencente à mesma família Leguminosae e subtribo Diocleinae da *Canavalia ensiformis*, conhecida como feijão de porco, da qual é extraída a lectina Concanavalina A (Con A). Das sementes de *C. mollis* foram purificadas as quatro isoformas da lectina Cramoll: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Cramoll 1,4 é uma preparação contendo as isoformas Cramoll 1 e

Cramoll 4 (CORREIA; COELHO, 1995; PAIVA; COELHO, 1992).

Figura 2 *Cratylia mollis* (a) e suas sementes (b).



Cramoll 1,4 e a lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) apresentam 82% de homologia em sequência de aminoácidos com grande similaridade em sua estrutura terciária e quaternária (SOUZA et al., 2003), o que justifica a mesma especificidade aos monossacarídeos glicose e manose exibida por ambas as lectinas (CORREIA; COELHO, 1995; SOUZA et al., 2003).

Importantes aplicações biológicas foram descritas para Cramoll, 1,4. A lectina apresentou estabilidade quando imobilizada em gel de galactomanana (ALBUQUERQUE et al., 2016). Posteriormente, em estudos *in vivo* avaliaram a imobilização de Cramoll 1,4 em membranas de galactomanana as quais revelaram um excelente poder cicatrizante (ALBUQUERQUE et al., 2017). A Cramoll 1,4 também apresentou atividade antitumoral *in vivo* e, quando encapsulada em lipossomas, observou-se um aumento dessa atividade (ANDRADE et al., 2004). Cramoll 1,4 recombinante expressa em *Escherichia coli* apresentou ação atitumoral. Este efeito foi potencializado quando a lectina foi encapsulada em lipossomas e também provocou aumento significativo na concentração de leucócitos (Da CUNHA et al., 2016). O potencial imunomodulatório de Cramoll 1,4 e da lectina recombinante foi comprovado em estudos com células do exudato peritoneal de camundongos. Estas lectinas induziram o aumento da produção de óxido nítrico, íons superóxido e citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α . Em exsudatos peritoneais de camundongos infectados com *Staphylococcus aureus*, as lectinas diminuíram a indução da produção das citocinas TNF- α e IL-6 e aumentaram a expressão de IL-1 β , IFN- γ (Da SILVA et al., 2015a).

Cramoll 1,4 nativa e recombinante foram altamente efetivas na proteção contra o estresse oxidativo provocado por peróxido de hidrogênio em células Vero. Possivelmente,

estas lectinas bloquearam a citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio, atuando na diminuição de espécies reativas de oxigênio e reestabelecendo o potencial de membrana mitocondrial, prevenindo ainda danos lisossomais, bem como a fragmentação do DNA (Da SILVA et al., 2015b).

Cramoll 1,4 imobilizada por interações eletrostáticas em um biossensor de nanocompósitos híbridos compostos por nanopartículas de ouro (AuNps) e polianilina (PANI) foi capaz de reconhecer glicoproteínas séricas de diferentes serotipos e estágios da infecção por dengue, tornando-se um candidato promissor para o desenvolvimento de um novo protocolo de diagnóstico com base no reconhecimento de glicoproteínas virais (AVELINO et al., 2014). Cramoll 1,4 foi conjugada com sucesso a *quantum dots* por adsorção em pH 7,0. Esta conjugação não causou mudanças consideráveis na atividade de hemaglutinação da lectina, ou nas propriedades ópticas dos nanocristais. Esse nanossistema permaneceu estável por pelo menos um ano após a bioconjugação (CUNHA et al., 2018).

Cramoll 1,4 foi eficaz no reparo de lesões teciduais em camundongos, estimulando o fechamento das feridas em menor tempo, tornando mais intenso o processo de granulação e deposição de fibras colágenas (MELO et al., 2011).

Em decorrência das várias atividades biológicas apresentadas pela lectina extraída das sementes de *C. mollis*, estudos sobre sua possível ação no tratamento das leishmanioses deverão ser avaliados.

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Libidibia ferrea* VAR *ferrea*

A família Fabaceae possui 500 espécies de plantas distribuídas mundialmente, dentre elas as plantas do gênero *Libidibia*. *Libidibia ferrea* var *ferrea* (Mart. ex. Tul.) L. P. Queiroz, é uma planta nativa do Brasil, amplamente distribuída no norte e nordeste do país, onde é comumente conhecida como "Jucá" ou "pau-ferro". Trata-se de uma espécie lenhosa que ocorre em sua maioria em zonas tropicais e subtropicais (ZANIN et al., 2012). *L. ferrea* é uma árvore de médio porte (Figura 3), medindo entre 10 a 15 metros de altura por 40 a 60 centímetros de diâmetro (LORENZI, 2002).

Farmacologicamente, espécies do gênero *Libidibia* apresentam atividade analgésica, anti-úlceras, anti-helmíntica, antibacteriana, inseticida, antifúngica, anti-inflamatória, antipirética, antioxidante, antiproliferativa, antiviral, imunomoduladora e imunossupressora. Plantas da família Fabaceae são caracterizadas por conter diferentes metabólitos secundários, tais como polifenóis, terpenos e esteroides. Estas moléculas provavelmente são responsáveis pelas diversas atividades biológicas destes vegetais (ZANIN et al., 2012).

Figura 3 *Libidibia ferrea ferrea* (Mart. ex. Tul.) L. P. Queiroz e suas vargens.



Libidibia ferrea Mart. ex Tul. L. P. Queiroz (1 - Haste; 2- Arvore; 3- Árvore com as partes aéreas; 4- Partes aéreas; 5- Fruto; 6 A - Frutos; 6 B - Sementes. Fonte: PAULO AIRES, 2014, in FERREIRA; SOARES, 2015.

L. ferrea é vastamente explorada na medicina tradicional e todas as partes da planta apresentam atividade biológica. As suas vagens são usadas para combater a anemia, doenças relacionadas ao pulmão, tosses e diabetes. O extrato aquoso da vagem ainda apresenta atividade antifúngica, antiulcerogênica, anti-inflamatória e analgésica (ZANIN et al., 2012). A atividade bacteriana foi demonstrada com a aplicação dos extratos metanólico e

hidroalcoólico da vagem de *L. ferrea* (MARREIRO et al., 2014; SAMPAIO et al., 2009), onde o extrato alcoólico demonstrou potente atividade antioxidante (SILVA et al 2011).

Extratos brutos das vagens de *L. ferrea* apresentaram potencial antiproliferativo frente a células de câncer colorretal humano (linhagem HT-29), com indução de apoptose através da via intrínseca (GUERRA et al., 2017).

O extrato aquoso de sementes de *L. ferrea* foi aplicado contra ovos do nemátodo *Haemonchus contortus*, parasita de ruminantes, demonstrando neste estudo o potencial ovicida de *L. ferrea* (SALES et al., 2014). O extrato aquoso parcialmente purificado das sementes contém inibidores de proteases e, quando aplicado contra várias espécies de fungos, impede o crescimento micelial e a esporulação (BARIANI, 2012).

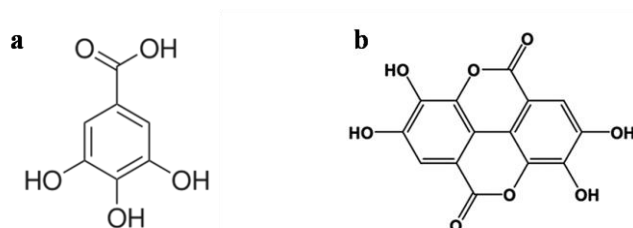
A infusão da casca é utilizada para tratamento de diarreia e enterocolites. Sementes e cascas são utilizadas para o tratamento de lesões. As raízes são empregadas no tratamento da diabetes, diarreia e no controle à febre (BARROS, 1982; BALBACH, 1972).

Extratos brutos da entrecasca e galhos apresentaram atividade antifúngica contra várias cepas de referência e isolados clínicos de dermatófitos (BIASI-GARBIN, et al., 2016). Os extratos da entrecasca e vagem de *L. ferrea* apresentaram efeitos antirrugas e despigmentantes, demonstrando a possibilidade de sua utilização como componentes para cosméticos, análises da composição química destes extratos apontam para flavonóides e ácido fenólicos como os principais constituintes (PEDROSA et al., 2016).

Os principais compostos fenólicos presentes no extrato aquoso da vagem de *L. ferrea* são os taninos hidrolisáveis, o ácido gálico e o ácido elágico (FERREIRA et al., 2016; FERREIRA; SOARES, 2015). A presença de catequinas (taninos condensados) também foi evidenciada em extratos aquosos e cetônicos (DE ARAÚJO et al., 2014).

O ácido gálico e o ácido elágico (Figura 4) são importantes fenóis encontrados em frutos como romã, cajá, nozes, groselha, framboesa, morango e manga, bem como no chá verde (BRITO et al., 2018; CARMO et al., 2016).

Figura 4 Estrutura química do ácido gálico (a) e ácido elágico (b).



Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_g%C3%A1lico; RÍOS et al., 2018. (Adaptada).

Ácido gálico e ácido elágico apresentam propriedades antibacteriana, antioxidante, protetora da mucosa gástrica, com atividade antiúlcera (BRITO et al., 2018; SILVA et al., 2014; BROININZI et al., 2007; CHANWITHEESUK et al., 2007). Ainda são reportadas a estes compostos fenólicos as propriedades antiinflamatória (BENSAAD et al., 2017) e atividade antiviral - inibidores da entrada dos vírus Ebola e Marburgo infectivo em células HeLa (CUI et al., 2018).

Estudos recentes revelaram que o ácido gálico pode inibir seletivamente o crescimento de bactérias patogênicas, como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, sem afetar a viabilidade dos probióticos, como *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus* (PACHECO-ORDAZ et al., 2018). Aos compostos ácidos gálico e elágico, recentemente foi evidenciada a atividade antileishmania contra *L. major* (ALVES et al., 2017). Em fevereiro de 2009 no Brasil, o Ministério da saúde incluiu a *L. ferrea* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS-RENISUS) (DROZINO et al., 2017).

Diante do potencial biotecnológico da vagem e entrecasca de *L. ferrea* devido aos metabólitos secundários presentes nestas partes da planta, associado à necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento adequado das leishmanioses, surge uma nova perspectiva nesse sentido. A avaliação de seus efeitos sobre os parasitas causadores das leishmanioses e dos mecanismos intracelulares envolvidos constitui um campo aberto.

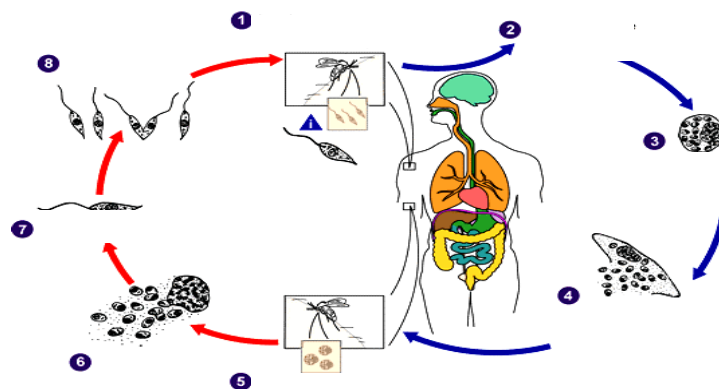
2.4 *Leishmania*

Leishmania é um gênero de parasita pertencente à família Trypanosomatidae, descrito a partir do século XIX como agente etiológico das doenças hoje conhecidas como leishmanioses. Em 1885, Cunningham, na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de leishmaniose visceral. Borovisky, pesquisador russo no ano de 1898, demonstrou ser o parasita o agente etiológico da doença conhecida por botão do oriente, patologia classificada atualmente por leishmaniose cutânea. Em 1903, os parasitas receberam a denominação de *Leishmania*, a qual nomeia o gênero. Aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares, com

bases em características clínicas e epidemiológicas, classificam as espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum* como constituintes do gênero (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 1997).

As *Leishmanias* são parasitas digenéticos ou heteroxênicos, pois necessitam de dois hospedeiros para completarem o ciclo de vida (Figura 5) e se apresentam sob duas formas: promastigota e amastigota. No tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, o parasita na forma extracelular promastigota se multiplica e se desenvolve. No momento do repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicos são injetados pelo inseto no organismo do hospedeiro vertebrado. Além dos parasitas, imunomoduladores e outros componentes presentes na saliva do inseto são inoculados na pele do hospedeiro vertebrado. Ao cair na corrente sanguínea o parasita e outros fatores são absorvidos por células dendríticas, neutrófilos e, sobretudo macrófagos. No interior de vacúolos fagolisossômicos destas células, o protozoário se diferencia em amastigota. Os macrófagos infectados são principalmente os da pele, os dos órgãos do retículo endotelial, como fígado, baço, medula óssea e os dos gânglios linfáticos (BORGHI et al., 2017; HANDLER et al., 2015).

Figura 5 Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (Adaptado).

- (1) Flebotomíneo faz repasto sanguíneo (injeta promastigotas);
- (2) Promastigotas são fagocitadas por macrófagos;
- (3) Promastigotas são transformados em amastigotas dentro dos macrófagos;
- (4) Multiplicação de amastigostas com rompimento de macrófagos e liberação dos parasitas;

- (5) Flebotomíneo faz o repasto sanguíneo, ingerindo amastigotas;
- (6) Ingestão de células parasitadas;
- (7) Amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino médio do inseto;
- (8) Divisão binária e migração para a probóscide do inseto.

Os parasitas *Leishmanias* são unicelulares e possuem organelas comuns a células eucarióticas, como núcleo, além de outras peculiares dos tripanossomatídeos, como o cinetoplasto (Figura 6). Esta organela pode ter grande relevância por apresentar-se como alvo para o desenvolvimento de novas drogas para quimioterapia contra as leishmanioses.

Figura 6 Eletromicrografia em microscópio eletrônico de transmissão de promastigota de *Leishmania infantum* - presença de núcleo (n) e cinetoplasto (k).

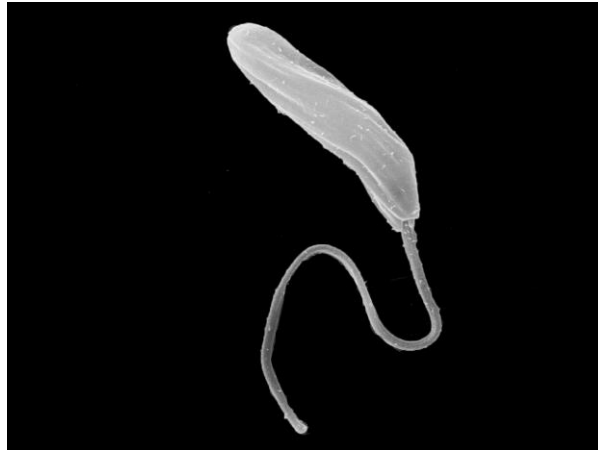


Fonte: Autoria própria.

As formas promastigotas apresentam morfologia alongada, com flagelo emergente da bolsa flagelar, localizada na porção anterior da célula. O corpo celular mede entre 5 a 20 por 2 a 4 μm . O flagelo mede cerca de 20 μm de comprimento (Figura 7). As amastigotas apresentam dimensões de 2 a 4 μm (Figura 8) e o flagelo está restrito apenas à bolsa flagelar (VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002). Estudos com *Leishmania mexicana* evidenciaram que o flagelo deste parasita se duplica uma vez durante o ciclo celular,

indicando que o crescimento desta organela inicia-se primeiro, seguido pela mitose (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

Figura 7 Eletromicrografia em microscópio eletrônico de varredura de promastigota de *Leishmania infantum*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 8 Eletromicrografia em microscópio eletrônico de varredura de amastigota de *Leishmania* spp no interior de vacúolos parasitóforos em macrófago.



Fonte: <http://diganaoaleishmaniose.blogspot.com.br/2014/03/pesquisadores-brasileiros-sequenciaram.html>.

Leishmanias possuem compartimentos distribuídos em todo o corpo celular, tais como os glicossomos e acidocalcisomos. Glicossomos, compartimentos que armazenam enzimas glicolíticas, são organelas pertencentes à família dos peroxissomos. São envolvidas por uma bicamada lipídica única. Em amastigostas, 90% do conteúdo glicossômico é constituído por enzimas envolvidas no processo glicolítico. Além da via glicolítica, a produção de succinato e glicerol também foi identificada no interior dos glicossomos (MICHELS et al., 2006). Acidocalcisomos são compartimentos para armazenamento de íons cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), sódio (Na^+), pirofosfato e zinco (Zn^{2+}) (DO CAMPO; MORENO, 1999).

Tripanosomatídeos, diferentemente da maioria dos eucariotos, possuem mitocôndria única. Esta organela está disposta sob os microtúbulos subpeliculares. A mitocôndria dos protozoários da ordem Kinetoplastida possui uma região especializada, rica em moléculas de DNA circular, o kDNA, interligadas em uma rede única. Perpendicular ao eixo flagelar, está localizado o DNA do cinetoplasto. No ciclo celular, o cinetoplasto se divide após o início da anáfase nuclear. Esta importante organela está localizada a uma distância constante de aproximadamente 2,5 μm da extremidade anterior da célula (Figura 6) (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

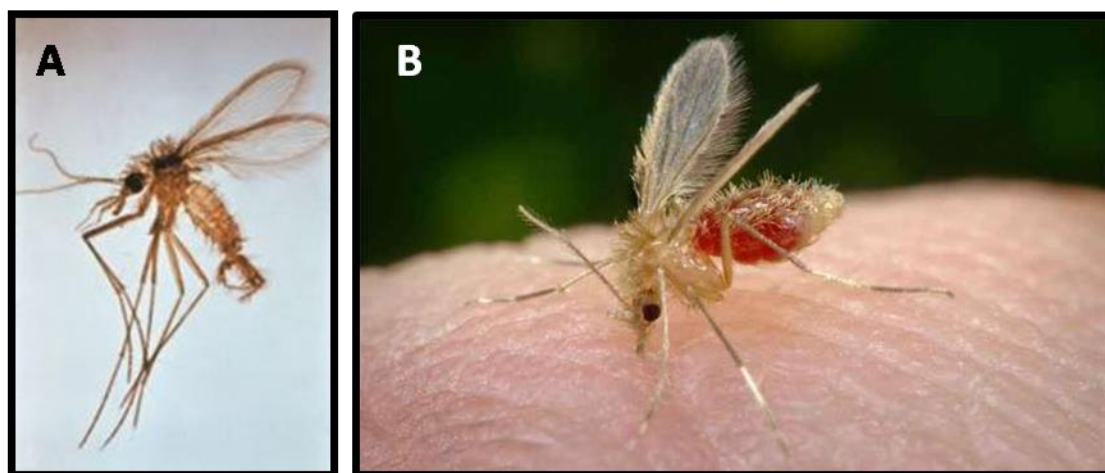
Estruturalmente, as mitocôndrias dos tripanosomatídeos são variáveis de acordo com o gênero e espécie, porém, de forma geral, a organela é constituída por uma matriz densa, com cristas tubulares finas e irregularmente distribuídas. Em espécies do gênero *Leishmania*, em algumas situações, é possível observar grande número de cristas. O DNA presente no cinetoplasto representa cerca de 30% do DNA total da célula. O grau de renaturação e densidade difere o DNA do cinetoplasto, das demais moléculas de DNA presentes na natureza (SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUES, 2009).

2.5 LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem um grupo de doenças não contagiosas causadas por parasitas (protozoário *Leishmania*) que invadem e se reproduzem dentro das células que fazem parte do sistema imunológico (macrófagos) da pessoa infectada. Trata-se de infecções transmitidas ao homem e outros mamíferos por intermédio de insetos vetores. No velho mundo (Europa, Ásia e África), mosquitos do gênero *Phlebotomus* são os hospedeiros

intermediários do parasita, enquanto que no novo mundo (Américas), o gênero *Lutzomya* é o responsável pela transmissão dos protozoários (Figura 9) (MCCARTHY et al., 2013; JIMÉNEZ et al., 2013).

Figura 9 Insetos vetores.



A- *Phlebotomus*; B- *Lutzomya*

Fonte: A - <http://www.langfordvets.co.uk/diagnostic-laboratories/services/mdu-pcr-acarus/list-acarus-tests/diseases-transmitted-sand-flies>.

B- https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2017/09/19/interna_gerais,901617/leishmaniose-volta-a-crescer-em-minas-gerais-e-mata-mais-que-a-dengue.shtml.

Fêmeas de insetos flebotomíneos infectadas no ato do repasto sanguíneo inoculam o parasita no animal mamífero, inclusive o homem. A infecção pode provocar lesões no local da picada ou em órgãos internos, como baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides (SILVA et al., 2017). A diversidade de sintomas depende da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (SINGH; SUNDAR, 2014). No entanto, o diagnóstico para estas doenças constitui um desafio para a medicina, pois os sinais e sintomas característicos se assemelham a outras patologias malignas, tanto de órgãos internos como do tecido cutâneo (BORGHI et al., 2017; HANDLER et al., 2015).

Este complexo de doenças pode se manifestar de duas principais formas: leishmaniose tegumentar ou cutânea, sua forma mais comum, e a leishmaniose visceral, que é fatal se não tratada.

As leishmanioses atingem as populações mais pobres do planeta, e estão associadas a desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, e a baixa imunidade. As leishmanioses também podem estar relacionadas a mudanças ambientais como o desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização. Em 2014 foi reportado que cerca de 12 milhões de pessoas são portadoras destes tipos de infecções (SINGH; SUNDAR, 2014).

2.5.1 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea é caracterizada por lesão, geralmente única na pele (Figura 10). Algumas variações podem ocorrer, como a forma esporotricóide. Neste caso, além da lesão própria da leishmaniose tegumentar, é constatado o aparecimento de pequenos nódulos subcutâneos endurecidos ao longo de vasos linfáticos (LÓPEZ-ESCOBAR et al., 2007). As lesões características desta enfermidade provocam o surgimento de úlceras em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e deficiência grave. Estudos indicam que as lesões ulcerativas provocadas pela leishmaniose tegumentar são indolores, sugerindo que a infecção ou o próprio parasita seja capaz de modular a percepção da dor e transmissão nociceptiva (BORGHI et al., 2017).

Figura 10 Casos de Leishmaniose Tegumentar ou Cutânea.



Fonte: <http://alertandogeral.blogspot.com.br/>

A leishmaniose tegumentar pode agravar-se quando os macrófagos da mucosa naso-orofaringe tornam-se infectados, ocasionando lesões nestes locais. Caracteriza-se pela presença de úlcera na mucosa nasal, com ou sem perfuração, ou perda do septo nasal, podendo atingir lábios, palato e nasofaringe. Ao acometimento das mucosas dá-se o nome de leishmaniose mucocutânea (Figura 11). Esta patologia ocorre geralmente meses ou mesmo anos após o primeiro episódio da leishmaniose tegumentar ou cutânea (FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS, 2010; CHAPPUIS et al., 2007).

Numerosos nódulos não ulcerativos disseminados pelo corpo caracterizam a leishmaniose cutânea difusa (Figura 12) (SHKODRANI et al., 2017).

Figura 11 Caso de Leishmaniose Mucocutânea



A- Destruição total da cartilagem nasal com extensão da lesão ao lábio superior. Lesões infiltradas e ulceradas na região malar esquerda em diferentes estágios evolutivos. B - Ulcerações com abundante secreção purulenta e necrose na região malar esquerda e lábio superior, além do corroído em infiltrada lesão na mucosa do palato duro.

Fonte: VELOSO et al., (2006).

Figura 12 Casos de Leishmaniose cutânea difusa



A - Lesões do tipo polipóide na base da orelha esquerda, associado à placa infiltrada com exulceração no contorno da orelha. Lesão do tipo tubérculo na asa do nariz esquerdo. B - Lesões do tipo placas infiltrativas, algumas com exulceração comprometendo as pernas direita e esquerda. Lesão do tipo tubérculo com exulceração localizada no joelho esquerdo.

Fonte: COSTA et al., (2009).

A leishmaniose tegumentar é considerada uma das seis doenças infecciosas mais importantes devido a sua magnitude e pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades, podendo ter repercussões psicológicas e reflexos no campo social dos indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Constitui um grave problema de saúde pública por ser endêmica em 87 países (Figura 13). No ano de 2015 foram notificados 46.304 novos casos autóctones de leishmaniose tegumentar em 21 dos 35 países localizados nas Américas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

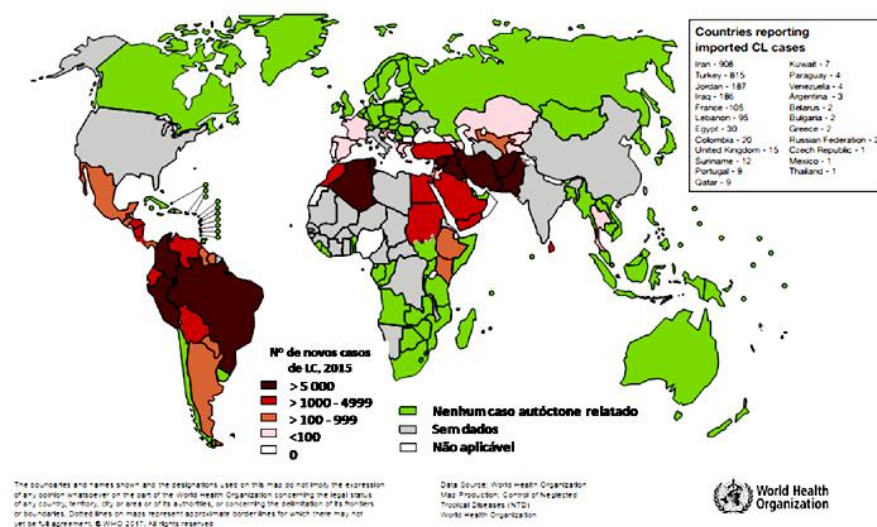
Dados da organização mundial de saúde indicam que cerca de 95% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iran (República Islâmica) e a República Árabe Síria. Estima-se que 0,7 milhões a 1,3 milhões de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

A *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* e *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* são os principais agentes causadores desta doença nas Américas e especificamente no Brasil (GOTO; LINDOSO, 2010; BAILEY; LOCKWOOD, 2007).

No Brasil, casos de leishmaniose tegumentar provocados por *L. amazonensis* são registrados nas cinco regiões. Na região Norte, estão distribuídos pelas florestas primárias e

secundárias da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins), incluindo o estado do Maranhão na região Nordeste. Nesta região também são identificados casos no estado da Bahia. Sua abrangência ainda é ampliada para o Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e no Paraná, localizado na região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Figura 13 Distribuição geográfica de leishmaniose tegumentar, 2015.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2017 (Adaptado).

2.5.2 Leishmaniose Visceral

Os primeiros casos de Leishmaniose Visceral (LV) aconteceram na Índia no ano de 1885, contudo, somente em 1903, William Boog Leishman e Charles Donovan descreveram o agente causador desta doença associando-o às formas de *Trypanosoma* (LEISHMAN, 1903).

A LV é uma doença sistêmica, podendo ser fatal quando não tratada. Caracteriza-se por acessos irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. Constitui a segunda maior causa de morte por infecções parasitárias no mundo, perdendo apenas para a malária. Desta forma, a LV é a forma mais grave das leishmanioses. Após a

infecção pelos flebótomos, os parasitas se disseminam através do sistema linfático e vascular e infectam monócitos e macrófagos do sistema retículo-endotelial, resultando na infiltração da medula óssea. O parasita também migra para o fígado e baço causando hepatoesplenomegalia e, por vezes, linfonodos aumentados (Figura 14), podendo resultar na morte do hospedeiro. É importante ressaltar que a infecção nem sempre condiz com a doença clínica. A proporção de infecções assintomáticas incidentes a casos clínicos varia (CHAPPUIS et al., 2007; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; RITTIG; BOGDAN, 2000). Os sintomas inicialmente característicos da doença são febre prolongada, fraqueza, fadiga, caquexia grave, culminando com hepatomegalia e esplenomegalia, anemia progressiva, hemorragias e escurecimento da pele (ORYAN, 2015; JAIN; JAIN, 2013).

No Marrocos, Região do Mediterrâneo, duas crianças (uma com nove meses e outra com um ano de idade) acometidas por sintomas tais como hepatoesplenomegalia febril (39 ° C), anemia, palidez das membranas mucosas, além de lesões cutâneas, foram diagnosticadas com leishmaniose visceral por detecção de *L. Infantum*; porém, uma das crianças apresentou duas lesões pápulo-cutâneas que não cicatrizaram após administração de antibióticos. A coinfeção por *Leishmania tropica* foi evidenciada, caracterizando, além da leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar (MOUTTAKI et al., 2018). Casos de coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) são frequentes e constituem graves problemas de saúde pública (FONTOURA et al., 2018).

Figura 14 Caso de Leishmaniose Visceral.

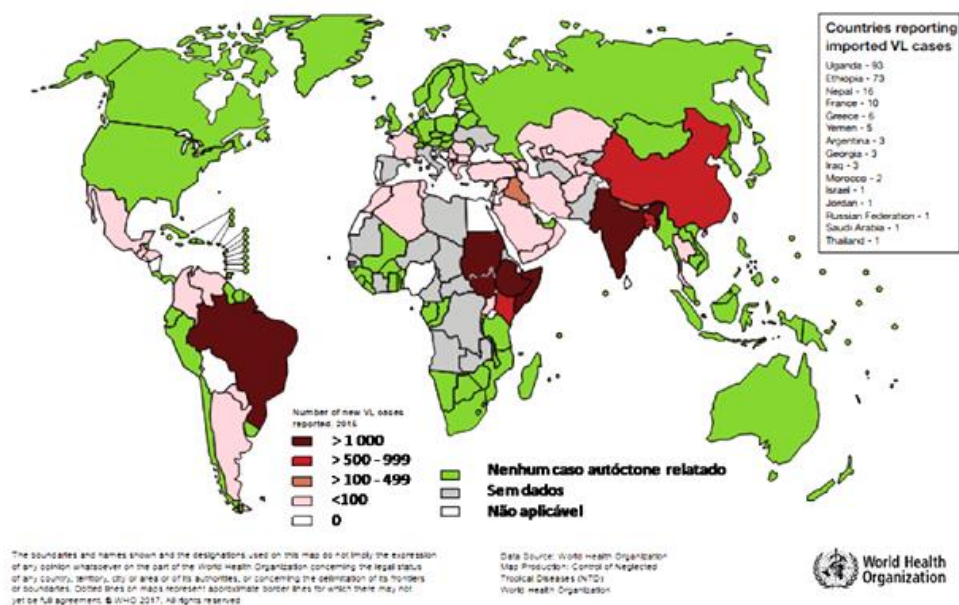


Fonte: <http://www.medicinapratica.com.br/tag/leishmaniose-visceral/>

A transmissão do parasita acontece de duas formas distintas, a antrópica e a zoonótica. A transmissão antrópica ocorre quando o inseto vetor transmite o parasita entre seres humanos, tendo como agente etiológico a *Leishmania donovani*, ocorrendo no subcontinente indiano e África Oriental. Já a transmissão zoonótica acontece entre seres humanos e animais através do agente etiológico *Leishmania infantum*, estando distribuída na região do Mediterrâneo, Américas, Sudoeste e Ásia Central (ALVAR et al 2012).

A leishmaniose visceral é endêmica em 75 países (Figura 15), principalmente em países localizados no subcontinente indiano e leste da África. Mais de 90% dos novos casos ocorrem em 6 países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Na região das Américas, 11 países são considerados endêmicos, totalizando 3.456 novos casos autóctones no ano de 2015 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017; 2016).

Figura 15 Distribuição geográfica de leishmaniose visceral, 2015.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2017 (Adaptado).

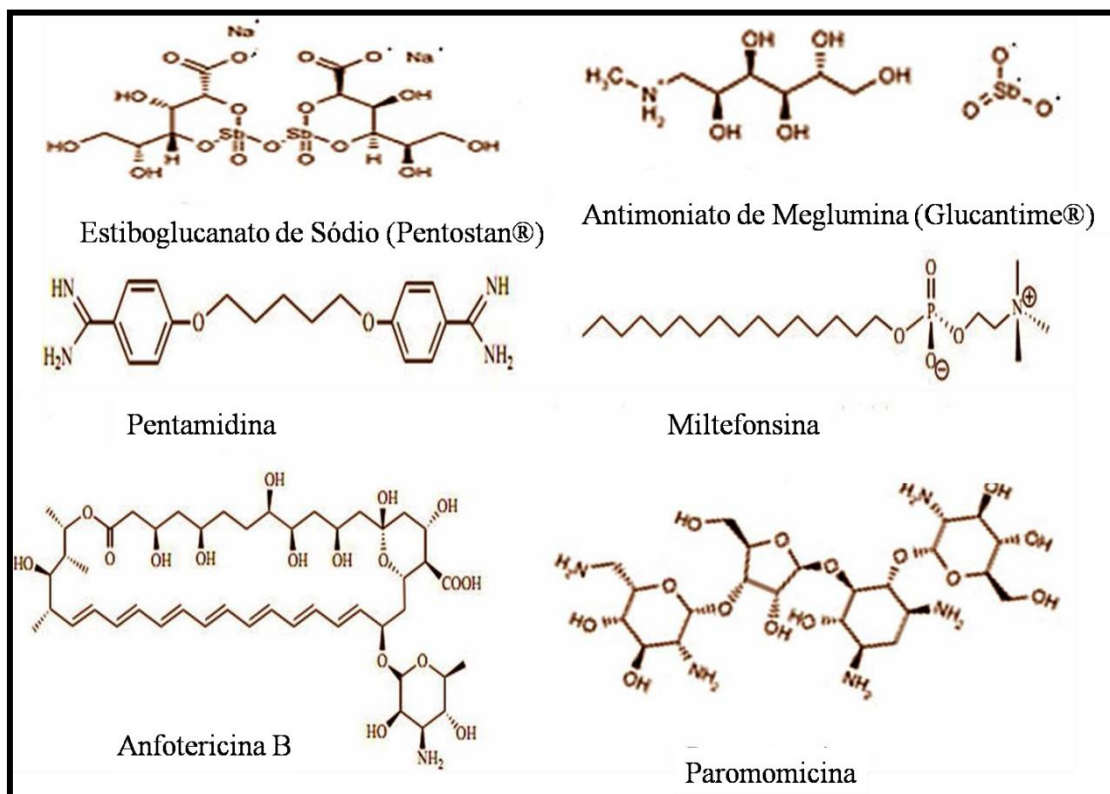
Na América Latina cerca de 90% dos casos notificados de leishmaniose visceral são registrados no Brasil, distribuídos amplamente no território nacional. Desta forma, 3500 casos são contabilizados anualmente, com coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes. O aumento gradativo da letalidade fez com que no ano 2000 3,1% dos casos resultassem em óbito, já em 2015 o registro de óbitos totalizou 7,8% dos casos. Esta doença, que anteriormente estava restrita a áreas rurais, atualmente afeta várias áreas urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

2.6 TRATAMENTOS PARA AS LEISHMANIOSES

Devido o aumento do número de casos, as leishmanioses tegumentar e visceral representam graves problemas de saúde pública. O tratamento constitui a grande arma no combate às infecções, devido à complexidade de sua epidemiologia. Por serem doenças negligenciadas, o investimento em seu tratamento é insuficiente. Além do tratamento, torna-se necessário o estudo da população afetada em cada país para o estabelecimento de medidas eficazes de controle da doença (De LIMA et al., 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Os tratamentos de primeira escolha contra todos os tipos de leishmanioses, na maioria dos países, são realizados com agentes antimoniais pentavalentes. Tratamentos alternativos com anfotericina B, miltefosina, paramomicina e pentamidina constituem o tratamento de segunda escolha (Figura 16).

Figura 16 Estrutura bidimensional de drogas mais comumente utilizadas contra as leishmanioses.



Fonte: ORYAN (2015) - Adaptado.

No Brasil, França e em países que falam a língua francesa, o tratamento de primeira escolha é realizado com a administração do antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como Glucantime. Nos países de língua inglesa, o tratamento se dá pelo uso do estibogluconato de sódio, comercializado como Pentostan (FIOCRUZ, 1997).

Graves efeitos colaterais são relatados, como distúrbios de repolarização ventricular, causando cardiotoxicidade. Estas alterações são dose-dependente e tempo-dependente. Sérias complicações como nefrotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade também são notificadas. Mialgias e artralgias, cefaleia, náuseas, vômitos e dor abdominal, também podem acompanhar o tratamento. Além destas consequências, o tratamento pode ser interrompido devido à dor e edema no local de aplicação (OLIVEIRA; GILBET; BÔAS, 2013).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes está diretamente relacionado à inibição da glicólise e oxidação de ácidos graxos. A administração destes fármacos é realizada por via intravenosa e intramuscular (KAUR; RAJPUT, 2014). Os órgãos mais afetados pelos

efeitos tóxicos dos antimoniais pentavalentes são fígado, pâncreas e rins (KAUR; RAJPUT, 2014). Os rins são os principais responsáveis pela eliminação dos antimoniais pentavalentes da corrente sanguínea. A redução da capacidade de concentração urinária é o principal efeito nefrotóxico. Assim, a utilização dessas drogas é contraindicada em pacientes com qualquer grau de insuficiência renal, sendo recomendado o tratamento de segunda escolha, como a anfotericina B, indicado também em casos de pacientes grávidas (NEVES et al., 2011; TRACY; WEBSTER, 2001).

O antifúngico anfotericina B é utilizado como segunda opção para o tratamento das leishmanioses devido aos graves efeitos tóxicos, sendo administrado apenas quando o paciente não responde ao tratamento com os antimoniais pentavalentes. Este fármaco interage preferencialmente com os esteróis substituídos na posição 24 (ergosterol e episterol), localizados na membrana plasmática da *Leishmania*, provocando a mudança na sua permeabilidade seletiva para K^+ e Mg^{2+} . A toxicidade é provocada quando a molécula se liga também ao colesterol presente na membrana plasmática das células do hospedeiro mamífero (OLIVEIRA; GILBET; BÔAS, 2013; RAMOS, 1996). A administração se dá por via intravenosa e os efeitos colaterais mais notáveis são febre, náuseas, anorexia, leucopenia, problemas cardíacos e renais (KAUR; RAJPUT, 2014).

Outra droga alternativa para o tratamento contra as leishmanioses é a miltefosina, um medicamento desenvolvido inicialmente para o tratamento antineoplásico oral. Porém seu efeito antileishmania foi comprovado contra a leishmaniose visceral. O seu mecanismo de ação está diretamente relacionado à modulação dos receptores da superfície celular de células de mamíferos. Interfere no metabolismo do inositol, ativação da fosfolipase, proteína cinase C e outras vias mitogênicas, provocando apoptose (IQBAL et al., 2016; VERMA; DEY, 2004). A administração do medicamento é realizada por via oral e os efeitos colaterais mais notáveis são náuseas, vômitos, diarreia e níveis elevados de creatinina e consequentemente insuficiência renal (KAUR; RAJPUT, 2014).

A quimioterapia contra as leishmanioses pode ser administrada pela utilização da diamina aromática pentamidina, medicamento de segunda escolha. A pentamidina liga-se ao DNA, inibindo a replicação, modifica também a morfologia do cinetoplasto. O fármaco é administrado por via parenteral intramuscular. Importantes efeitos colaterais como a indução do diabetes insulino dependente está associado à utilização deste tratamento. Náuseas, vômitos, dores musculoesqueléticas, cefaléia, hipotensão, lipotimia, síncope,

hipoglicemia e hiperglicemia, bem como dor e abscessos no local de aplicação são comuns (BRASIL, 2003).

Paromomicina também constitui uma opção de tratamento de segunda linha contra as leishmanioses. O mecanismo de ação está diretamente ligado à inibição da biossíntese de proteínas. Esta droga é também utilizada contra infecções causadas por bactérias e outros protozoários. A formulação da pomada é aplicada no local da ferida, no caso de leishmaniose tegumentar. Para a leishmaniose visceral, o tratamento é feito por via parenteral. Ototoxicidade, disfunção hepática, erupções cutâneas e prurido local, além de dor, edema e eritema são efeitos colaterais associados ao tratamento por paramomicina (IQBAL et al., 2016).

Antimoniais pentavalentes são utilizados a mais de 60 anos no tratamento para as leishmanioses. O aumento do número de casos de resistência aos quimioterápicos, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos, bem como o conhecimento deficitário sobre os mecanismo celulares de ação dos medicamentos utilizados, inviabilizam o tratamento, constituindo-se um desafio, pois as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, e nenhuma delas é bastante eficaz (SRIVASTAVA et al., 2017; SEN; ROY, 2011; De LIMA et al., 2007; HALDAR). Esses fatores motivam a busca de uma droga ideal que estabeleça uma via alternativa para o tratamento das leishmanioses.

O presente estudo permitirá avaliar o potencial da lectina de *C. mollis* e de extratos e metabólitos secundários de *L. ferrea* var *ferrea* sobre *Leishmania* spp, com o intuito de encontrar novas substâncias com toxicidade direcionada ao parasita e de custos inferiores que possam ser utilizadas para o tratamento adequado das leishmanioses tegumentar e visceral principalmente em situações de resistência parasitária.

2.7 RADICAIS LIVRES E DANOS CELULARES

Átomos, moléculas e íons que se derivam do oxigênio podem formar espécies reativas, que são classificadas como EREs – Espécies Reativas de Enxofre, ERNs – Espécies Reativas

de Nitrogênio e EROs – Espécies Reativas de Oxigênio (MARTELLI; NUNES, 2014; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

As espécies reativas de oxigênio são classificadas como radicais livres e não radicalares (BIRBEN et al., 2012). Radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam ao menos um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica, permitindo a troca de elétrons com moléculas próximas. Elétrons emparelhados são estáveis em seus orbitais, no entanto, quando desemparelhados, são atraídos por um campo magnético, tornando-se altamente reativos. Compostos não radicalares não apresentam elétrons desemparelhados, no entanto, portam-se como espécies reativas (MARTELLI; NUNES 2014; MAGDER, 2006).

Os radicais livres podem originar-se de forma endógena ou exógena. Os endógenos são formados pelo próprio organismo. Hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2^\cdot$) constituem os principais radicais livres de origem endógena capazes de reagir com o oxigênio. Os radicais de origem exógena podem ser provenientes da ingestão de álcool, alimentos, exposição à poluição e radiação (GIORGIO et al., 2007).

As mitocôndrias são importantes geradoras de radicais livres (MUNTEAN et al., 2016) e a presença desses são essenciais para o metabolismo celular. Porém, em excesso, estes átomos ou moléculas podem causar graves modificações, levando a morte celular. ROS de uma forma geral podem promover danos em biomoléculas, como peroxidação lipídica, além de interferir na estrutura dos ácidos nucleicos e proteínas, acarretando danos celulares, como disfunções mitocondriais e lisossomal.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa não derivada do oxigênio, capaz de induzir graves alterações nas células, através da produção secundária de $\text{O}_2^\cdot$. H_2O_2 induz a perda do potencial de membrana mitocondrial, rompimento de membrana lisossomal, fragmentação do DNA, podendo levar a morte celular por apoptose (Da SILVA et al., 2015b).

Organismos aeróbicos naturalmente possuem sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para manutenção do equilíbrio entre a formação de radicais livres e tal sistema. Porém, em condições anormais, a produção excessiva dos radicais livres induz ao estresse oxidativo (BIRBEN et al., 2012). Esta disfunção está diretamente relacionada ao processo patológico de doenças neurodegenerativas e produtos naturais como metabólitos secundários vêm sendo testados na busca pelo controle do estresse oxidativo (SAMARGHANDIAN et al., 2016; GAO; HUANG; XU., 2001).

REFERÊNCIAS

- AHMADI MOUSAVI, E.; KALANTARI, M.; TORKZADEH, M. Effects of 24-epibrassinolide on lipid peroxidation, prolin, sugar and photosynthesis pigments content of rape (*Brassica napus* L.) under water stress. *Iran J Biol*, v.18, p. 295-306, 2005.
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; SOARES, P. A. G.; ARAGÃO-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, G. S.; SILVA, L. C. N.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; NETO, J. C. S.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; J. A. C. TEIXEIRA, J. A. C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Int J Biol Macromol*, v.102, p. 749-757, 2017.
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; SILVA, C. S.; SOARES, P. A. G.; BARROS JR., W.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; Investigating a galactomannan gel obtained from *Cassia grandis* seeds as immobilizing matrix for Cramoll lectin. *Int. J. Biol. Macromol.*v. 86, p. 454-461, 2016.
- ALVA, R. A.; QUEZADA, M. R.; RODRÍGUEZ. Metabolitos secundarios de mezccla de plantas medicinales con acción antibacterial sobre microorganismos causantes de infección puerperal en la provincial de Chachapoyas. *Pueblo Continente*, v. 25, n.2, p, 61-69, 2014.
- ALVAR, J.; IVA´N D. VÉLEZ, I. D.; CARYN BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, N.; BOER, M. D. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoSOne*, v. 7, n. 5, 1-12, 2012.
- ALVES, M. M.M.; BRITO, L. M.; SOUZA, A. C.; QUEIROZ, B. C. S. H.; CARVALHO, T. P.; BATISTA, J. F.; OLIVEIRA, J. S. S. M.; MENDONÇA, I. L.; LIRA, S. R. S.; CHAVES, M. H.; GONÇALVES, J. C. R.; CARNEIRO, S. M. P.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 390, p. 390:893-903, 2017. DOI 10.1007/s00210-017-1387-y.
- ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. ; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃE, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int J Pharm.* v. 278, p. 435-445, 2004.
- ANTHONY, J.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents. *Trends Parasitol.*, v. 21, p. 462-468, 2005.
- DE ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A.; ASSUNÇÃO FERREIRA, M. R.; DE SOUZA NETO, M. A.; DA SILVA, G. R.; DE ARAÚJO, R. F. JR.; GUERRA, G. C.; DE MELO, M. C. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *J Ethnopharmacol.*, 156, p. 88-96, 2014.
- AVELINO, K.Y.P.S.; ANDRADE, C.A.S.; DE MELO, C. P.; NOGUEIRA, M. L., CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; OLIVEIRA, M.D.L.; Biosensor based on hybrid nanocomposite and Cramoll lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples. *Synth Met*, v. 194, p. 102-108, 2014.

BARROS, M.A.G. Flora medicinal do Distrito Federal. *Brasil Florestal*, v.12, n.50, p.35-45, 1982.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 11.4, Lectins Are Specific Carbohydrate-Binding Proteins. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22545/>. Acesso 20 de maio de 2017.

BIASI-GARBIN, R. P.; DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C.; FERREIRA, M. R.; SOARES, L. A. SVIDZINSKI, T. I.; BAEZA, L. C.; YAMADA-OGATTA, S. F. Antifungal potential of plant species from brazilian caatinga against dermatophytes. *Rev Inst Med Trop*, v. 58, n. 18, doi: 10.1590/S1678-9946201658018, 2016.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO jornal*, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BRASIL 2003 - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: MS, 2003. 122p.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, p. 56, p. 317–333, 1998.

BORGHI, S. M.; FATTORI, V.; IVETE CONCHON-COSTA, I.; PHILENO PINGE-FILHO, P. P.; PAVANELLI, W. R.; VERRI JR, W. A.; *Leishmania* infection: painful or painless? *Parasitol Res*, v. 116, p. 465–475, 2017.

BRITO S. A.; DE ALMEIDA, C. L. F.; DE SANTANA, T. I.; DA SILVA OLIVEIRA, A. R.; DO NASCIMENTO FIGUEIREDO, J. C. B.; SOUZA, I. T.; DE ALMEIDA, L. L.; DA SILVA, M. V.; BORGES, A. S.; DE MEDEIROS, J. W.; DA COSTA, S. N. J.; DE CÁSSIA, R. G. R.; KITAGAWA, R. R.; SANT'ANA, A. E. G.; ROLIM, L. A.; DE MENEZES, I. R. A.; DA SILVA, T. G.; CALDAS, G. F. R.; WANDERLEY, A. G. Antiulcer Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. doi: 10.1155/2018/1731459.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Food Sci. Technol*, v. 27, p. 902-908, 2007.

BULUT, G.; HALILKOYU, M. Z.; DOĞAN, A.; KOYU, H.; TUZLACI, E. An ethnobotanical study of medicinal plants in Acipayam (Denizli-Turkey). *Journal of Herbal Medicine*, v. 10, p. 64-81, 2017.

CARMO, M. C. L.; ALCÂNTARA, B. K.; ALENCAR, S. M.; BEZERRA, R. M. N.; Influência das técnicas de cultivo na atividade antioxidante de romã. *Multi-Science Journal*, v. 1, n. 4, p. 3-6, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, v. 51, p. 15-25, 2013.

- CARVALHO, F. G.; SAMPAIO, J. P. S.; ARAÚJO, M. M. S.; PINTO, L. S. S.; ROCHA, A. J. Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. *Acta Sci*, v. 38, n. 2, p. 137-143, 2016.
- CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.;
- RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chem*, v. 100, p. 1044-1048, 2007.
- CHAPPUIS, F.; SHYAM SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 5, p. 873- 882, 2007.
- CHEN, C.; CHEN; RAVINATH, D. M.; BUNGAHOT, A.; CHENG, C.; YOU, R. Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. *BMC Plant Biology*, v. 18, n. 3, 2018. Doi 10.1186/s12870-017-1222-0.
- CORREIA, M. T.S., COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 55, p. 261-273, 1995.
- COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose cutânea difusa (lcd) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. *GMBahia*. v.79, p. 16-24, 2009.
- COSTA, T. C. C.; ACCIOLY, L. J. O.; OLIVEIRA, L. M. T.; De OLIVEIRA, M. A. J.; GUIMARÃES, D. P. Interação de fatores biofísicos e antrópicos com a diversidade florística na indicação de áreas para conservação do bioma Caatinga. *Sociedade & Natureza*, v. 21, n. 1, p. 19-37, 2009.
- COULIBALY, F. S.; YOUAN, B. C. Current estatus of lectin-basead cancer diagnosis and therapy. *AIMS*, v. 4, n. 1, p. 1-27, 2017.
- COWEN, D. L.; HELFAND, W. H. Pharmacy: an illustrated history. New York: Harry N. Abrams, 1990. 271p.
- Da CUNHA, C. R. A.; ANDRADE, C. G.; PEREIRA, M. I. A. ; CABRAL FILHO, P. E.; CARVALHOJR., L. B.; COELHO, L. C. B. B.; SANTOS, B. S., A.; M. T. S. CORREIA. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 178, p. p. 85-91, 2018.
- Da CUNHA, C. R. A.; Da SILVA, L. C. N.; ALMEIDA, F. J. F.; FERRAZ, M. S.; VAREJÃO, N.; CARTAXO, M. F. De S.; MIRANDA, R. C. M.; DE AGUIAR, JR., F. C. A.; SANTOS, N. P. S.; COELHO, L. C. B. B.; NEREIDE S. SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CORREIA, M. T .S. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, v. 7, n. 1355, doi 10.3389/fmicb.2016.01355, 2016.
- Da SILVA, L. C.; ALVES, N. M.; DE CASTRO, M. C.; PEREIRA V. R.; DA PAZ, N. V.; COELHO, L. C.; DE FIGUEIREDO, R. C.; CORREIA, M. T. Immunomodulatory effects

of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *Int J Biol Macromol*, v. 72, p. 848-54, 2015 a.

Da SILVA, L. C. N.; ALVES, N. M. P.; De CASTRO, M. C. A. B.; HIGINO, T. M. M.; Da

CUNHA, C. R. A.; PEREIRA, V. R. A.; PAZ, N. V.; N.; COELHO, L. C. B. B.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; CORREIA, M. T. S. pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2015, doi: 10.1155/2015/520872, 2015 b.

DELEU, D.; HANSSSENS, Y.; NORTHWAY, M. G. Subcutaneous apomorphine: an evidence-based review of its use in Parkinson's disease. *Drugs Aging*, v. 21, p. 687-709, 2004.

De LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An. Bras. Dermatol.*, v. 82, n. 2, p. 111-24, 2007.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, v. 2, p. 303-36, 2012.

Do CAMPO, R.; MORENO, S.N. *Parasitol. Today*, v. 15, n. 433, 1999.

DROZINO, R. N.; ZULIN, M. J. P.; CASAGRANDE, L.; PEREIRA, A. V. Brief review: bioactives of *Libidibia ferrea* and their actions in dentistry. *Arquivos do MUDI*, v 21, n 01, p. 39-47, 2017.

EL-AASSAR, M. R.; HAFEZ, E. E.; EL-DEEB, N. M.; FOUUDA, M. M. Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. *Int J Biol Macromol*, v. 69, p. 88-94, 2014.

FERNANDES, M. P.; LEITE, A. C.; ARAÚJO, F. F.; SAAD, S. T.; BARATTI, M. O.; CORREIA, M. T.; COELHO, L. C.; GADELHA, F. R.; VERCESI, A. E. The *Cratylia mollis* seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine a-insensitive permeability transition in *Trypanosoma cruzi* mitochondria. *J Eukaryot Microbiol*, v. 61, n. 4, 381-388, 2014.

FERNANDES, M. P.; INADA, N. M.; CHIARATTI, M. R.; ARAÚJO, F. F. B.; MEIRELLES, F. V.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C.; ALVES, M. J.; GADELHA, F. R.; VERCESI, A. E.. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioenerg Biomembr*, v. 42, n. 1, p. 68-78, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, M. R. A.; FERNANDES, M.T.; Da SILVA, W. A.; BEZERRA, I. C.; De SOUZA, T. P.; PIMENTEL, M. F.; SOARES, L. A. Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius. *Pharmacogn Mag*, v. 12, p. 285-291, 2016.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L, *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. *Academic Journals*, v. 9, n. 2, p. 140-150, 2015.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES; V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S. OLEA, R. S. G.; Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq*, v. 18, n. especial, 2011.

GRAEPP FONTOURA, G. I.; SOEIRO BARBOSA, S. D.; PAES AMA, P.; SANTOS, F. S.; SANTOS NETO. M.; FONTOURA, V. M.; COSTA, J. M. L.; ABREU SILVA A. L. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of human visceral leishmaniasis (HVL) associated with human immunodeficiency virus (HIV) coinfection: a systematic review. *Parasitology*, v. 28, p. 1-18, 2018.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Rev. bras. Farmacogn.*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *As leishmanioses*. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm>. Acesso em: 26 Mai. 2017.

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAPÁ. *Plano Estadual de Controle das Leishmanioses*: Amapá. Manaus, 2010. 64p.
GAO; HUANG; XU. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis georgi* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in hs-sy5y cells. *Pharmacol Res*, v. 43, n. 2, p. 173-178, 2010.

GERLACH, J. Q.; MAGUIRE, C. M.; KRÜGER, A.; JOSHI, L.; PRINA-MELLO A.; GRIFFIN, M. D. Urinary nanovesicles captured by lectins or antibodies demonstrate variations in size and surface glycosylation profile. *Nanomedicine (Lond)*, v. 0, n. 0, 2017.

GIORGIO, M.; TRINEL, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 8, n. 9, p. 722-728, 2007.

GONTIJO, C.M.F.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; J. A. L. LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
GUERRA, A. C. V. A.; SOARES, L. A. A.; FERREIRA, M. R. A.; De ARAÚJO, A. A.; ROCHA, H.A. O.; MEDEIROS, J. S.; CAVALCANTE R. S.; RAIMUNDO FERNANDES DE ARAÚJO JÚNIOR. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 92, p. 696-706, 2017.

GURNANI, N.; MEHTA, D.; GUPTA, M.; MEHTA, B. K. Natural products: Source of potential drugs. *Afr J Basic Appl Sci*, v. 6, p. 171-86, 2014.

GUPTA, V.; SENGUPTA, M.; PRAKASH, J.; TRIPATHY, B. C. An Introduction to Biotechnology. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, doi: 10.1007/978-981-10-0875-7_1, 2016.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Mol Biol Int.*, v. 2011, p. 1-23, 2011.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A.; Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *J Am Acad Dermatol*, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, v. 126, p. 1821-1835, 2011.
IQBAL, H.; ISHFAQ, M.; WAHAB, A.; ABBAS, M. N.; IJAZ AHMAD, REHMAN, A.; ZAKIR, M. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pac J Trop Biomed*, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2016.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. *Drug. Discov. Today*, v. 18, p. 1272-1281, 2013.

JAMEEL, M.; ISLAMUDDIN, M.; ALI, A.; AFRIN, F.; ALI, M.; Isolation, characterization and antimicrobial evaluation of a novel compound N-octacosan 7 β ol, from *Fumaria parviflora* Lam. *BMC. Complement. Altern. Med*, v. 14, n. 98, 2014.

JANDÚ, J. J.; COSTA, M. C.; SANTOS, J. R. A.; ANDRADE, F. M. ; MAGALHÃES, T. F.; SILVA, M. V. ; CASTRO, M. C. A. B.; COELHO, L. C. B. B.; GOMES, A. G.; PAIXÃO, TATIANE, A.; SANTOS, D. A.; CORREIA, M. T. S. Treatment with pCramoll Alone and in Combination with Fluconazole Provides Therapeutic Benefits in *C. gattii* Infected Mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. 211, 2017.

Jl, S.; FATTAHI, A.; RAFFEL, N.; HOFFMANN, I.; BECKMANN, M.W.; DITTRICH, R.; SCHRAUDER, M. Antioxidant effect of aqueous extract of four plants with therapeutic potential on gynecological diseases; semen persicae, *Leonurus cardiaca*, *Hedyotis diffusa*, and *Curcuma zedoaria*. *Eur. J. Med. Res*, v. 22, n. 50, p. 2017.

JIANG, Z.; KEMPINSKI, C.; CHAPPELL, J. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current protocols in plant biology*, v. 1, p. 345-358, 2016.
JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ, E.; IRISO, A MARCO, E.; ALEGRET, A.; FÚSTER, F.; MOLINA, R. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res*, v. 112, n. 7, p. 2453-2459, 2013.

JOSHI, B.; HENDRICKX, S.; MAGAR, L. B.; PARAJULI, N.; DORNY, P.; MAES, L.; In vitro antileishmanial and antimalarial activity of selected plants of Nepal. *J Intercult Ethnopharmacol*, v. 5, n. 4, 2016.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in *Leishmania*. *J Parasitol Res*, v. 2014, 2014.

KEMPINSKI, C.; JIANG, Z.; BELL, S. CHAPPELL J. Metabolic engineering of higher plants and algae for isoprenoid production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 148, p. 161-199, 2015.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

LAGROUH, F.; DAKKA, N.; BAKRI, Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J Mycol Med*, v. 11, n. 16, 2017.

LASHAKI, M. A.; SEDAGHATHOOR, S. ; KALATEHJARI, S. ; HASHEMABADI, D. The physiological and growth response of *Petunia hybrida*, *Tagetes erecta*, and *Calendula officinalis* to plant and human steroids. *AIMS Agriculture and Food*, v. 3, n. 2, p. 85-96.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. *RBFarma*, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurs of trypanosomiasis in India. *BMJ*. v.1, p. 1252-1254, 1903.

LOPES, G. F. G.; PANTOJA, S. C. S. Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz – Rio de Janeiro- RJ, *Revista Eletrônica Novo Enfoque*, v. 16, n. 16, p. 62-80, 2013.

LÓPEZ-ESCOBAR, M.; M. DRAKE-MONFORT, M.; ROZAS, R. S. G.; S. RAMÍREZ, H.; Leishmaniasis cutânea esporotricóide Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr*, v. 98, n. 6, p. 444-445. 2007.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4. ed. v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p. 162.

LUSVARGHI, S.; BEWLEY, C. A. Griffithsin: An Antiviral Lectin with Outstanding Therapeutic Potential. *Viruses*, v. 8, n. 296, 2016. doi:10.3390/v8100296.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*, v.10, n. 208, 2006. doi: 10.1186/cc3992.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, v.79, p. 727-747, 2004.

MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; SOUZA, T. P.; ALMEIDA, M. C.; BENDAHAM, K.; VENÂNCIO, G. N.; RODRIGUES, I. C.; COELHO, C. N.; MILÉRIO, P. S. L. L.; OLIVEIRA, G. P.; CONDE, N. C. O. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of an ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. *Clin Cosmet Investig Dent*, v. 6, p. 9-13. 2014.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Cienc. Cult*, v. 66, n. 3, 54-57, 2014.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A.; The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. v. 16, p. 188-189, 2000.

MCCARTHY, C. B.; SANTINI, M. S.; PIMENTA, P. F.; DIAMBRA, L. A. First comparative transcriptomic analysis of wild adult male and female *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis. *PLoS One*, v. 8, n. 3, 2013.

MELO, C. M.; De LIMA, A. L.; BELTRÃO, E. I.; CAVALCANTI, C. C.; DE MELO-JÚNIOR, M. R.; MONTENEGRO, S. M.; COELHO, L. C.; CORREIA, M. T.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. *Acta Trop*, v.118, n. 2, p.152-158, 2011.

MELO, C. M. L.; PORTO, C. S.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MENDES, C. M.; CAVALCANTI, C. C. B; COELHO, L. C. B. B.; PORTO, A. L. F.; LEÃO, A. M. A.C.; CORREIA, M. T. S. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 2011, p. 113-119, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações técnicas. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegmentar-americana-lta/11325-informacoes-tecnicas>>. Acesso em 26 Mai. 2017.

MICHELS, P. A. M.; BRINGAUD, F.; MURIELLE, H. A.; HANNAERT, V. Review Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*, v. 1763, p. 1463-1477, 2006.

MOUTTAKI, T.; MAKSOURI, H.; EL MABROUKI, J.; MERINO-ESPINOSA, G.; FELLAH, H.; ITRI, M.; MARTIN-SANCHEZ, J.; SOUSSI-ABDALLAOUI, M.; CHIHEB, S.; RIYAD, M. Concomitant visceral and localized cutaneous leishmaniasis in two Moroccan infants. *Infect Dis Poverty*, v. 7, n. 1, 2018.

MUNTEAN, D. M.; STURZA, A.; DANILA, M. D.; BORZA, C.; DUICU, M. O.; MORNOS, C. The Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury and Protective Strategies. *Oxid Med Cell Longev.*, v. 2016, 2016.

MUSHTAQ, S.; ABBASI, B.H.; UZAIR, B.; ABBASI, R.; Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI J.*, v. 4, n. 17, p. 420-451, 2018.

MUSTAFA, G.; ARIF, R.; ATTA, A.; SHARIF, S.; JAMIL, A. Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Their Importance in Drug Discovery in Pakistan. *MSP*, v. 1, n. 1, p. 17-26, 2017.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, J. R. F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Lett*, v. 177, n. 2, p. 119-124, 2002.

NASCIMENTO, J. E. C.; REATGUI, W. S.; ARAÚJO, L. S.; RIBEIRO, MARIA E. S.; MAIA, D. C. S.; GIACOMIN, L. L.; KITAGAWA, R. R.; BARATTO, L. C. Avaliação do potencial antioxidante e antiHelicobacter pylori in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. *Revista Fitos*, v. 11, n. 2, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr*, v.1054, p. 95–111, 2004.

NEVES, L. O.; ANETTE CHRUSCIK TALHARI, A. C.; GADELHA, E. P. N.; SILVA JÚNIOR., R. M.; GUERRA, J. A. O.; FERREIRA, L. C. L.; SINÉSIO TALHARI, S. Estudo clínico randomizado comparando antimonio de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *An. Bras. Dermatol*, v. 86, n.6, p. 1092-1101, 2011.

OLIVEIRA, L. F. G.; GILBERT, B.; BÔAS, G. K. V. Potential for innovation in the treatment of leishmaniasis using plants and natural products as sources of new drugs. *Fitos*, v. 8, n. 1, p.1-72, 2013.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.

PACHECO-ORDAZ, R.; WALL-MEDRANO, A.; GOÑI, M. G.; RAMOS-CLAMONT-MONTFORT, G.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Lett Appl Microbiol*, v. 66, n. 1, p. 25-31, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016–2017. Disponível em <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 03 Jun. 2018.

PACHECO-ORDAZ, R.; WALL-MEDRANO, A.; GOÑI, M. G.; RAMOS-CLAMONT-MONTFORT, G.; AYALA-ZAVALA, J.F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Lett Appl Microbiol*, v. 66, n. 1, p. 25-31, 2018.

PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 36, p. 113-118, 1992.

PALHARINI, J. G.; RICHTER, A. C.; SILVA, M. F.; FERREIRA, F. B.; PIROVANI CP, NAVES, K. S. C.; GOULART, V. A.; MINEO, T. W. P.; SILVA, M. J. B.; SANTIAGO, F. M. Eutirucallin: A Lectin with Antitumor and Antimicrobial Properties. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* v. 7, n. 136, doi: 10.3389/fcimb.2017.00136, 2017.

PALMER-YOUNG, E. C.; SADD, B. M.; IRWIN, R. E. ADLER, L. S. Synergistic effects of floral phytochemicals against a bumble bee parasite. *Ecol Evol*, v. 7, n. 6, 1836-1849, 2017.

PAPALIA, T.; BARRECA, D.; PANUCCIO, M. R. Assessment of Antioxidant and Cytoprotective Potential of *Jatropha* (*Jatropha curcas*) Grown in Southern Italy. *Int. J. Mol. Sci*, v. 18, n. 669, 2017.

PAULO; DEUS. Hino de adoração. *Biblía Sagrada*, p. 1115.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *J. Biotec. Biodivers.* v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PEDROSA T.D.; BARROS A.O.; NOGUEIRA, J.R.; FRUET, A.C.; RODRIGUES I.C.; CALCAGNO, D.Q.; SMITH M.A.; DE SOUZA, T.P.; BARROS, S.B.; DE VASCONCELLOS, M.C.; SILVA, F.M. KOOLEN, H.H.; MARIA-ENGLER, S.S.; LIMA E.S. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. *Arch Dermatol Res.* 2016 Nov;308(9):643-654. 10.1007/s00403-016-1685-0

PÉREZ, A. J.; PECIO, L.; KOWALCZYK, M.; KONTEK, R.; GAJEK, G.; STOPINSEK, L.; MIRT, I.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Cytotoxic triterpenoids isolated from sweet chestnut heartwood (*Castanea sativa*) and their health benefits implication. *Food Chem Toxicol*, 2017.

PIRES, W. L.; DE CASTRO, O. B.; KAYANO, A. M.; DA SILVA SETÚBAL, S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; PALOSCHI, M. V.; DOS SANTOS PEREIRA S.; STÁBELI, R. G.; FERNANDES, C. F.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Effect of BjcL, a lectin isolated from *Bothrops jararacussu*, on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol In Vitro*, v. 8, n. 41, p.30-41, 2017.

PANTOJA, P. K. D.; COLMENARES, A. J. D.; ISAZA, J. H. M. New caffeic acid derivative from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. *Food Chem Toxicol*. 2017.

RAMOS, H.; VALDIVIESO, E.; GAMARGO, M.; DAGGER, F.; COHEN, B.E. Amphotericin B kills unicellular *Leishmania* by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J. Membr. Biol.*, n. 152, p. 65-75, 1996.

RÍOS, J.; GINER, R. M.; MARÍN, M.; RECIO, M. C.; A Pharmacological Update of Ellagic Aci. *Planta Med*, 2018 DOI: 10.1055/a-0633-9492.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

ROBARDS K. PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVERE, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, v.66, p.401-436, 1999.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). *Rev. bras. plantas med*, v. 12, n.1, p. 31-42, 2010.

RUHSAM, M.; HOLLINGSWORTH, P.M. Authentication of eleutherococcus and rhodiola herbal supplement products in the United Kingdom. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 149, 403-409, 2017.

SALLES, H. O.; BRAGA, A. C. L.; NASCIMENTO, M. T. S. C.; SOUSA, A. M. P. S.; LIMA, A. R.; VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; EGITO, A. S.; ANDRADE, L. B. S. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Braz. J. Vet. Parasitol*, v. 23, n. 2, p. 136-143, 2014.

SAKLANI, S.; GAHLOT, M.; KUMAR, A.; SINGH, R.; PATIAL, R.; KASHYAP, P. Antimicrobial activity of extracts of the medicinal plant *Coleus forskohlii*. *IJDRT*, v. 1, n. 1, p. 8, 2017.

SAMARGHANDIAN, S.; FARKHONDEH, T.; SAMINI, F.; BORJI, A. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. *Biochem Res Int.*, 2016, v. 2016. doi:10.1155/2016/2645237.

SAMAH, S.; FATAH, C.; JEAN-MARC, B.; SAFIA, K. T.; FATIMA, L. D. Purification and characterization of Cc-Lec, C-type lactose-binding lectin: A platelet aggregation and blood-clotting inhibitor from *Cerastes cerastes* venom. *Int J Biol Macromol*, v. 8, n. 102, p. 336-350, 2017.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A. R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol*, v. 124, v. 2, p. 289-294, 2009.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, J.; GUPTA, A. K.; SINGH, A.; SHANKAR, P.; SINGH, S. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasit Vectors*, v. 10, n. 49, doi. 10.1186/s13071-017-1969-z, 2017.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. *Phytomedicine*, v. 18, 12, p. 1056-1069, 2011.

SILVA, G. A. R.; EYER-SILVA, W. A.; MAGALHÃES, M. C.; FERRY, F. R. A.; PINTO, J. F. C.; AZEVEDO, M. C. V. M.; NEVES-MOTTA, R.; ATHAYDE, C. C.; JORDÃO, P.; BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, R. P.; LYRA, M. R.; FAGUNDES, A.; PIMENTEL, M.

I.; PACHECO, R. S. P.; MADEIRA, M. F.; MARZOCHI, M. C. A. A novel case of human visceral leishmaniasis from the urban area of the city of Rio de Janeiro: autochthonous or imported from Spain?. *Rev. Inst. Med. trop.*, v. 59, p. 1-3, 2017.

SHKODRANI, E.; VASILI, E.; ALERT XHAJA, A.; FRANGAJ, S.; CENKO, A.. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Presenting as Erythroderma. *AMI*, 2017, v. 4, n. 1, p. 88-91.

SILVA, F. A.; MAGDA R. A. FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, F. S. B.; MAIA, L. C. Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of field grown *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz. *Academic Journals*, v. 8, n. 36, p. 1110 -1115, 2014.

SILVA, G. B. P.G; SILVINO, K. F.; DIOGO, J.; BEZERRA, P.; FARIAS, T. G. S.; ARAÚJO, J. M.; LÚCIA, T.; STAMFORD, M. Antimicrobial activity of *Phoma* sp. URM 7221: An endophyte from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), *Afr. J. Microbiol. Res*, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2017.

- SILVA, J. M.; ANTINARELLI B, L. M. R.; RIBEIRO, A.; ELAINE SOARES COIMBRA, E. S.; ELITA SCIO, E.; The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* is mediated by mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol*, v. 159, P. 143-150, 2015.
- SILVA, J. M.; ANTINARELLI, L. M. R.; PINTO, N. C. C.; COIMBRA, E. S.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; RIBEIRO, A.; ELITA SCIO, E. HPLC-DAD Analysis, Antileishmanial, Antiproliferative, and Antibacterial Activities of *Lacistema pubescens*: An Amazonian Medicinal Plant. *Biomed Res Int*, v. 2014, 2014.
- SILVA, L. C. N.; JÚNIOR, C. A. S.; SOUZA, R. M.; MACEDO. A. J.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food Chem. Toxicol*, v. 49, n. 9, 2011.
- SINGH, O. P.; SHYAM SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Front immunol*, v. 5, n. 296, p. 1-9, 2014.
- SOARES, S. E.; *Phenolic acids as antioxidants*. *Rev. Nutr*, v. 15, n.1, 2002.
- SOUZA, S. R.; DUTRA, S. R.; CORREIA, M.T.S.; PESSOA, M.M.A.; LIMA-FILHO, J. L. COELHO, L.C.B.B. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresour. Technol.*, v. 88, n.3, p.255-8, 2003.
- SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F.; Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 41, p. 2069-2080, 2009.
- STAPPEN, I.; TABANCA, N.; ALI, A.; WEDGE, D. E.; WANNER, J.; KAUL, V. K.; LAL, B.; JAITAK, V.; GOCHEV, V. K.; SCHMIDT, E.; JIROVETZ, L. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils from Wild Growing Aromatic Plant Species of *Skimmia laureola* and *Juniperus macropoda* from Western Himalaya. *Nat Prod Commun*, v. 10, n. 6, p. 1071-4, 2015.
- TERADA, D.; KAWAI, F.; NOGUCHI, H.; UNZAI S.; HASAN, I.; FUJII, Y.; SAM-YONG, P.; OZEKI, Y.; TAME, J. R. H. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types. *Scientific RepoRts*, v. 6, n. 28344, 2016.
- THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ARIELLE ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci*, v. 19, n. 6, 2018.
- TIWARI, R.; RANA, C. S.; Plant secondary metabolites: a review. *Int. j. eng. res.gen. sci.*, v. 3, n 5, p. 2091-2730, 2015.
- TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. JR. Chemotherapy of parasitic infections: drugs used in the chemotherapy of protozoal infections-malaria. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001, p. 1097-1120.

VANNIER-SANTOS, M. A.; A. MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. *Curr. Pharm. Des.*, v. 8, n. 4. p. 297-318, 2002.

VELOZO, V. et al. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *An. Bras. Dermatol.* v.81, n. 3, 2006.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

YEASH, E. A.; LETWIN, L.; MALEK, L.; SUNTRES, Z.; KNUDSEN K.; CHRISTOPHER, L. P. Biological Activities of Undescribed North American Lichen Species. *J Sci Food Agric*, 2017.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phitochemistry. *J Chromatogr Sci*, v. 99, 2008.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K.; The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol. Microbiol.*, v. 79, n. 3, p. 647-662, 2011.

ZANIN, J. L. B.; CARVALHO, B. A.; MARTINELI, P. S.; SANTOS, M. H. S.; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P.; VIEGAS JR, C.; MARISI G. SOARES, M. G.; The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules*, v. 17, p. 7887-7902, 2012.

ZHANG, J. S.; YANG, Z. H.; TSAO, T. H. The occurrence of estrogens in relation to reproductive processes in flowering plants. *Sex Plant Reprod*, v. 4, p. 193-196, 1991.

ZHANG, W.; YAO, H.; YU, J.; ZHANG, Z.; TONG, R. Total Syntheses of Sesterterpenoid Ansellones A and B, and Phorbadiene. *Angew Chem Int Ed Engl*, v. 129, p. 1-6, 2017.

ZHAO, N.; JIE W. U.; XIONG, S.; ZHANG, L.; LU, X.; CHEN, S.; WU, Q.; WANG, H.; LUI, Y.; CHEN, Z.; ZUO, D. Mannan-binding lectin, a serum collectin, suppresses T-cell proliferation via direct interaction with cell surface calreticulin and inhibition of proximal T-cell receptor signaling. *Faseb J.*, v. 16, doi: 10.1096/fj.201601200RR, 2017.

3 MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DA CRAMOLL 1,4

Sementes de *C. mollis* Mart. foram coletadas no Estado de Pernambuco (Brasil), e a lectina (Cramoll 1,4) foi purificada de acordo com Correia e Coelho (1995). Resumidamente, o extrato das sementes (10% p/v em NaCl 0,15 M) foi fracionado com sulfato de amônio (40-60%) e depois purificado por cromatografia de afinidade numa coluna Sephadex G-75. A eluição de Cramoll 1,4 foi realizada com 0,3 M de glicose em 0,15 M de NaCl.

3.2 PARASITAS

Promastigotas de *L. infantum* (cepa BH46) foram cultivadas em meio de Schneider suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e mantidas em incubadora BOD a 28 °C, repicadas a cada três a quatro dias (As células foram utilizadas por até 10 repiques). Os ensaios utilizaram parasitas na fase log de crescimento (três dias). As formas amastigotas foram obtidas de macrófagos peritoneais de Balb/c infectados com *L. infantum*.

3.3 CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de 1×10^6 /mL, foram mantidos em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e mantidos em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C por 2 h para garantir a aderência dos macrófagos em placas de cultura.

3.4 EFEITOS DA CRAMOLL 1,4 NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A viabilidade celular em células de mamíferos foi avaliada utilizando o ensaio do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich) de acordo

com Mosman (1983). Para isso, macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ foram incubados na presença de Cramoll 1,4 (25-400 $\mu\text{g/mL}$) por 48 h. Em seguida, o meio foi removido e substituído por uma solução de MTT (5 mg/mL em RPMI 1640) e as células foram então incubadas durante mais 3 h (37 °C e 5% de CO_2). Posteriormente, a solução foi removida e o produto formado de cristais de formazan intracelular foi dissolvido em DMSO. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi). A concentração pela qual a viabilidade celular foi inibida em 50%, em comparação com as células de controle (CC_{50}), foi determinada por análise de regressão usando o programa SPSS8. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. As células incubadas em meio livre de lectina foram consideradas como controle.

3.5 EFEITOS DA CRAMOLL 1,4 NA ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram tratados por 48 h com Cramoll 1,4 com 2x, 4x e 6x o valor de IC_{50} (concentração que inibiu o crescimento da cultura em 50%) correspondente ao valor obtido às formas promastigotas de *L. infantum*. As culturas foram então lavadas com meio RPMI 1640 e incubadas a 37 °C a 5% de CO_2 , por 30 min na presença de *Saccharomyces cerevisiae* ($10 \times 10^6/\text{mL}$). As amostras foram então lavadas com PBS a 37°C, para remover as células de levedura não fagocitadas, e fixadas com metanol absoluto, coradas com solução de Giemsa (10%) tamponada a pH 7,2. O número de células de levedura fagocitadas pelos macrófagos foi avaliado por microscopia óptica. Campos distribuídos ao longo das lamínulas foram selecionados aleatoriamente e todos os macrófagos em cada campo foram examinados. O índice fagocítico foi calculado como o número médio de leveduras fagocitadas por macrófago, multiplicado pela porcentagem dessas células envolvidas na fagocitose (Muniz-Junqueira et al., 2005).

3.6 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA IN VITRO DE CRAMOLL 1,4 EM *Leishmania infantum*

Promastigotas (1×10^6 parasitas/mL) foram incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações de Cramoll 1,4 (3,25-60 $\mu\text{g/mL}$). A densidade celular foi

determinada por 72 h pela contagem na câmara de Neubauer. A concentração que inibiu o crescimento da cultura em 50% (IC₅₀) foi determinada após 48 h de tratamento por análise de regressão usando o software SPSS 18. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram coletados e plaqueados a 1×10^6 células/mL em placa de 24 poços, contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Deixou-se os macrófagos aderirem durante 2 h a 37 °C em 5% de CO₂ e depois os mesmos foram infectados com promastigotas de *L. infantum* utilizando uma proporção 1:10 a 37 °C durante 16 h. Os parasitas não interiorizados foram removidos por lavagem e a cultura infectada foi incubada por 24 h em meio RPMI 1640 com diferentes concentrações de Cramoll 1,4 (3,6, 7,2 e 14,4 µg/mL). Os macrófagos infectados e não tratados com Cramoll 1,4 constituíram o controle do experimento. Pentamidina (PMD, 10 µg/mL) constituiu o controle positivo. As culturas foram coradas pelo Giemsa (Laborclin, Pinhais, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 150 células escolhidas aleatoriamente em dois experimentos replicados. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de parasitas por célula infectada.

3.7 ENSAIO ULTRAESTRUTURAL

Para microscopia eletrônica de transmissão, promastigotas tratadas e não tratadas foram fixados por 1 h a 4 °C em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% paraformaldeído em 0,1 M de PBS, pH 7,2. Após lavagem no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas durante 1 h com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio/5mM CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e depois desidratadas em séries graduadas de acetona (50 -100%) e incluídas por 72 h a 60 °C em resina PolyBed 812. Cortes ultrafinos foram corados com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM109). Para microscopia eletrônica de varredura, os parasitas tratados e o controle foram fixados e pós-fixados conforme descrito acima e deixados aderir em lamínulas recobertas com poli-L-lisina. Os macrófagos peritoneais, cultivados em lamínulas de vidro, foram fixados e pós-fixados como descrito para as formas promastigotas. Ambas as amostras de parasitas e de células de mamíferos foram lavadas no mesmo tampão usado na pós-fixação, desidratadas em etanol

graduado, secas em ponto crítico com CO₂, e finalmente revestidas com uma camada de ouro de 20 nm de espessura e observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

3.8 MATERIAL

A entrecasca e a vagem de *L. ferrea* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil), em outubro de 2014 e abril de 2015, respectivamente. O material vegetal foi identificado e um espécime foi depositado no herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), e esta amostra foi utilizada como material de referência (Número 84.035). O Ácido Gálico (AG 98%), o meio Schneider's, o MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), a Quercetina e a Rutina foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Aldrich Brasil), o Ácido Elágico (AE 97%) foi adquirido da Acrôs Organic. O Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%) foi adquirido da Sinth, o soro fetal bovino foi adquirido pela Gibcon e a Catequina foi adquirida da Fisher Chemical.

3.9 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS - SOLUÇÃO ESTOQUE

A partir de amostras da entrecasca e vagens de *L. ferrea*, secas e maceradas em um moinho Tecnal tipo Willy TE-650, extratos orgânicos foram obtidos com o solvente metanol (10% p/v), sob agitação por 24 h e em seguida filtrados em papel de filtro, os quais foram denominados de EME (Extrato Metanólico da Entrecasca) e EMV (Extrato Metanólico da Vagem). Após filtração, o solvente foi removido em um evaporador rotativo e finalmente amostras de 50 mg foram solubilizadas em 1 mL de DMSO. O AG foi diluído em água destilada a uma concentração de 1 mg/mL

3.10 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As amostras dos EME, EMV e padrões (Tabela 1) foram diluídas em metanol para uma concentração final de 1 mg/mL e aplicadas a 5 mm da origem e com término de 5 mm do final das placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Germany), com auxílio de capilares. As placas (5 X 5 cm) foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase

móvel (Tabela 1) à temperatura ambiente (25 °C). As bandas foram aplicadas com largura de 3 mm entre elas e com uma distância das bordas das placas de 3 mm.

Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente (25 °C) e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível e em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Tabela 1). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Tabela 1 Classes de metabólitos secundários e reveladores.

Classe de Metabólito	Fase Móvel	Revelador	Padrão
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	90:5:5	NEU + PEG	Ác. gálico e Ác. elágico
Taninos condensados	90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonóides	90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina
Derivados Cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ác. Cafeico e Ác. Clorogênico
Terpenos e Esteroides	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β -Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	Lieberman-Burchard+ Δ	Escina
Açúcares redutores	50:20:10:10	Timol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-frutose

Fases móveis: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 – Tolueno: acetato; 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água.

3.11 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODOS (CLAE-DAD)

Preparação das amostras

Inicialmente, foram preparadas soluções estoques a partir de 5 mg dos extratos EME e EMV, os quais foram transferidos individualmente para um balão volumétrico de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de metanol e levados ao ultrassonicador durante 30 minutos para completa solubilização. Ao final, o volume foi aferido com metanol para 5 mL.

As soluções das amostras foram obtidas de alíquotas de 1,5 mL da solução estoque, as quais foram transferidas para balão volumétrico de 5 mL, e o volume aferido com água ultrapura. Ao final, as amostras foram filtradas em filtros de PVDF de 25 mm e 0,45 µm, e transferidas para frascos certificados para usos cromatográficos.

Soluções padrões:

A partir de uma solução padrão de Ácido gálico a 100 µg/mL procedeu-se diluições necessárias, a fim de obter a curva de calibração.

A solução padrão de Ácido elágico a 100 µg/mL foi preparada em metanol: água (3:1). Em seguida, procedeu-se com as diluições necessárias, a fim de obter a curva de calibração.

Método por CLAE-DAD

A quantificação dos ácidos gálico e elágico foi conduzida em HPLC (Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®), acoplado com Detector de Arranjo de Fotodiodos (DAD; Thermo Fisher Scientific®) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific®), degaseificador e amostrador automático com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific®). Os dados cromatográficos foram processados com o auxílio do programa computacional Chromeleon versão 6.0 (3000 RS Dionex, Thermo Fisher Scientific®). O comprimento de onda foi fixado em 254 nm para detecção do ácido elágico e em 270 nm para o ácido gálico, de acordo com o máximo de absorção observado no espectro de varredura capturado pelo DAD. A separação cromatográfica foi realizada com coluna C₁₈ (250 mm x 4.6 mm d.i., tamanho de partícula 5 µm; NST®) protegida por pré-coluna (C₁₈, 4 mm x 3.9 µm, Phenomenex®). As separações foram realizadas com temperatura do forno da coluna a 26 °C. A fase móvel consistiu em água ultrapura (A) e metanol (B) ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético, com fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa gradiente foi aplicado como segue: 0–10min, 20–40% B; 10–30min, 40–70% B; 30–31min, 70% B; 31–32 min, 70–20% B; 32–33min, 20% B.

Foram injetados, separadamente, 20 μ L das soluções padrão e solução amostra, e os cromatogramas foram registrados para mensurar as áreas dos picos. O resultado foi expresso em g% de ácido gálico e g% de ácido elágico, de acordo com a curva analítica construída com os respectivos padrões. Os cálculos consideraram a pureza de 98% e 96% para os padrões de ácido gálico e de ácido elágico, respectivamente.

3.12 PARASITAS

Promastigotas de *L. amazonensis* (Cepa LTB0016) e *L. infantum* (cepa BH46) foram cultivadas em meio de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em incubadora BOD a 28 °C, passadas a cada três a quatro dias. Os ensaios utilizaram parasitas na fase log de crescimento (três dias).

3.13 CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de 1×10^6 /mL foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

3.14 ENSAIO DE MTT- EFEITO DE EME, EMV E AG SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A viabilidade celular em células de mamíferos foi avaliada utilizando o ensaio do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) de acordo com Mosman (1983) [15]. Para isso, macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de 1×10^6 /mL foram incubados na presença de EME, EMV (5, 50 e 500 μ g/mL) e AG (6,25 - 200 μ g/mL) por 48 h. No final do tratamento, o meio foi removido e foi adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL em RPMI 1640) e as células foram incubadas durante mais 3 h (37 °C e 5% de CO₂). Posteriormente, o meio foi removido novamente e o produto formado de cristais de formazan intracelular foi dissolvido em DMSO. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi). A concentração

pela qual a viabilidade celular foi inibida em 50% em comparação com as células do controle (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão usando o programa SPSS8. Dois ensaios foram realizados em quadruplicata. Células incubadas em meio livre dos extratos e AG foram consideradas como controle.

Para avaliar a viabilidade celular em células Vero tratadas com EME e EMV submetidas ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), células Vero a 1x10⁵/mL foram incubadas na presença de EME e EMV (1, 10 e 100 µg/mL) durante 24 h. Após o tratamento, H₂O₂ foi adicionado à concentração de 2 mM durante 1 h de incubação e finalmente o meio de cultura foi removido para realização do ensaio do MTT aplicado como descrito acima. Dois ensaios independentes foram realizados em quadruplicata.

3.15 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c (1 x 10⁶/mL) foram tratados com AG (25 - 400 µg/mL) por 48 h. No final do período de tratamento, o meio foi removido e a quantificação dos níveis de ATP foi determinada pelo *kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi).

3.16 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE *L. ferrea* E AG EM *L. amazonensis* E *L. infantum*

Promastigotas (1x10⁶ parasitas/mL) foram incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações de EME e EMV (6,25 - 200 µg/mL) e AG (3,13 - 100 µg/mL). A quantificação dos níveis de ATP foi determinada após 48 h de tratamento pelo *kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi). A concentração que inibiu o crescimento da cultura em 50% (IC₅₀) foi determinada após 48 h de tratamento por análise de regressão usando o software SPSS 18. Dois ensaios foram realizados em quadruplicata.

3.17 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os parasitas tratados e não tratados foram processados e analisados conforme descrito no subítem 3.7.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância one-way (ANOVA) e teste de Turkey para determinar a significância estatística. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.19 PADRÕES ÉTICOS

Todos os experimentos envolvendo o uso de animais experimentais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e foram aprovados pelo comitê de ética (CEUA-FIOCRUZ 77/2014).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Cratylia mollis* EM *Leishmania infatum*

Artigo a ser submetido na versão em inglês para a revista Acta Tropica



Fator de Impacto: 2.509

Qualis B1

Efeito da lectina de sementes de *Cratylia mollis* em *Leishmania infatum*

Carina Helena-Silva^a, Andrezza R. Borges^a, Rosimere da Silva^a, Álvaro A. C. Teixeira^b, Luana C. B. B. Coelho^a, Regina B. C. Q. Figueiredo^c, Maria T. S. Correia^{a*}, Maria G. Carneiro-da-Cunha^{a,d*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900 Recife, PE, Brazil

^cDepartamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, CEP 50670-901 Recife, PE, Brazil

^dLaboratório de Imunopatologia KeizoAsami-LIKA/UFPE, CEP 50670-901 Recife, PE, Brazil

* Autor correspondente. Tel.: +55 81 21268540; fax: +55 81 21268576.

Endereço de E-mail: mgcc1954@gmail.com (Maria G. Carneiro-da-Cunha), mtscorreia@gmail.com (Maria T. S. Correia).

RESUMO

Leishmaniose é um complexo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. As principais drogas utilizadas para o seu tratamento induzem graves efeitos colaterais devido a sua toxicidade. Assim, neste estudo avaliamos os efeitos de Cramoll 1,4, lectina purificada das sementes de *Cratylia mollis*, planta nativa do nordeste brasileiro, sobre *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral. A lectina não apresentou toxicidade para macrófagos peritoneais com $CC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$. No entanto, o tratamento com $28,8 \mu\text{g/mL}$ de Cramoll 1,4 induziu alterações morfológicas nos macrófagos peritoneais, que assumiram predominantemente um fuso ou formato arredondado. No entanto, nenhuma das concentrações testadas foi capaz de inibir completamente a fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por macrófagos. Cramoll 1,4 inibiu o crescimento e a viabilidade da promastigota com IC_{50} de $7,2 \pm 0,74 \mu\text{g/mL}$ e foi altamente seletiva em relação ao parasita com índice de seletividade $> 55,6$. Alterações morfológicas drásticas, incluindo perda da organização interna do citoplasma, inchaço da mitocôndria e dilatação do retículo endoplasmático, foram observadas em promastigotas tratadas, como demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. A lectina também inibiu significativamente a sobrevivência de amastigotas intracelulares nos macrófagos. Estes resultados apontam Cramoll 1,4 como um agente promissor para o tratamento da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; Quimioterapia; Cramoll 1,4.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias endêmicas que afetam cerca de 12 milhões de pessoas em 98 países (Alvar et al., 2012). Essas patologias são causadas por 20 diferentes espécies de protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*. A leishmaniose apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas, desde leishmaniose cutânea autocurável até leishmaniose visceral (LV) potencialmente fatal. No Velho Mundo e na América Latina, *Leishmania infantum* é o principal agente etiológico (Da Silva et al., 2017). A LV, também conhecida como kalazar, é considerada uma das seis infecções e doenças parasitárias mais importantes do mundo (Sales et al., 2018). Esses parasitas existem em duas formas morfológicas e fisiológicas distintas: a promastigota infecciosa e a forma amastigota intracelular, que se desenvolve preferencialmente em fagócitos mononucleares e é responsável pela manifestação clínica da doença (Sunter and Gull, 2017).

A quimioterapia atual utilizada no tratamento da leishmaniose é baseada em antimoniais pentavalentes, medicamentos arcaicos e tóxicos, que requerem administração parenteral e supervisão médica devido à gravidade dos efeitos colaterais (Vieira-Araújo et al., 2018; Soleimanifard et al., 2017; Andrews et al., 2014; Singh and Sundar, 2014). Além disso, o aparecimento de cepas resistentes dos parasitas já foi relatado em muitos países. Assim, a busca por novas drogas mais eficazes e seletivas ainda é necessária (Cardoso et al., 2018).

Durante as últimas décadas, vários compostos extraídos de plantas foram avaliados quanto ao seu potencial leishmanicida (Antinarelli et al., 2015; Dutra et al., 2016). Dentre eles, as lectinas mostraram-se promissoras em função de suas atividades relevantes como: atividades imunomoduladoras, antitumorais e antiparasitárias (Coriolano et al., 2018; Li et al., 2018; Medeiros et al., 2018). As lectinas são proteínas de ligação a carboidratos ou glicoproteínas de origem não imune isoladas de animais, plantas e microorganismos. São moléculas multivalentes, possuindo dois ou mais sítios de ligação a carboidratos para aglutinar células e para precipitar polissacarídeos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácidos teicóicos e glicolipídeos sem alterar as propriedades dessas moléculas (Kaltner et al., 2018). Cramoll 1,4 é uma lectina purificada a partir das sementes de *Cratylia mollis*, uma forrageira nativa da região semiárida do Nordeste do Brasil. Cramoll 1,4 pertence a classe de lectinas

ligantes de glicose/manose e apresenta múltiplas formas moleculares com diferentes especificidades de carboidratos, dentre elas a associação das isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4) (Zampini et al., 2017; Santos et al., 2004; Correia and Coelho, 1995). Esta lectina apresentou semelhanças estruturais e funcionais *in vitro* com a lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A), como: atividade motogênica de linfócitos T (Maciel et al., 2004) e atividade anti-helmíntica em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (Melo et al., 2011). Além disso, Cramoll 1,4 demonstrou ser um importante agente antiparasitário contra o *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (Fernandes et al., 2010).

Devido à necessidade de desenvolver novas drogas alternativas para o tratamento das leishmanioses associada às aplicações biotecnológicas de Cramoll 1,4, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade biológica desta lectina sobre *L. infantum* e seu potencial citotóxico em células de mamíferos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO DA CRAMOLL 1,4

Sementes de *C. mollis* Mart. foram coletadas no Estado de Pernambuco (Brasil), e a lectina (Cramoll 1,4) foi purificada de acordo com Correia e Coelho (1995). Resumidamente, o extrato das sementes (10% p/v em NaCl 0,15 M) foi fracionado com sulfato de amônio (40-60%) e depois purificado por cromatografia de afinidade numa coluna Sephadex G-75. A eluição de Cramoll 1,4 foi realizada com 0,3 M de glicose em 0,15 M de NaCl.

2.2 PARASITAS

Promastigotas de *L. infantum* (cepa BH46) foram cultivadas em meio de Schneider suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e mantidas em incubadora BOD a 28 °C, repicadas a cada três a quatro dias (As células foram utilizadas por até 10 repiques). Os

ensaios utilizaram parasitas na fase log de crescimento (três dias). As formas amastigotas foram obtidas de macrófagos peritoneais de Balb/c infectados com *L. infantum*.

2.3 CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$, foram mantidos em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e mantidos em estufa umidificada com 5% de CO_2 a 37°C por 2 h para garantir a aderência dos macrófagos em placas de cultura.

2.4 EFEITOS DA CRAMOLL 1,4 NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A viabilidade celular em células de mamíferos foi avaliada utilizando o ensaio do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich) de acordo com Mosman (1983). Para isso, macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ foram incubados na presença de Cramoll 1,4 (25-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48 h. Em seguida, o meio foi removido e substituído por uma solução de MTT (5 mg/mL em RPMI 1640) e as células foram então incubadas durante mais 3 h (37°C e 5% de CO_2). Posteriormente, a solução foi removida e o produto formado de cristais de formazan intracelular foi dissolvido em DMSO. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi). A concentração pela qual a viabilidade celular foi inibida em 50%, em comparação com as células de controle (CC_{50}), foi determinada por análise de regressão usando o programa SPSS8. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. As células incubadas em meio livre de lectina foram consideradas como controle.

2.5 EFEITOS DA CRAMOLL 1,4 NA ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram tratados por 48 h com Cramoll 1,4 com 2x, 4x e 6x o valor de IC_{50} (concentração que inibiu o crescimento da cultura em 50%) correspondente ao valor obtido às formas promastigotas de

L.infantum. As culturas foram então lavadas com meio RPMI 1640 e incubadas a 37 °C a 5% de CO₂, por 30 min na presença de *Saccharomyces cerevisiae* (10x10⁶/mL). As amostras foram então lavadas com PBS a 37°C, para remover as células de levedura não fagocitadas, e fixadas com metanol absoluto, coradas com solução de Giemsa (10%) tamponada a pH 7,2. O número de células de levedura fagocitadas pelos macrófagos foi avaliado por microscopia óptica. Campos distribuídos ao longo das lamínulas foram selecionados aleatoriamente e todos os macrófagos em cada campo foram examinados. O índice fagocítico foi calculado como o número médio de leveduras fagocitadas por macrófago, multiplicado pela porcentagem dessas células envolvidas na fagocitose (Muniz-Junqueira et al., 2005).

2.6 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA IN VITRO DE CRAMOLL 1,4 EM *Leishmania infantum*

Promastigotas (1x10⁶ parasitas/mL) foram incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações de Cramoll 1,4 (3,25-60 µg/mL). A densidade celular foi determinada por 72 h pela contagem na câmara de Neubauer. A concentração que inibiu o crescimento da cultura em 50% (IC₅₀) foi determinada após 48 h de tratamento por análise de regressão usando o software SPSS 18. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram coletados e plaqueados a 1x10⁶ células/mL em placa de 24 poços, contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado. Deixou-se os macrófagos aderirem durante 2 h a 37 °C em 5% de CO₂ e depois os mesmos foram infectados com promastigotas de *L. infantum* utilizando uma proporção 1:10 a 37 °C durante 16 h. Os parasitas não interiorizados foram removidos por lavagem e a cultura infectada foi incubada por 24 h em meio RPMI 1640 com diferentes concentrações de Cramoll 1,4 (3,6, 7,2 e 14,4µg/mL). Os macrófagos infectados e não tratados com Cramoll 1,4 constituíram o controle do experimento. Pentamidina (PMD, 10 µg/mL) constituiu o controle positivo. As culturas foram coradas pelo Giemsa (Laborclin, Pinhais, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem de 150 células escolhidas aleatoriamente em dois experimentos replicados. O índice de sobrevivência foi determinado multiplicando a percentagem de macrófagos infectados pelo número médio de parasitas por célula infectada.

2.7 ENSAIO ULTRAESTRUTURAL

Para microscopia eletrônica de transmissão, promastigotas tratadas e não tratadas foram fixados por 1 h a 4 °C em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% paraformaldeído em 0,1 M de PBS, pH 7,2. Após lavagem no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas durante 1 h com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio/5mM CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, lavadas no mesmo tampão e depois desidratadas em séries graduadas de acetona (50 -100%) e incluídas por 72 h a 60 °C em resina PolyBed 812. Cortes ultrafinos foram corados com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM109). Para microscopia eletrônica de varredura, os parasitas tratados e o controle foram fixados e pós-fixados conforme descrito acima e deixados aderir em lamínulas recobertas com poli-L-lisina. Os macrófagos peritoneais, cultivados em lamínulas de vidro, foram fixados e pós-fixados como descrito para as formas promastigotas. Ambas as amostras de parasitas e de células de mamíferos foram lavadas no mesmo tampão usado na pós-fixação, desidratadas em etanol graduado, secas em ponto crítico com CO₂, e finalmente revestidas com uma camada de ouro de 20 nm de espessura e observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância one-way (ANOVA) e teste de Turkey para determinar a significância estatística.

2.9 PADRÕES ÉTICOS

Todos os experimentos envolvendo o uso de animais experimentais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e foram aprovados pelo comitê de ética (CEUA-FIOCRUZ 77/2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produtos naturais, especialmente lectinas, exibem amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária (Xu et al., 2015; Iordache et al., 2015). Embora as lectinas tenham aplicações importantes, a pesquisa com essas proteínas contra a *Leishmania* é escassa. Cramoll 1,4 tem sido utilizada em diversos estudos, como diagnóstico diferencial de câncer (Coelho et al., 2017), proteção contra o estresse oxidativo (Da Silva et al., 2015b), efeito imunomodulador (Da Silva et al., 2015a) e atividade antiparasitária contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Fernandes et al., 2010). Devido à sua capacidade de reconhecer carboidratos ligados à superfícies celulares, matriz extracelular ou mesmo livres em diferentes fluidos biológicos, lectinas de plantas e animais têm mostrado atividades importantes contra microorganismos parasitários (Coelho et al., 2017). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa vem investigando o papel das lectinas na interação com parasitas tripanosomatídeos e células hospedeiras (Fernandes et al., 2010, 2014). No presente estudo, objetivamos avaliar os efeitos da lectina de *Cratylia mollis* sobre células de *Leishmania infantum* e mamíferos.

Uma das desvantagens da quimioterapia atual para a leishmaniose é a baixa seletividade das drogas para o parasita, devido à sua alta citotoxicidade para células de mamíferos (Mohapatra, 2014; Castillo et al., 2010). A este respeito, primeiro avaliamos os efeitos de Cramoll 1,4 na viabilidade e morfologia de células de mamíferos. Nossos resultados mostraram que a Cramoll 1,4 não apresentou efeito citotóxico significativo em macrófagos peritoneais, em comparação com as células não tratadas (Figura 1). Pelo contrário, nos macrófagos tratados nas concentrações mais baixas da lectina (25 e 50 µg/mL), houve um aumento significativo na taxa de formação de sal de formazan resultando em aumento da densidade óptica (D.O.). O valor da CC₅₀ encontrado para os macrófagos foi superior a 400 µg/mL (Tabela 1). A baixa citotoxicidade de Cramoll 1,4 já foi relatada na literatura (Da Silva et al., 2015a), assim como os efeitos protetores da Cramoll 1,4 nativa e recombinante contra a morte celular induzida por H₂O₂. A Cramoll 1,4 também conseguiu restabelecer o potencial mitocondrial interrompido pelo tratamento com H₂O₂ em células Vero (Da Silva et al., 2015b). Como os macrófagos peritoneais não se dividem em meio de cultura, o aumento da D.O. observado em macrófagos poderia ser explicado pela ação de Cramoll 1,4 sobre a atividade mitocondrial e não como resultado da proliferação celular.

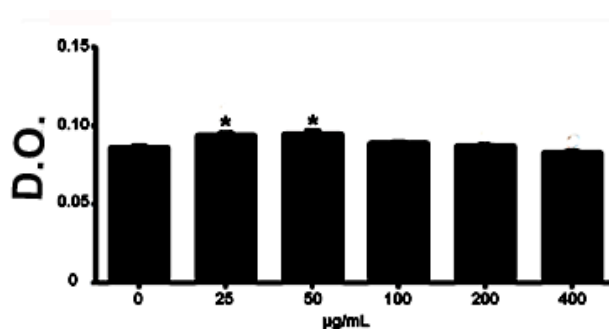


Figura 1. Efeitos de Cramoll na viabilidade de macrófagos peritoneais por MTT. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata * $p < 0,05$ quando comparados com o controle.

Tabela 1. Efeitos da Cramoll 1,4 em macrófagos e formas promastigotas de *L. infatum*.

Tratmento	µg/mL		
	CC ₅₀	IC ₅₀	
	Macrófagos de Balb/c	Promastigotas	IS pro
Cramoll 1,4	> 400	7,2 $\pm$ 0,74	> 55,6

IS= Índice de Seletividade; CC₅₀= concentração da lectina capaz de inibir a viabilidade celular em 50%; IC₅₀= Concentração da lectina capaz de inibir em 50% o crescimento de promastigotas.

Como os macrófagos desempenham um papel importante na imunidade celular, como o reconhecimento de patógenos, sinalização, inflamação e atividade fagocítica (Sica e Mantovani, 2012), investigamos, ainda, as possíveis mudanças induzidas por Cramoll 1,4 em relação aos macrófagos peritoneais murinos. Cramoll 1,4 não apresentou citotoxicidade aparente para macrófagos, no entanto a lectina induziu mudanças significativas nos macrófagos peritoneais quando comparadas com as células controle (figura 2). Os macrófagos do controle apresentaram uma morfologia plana, células com forma amebóide, com longos filopódios (Figura 2A e 2B). Este perfil morfológico sugere que mesmo os macrófagos peritoneais não tratados apresentavam características ativas sob as condições experimentais. O

tratamento dos macrófagos com Cramoll 1,4 em concentrações correspondentes a 2x IC₅₀ (14,4 µg/mL) e 4x IC₅₀ (28,8 µg/mL) para formas promastigotas induziu mudanças significativas em macrófagos com a prevalência de células arredondadas e encurtadas em relação às células espalhadas e achatadas do controle não tratado. Um grande número de estruturas intracelulares arredondadas, correspondente a vesículas contendo Cramoll 1,4 endocitada, foram observadas abaixo da superfície celular no córtex dos macrófagos com morfologia plana (Figura 2C-F). O encurtamento das células foi mais proeminente no tratamento correspondente a 4x IC₅₀ de Cramoll 1,4 (Figura 2E-F). Nesta condição, as células assumiram um formato de fuso ou de células arredondadas.

A diversidade funcional e plasticidade são marcas de macrófagos (Heinrich et al., 2017). Dependendo do estímulo ambiental, essas células são ativadas assumindo diversos fenótipos morfológicos e provocando diferentes respostas. Lectinas como ConBr (da *Canavalia brasiliensis*) mostraram induzir a ativação macrofágica e um aumento na produção de NO por essas células (Andrade and Saraiva, 1999). Da mesma forma, Cramoll 1,4 mostrou imunomodulação em macrófagos peritoneais levando a um aumento de NO, superóxido e citocina pró-inflamatória (IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α) (Da Silva et al., 2015a). As alterações morfológicas induzidas nos macrófagos tratados com Cramoll 1,4 podem ser decorrentes da ativação dos macrófagos após a endocitose da lectina por essas células, mas não foi possível descartar a possibilidade de Cramoll 1,4 causar algum efeito citotóxico nessas células, o que não foi detectado pelo ensaio MTT. A fim de verificar se as alterações morfológicas em macrófagos tratados com Cramoll 1,4 foram devidas a um efeito citotóxico desta lectina, a atividade fagocítica das células controle e tratadas foi avaliada (Figura 3). Nossos resultados mostraram que o tratamento com a maior concentração da lectina, 43,2 µg/mL (6x IC₅₀) causou uma diminuição significativa na atividade fagocítica dos macrófagos em relação às células de levedura *S. cerevisiae*, em comparação com macrófagos controle. Em um trabalho anterior (Da Silva et al., 2015a), Cramoll 1,4 induziu um aumento significativo da atividade por células do exsudato peritoneal (PECs) frente a *Staphylococcus aureus*. Sem apresentar qualquer efeito citotóxico aos macrófagos. Embora o número de células de levedura/macrófagos tenha sido reduzido significativamente em macrófagos tratados com maior concentração de Cramoll 1,4, a atividade fagocítica foi preservada, sugerindo que o tratamento com Cramoll não apresentou citotoxicidade para macrófagos, como tem sido relatado na literatura para outras células (Albuquerque et al., 2017; Da Silva et al., 2015b).

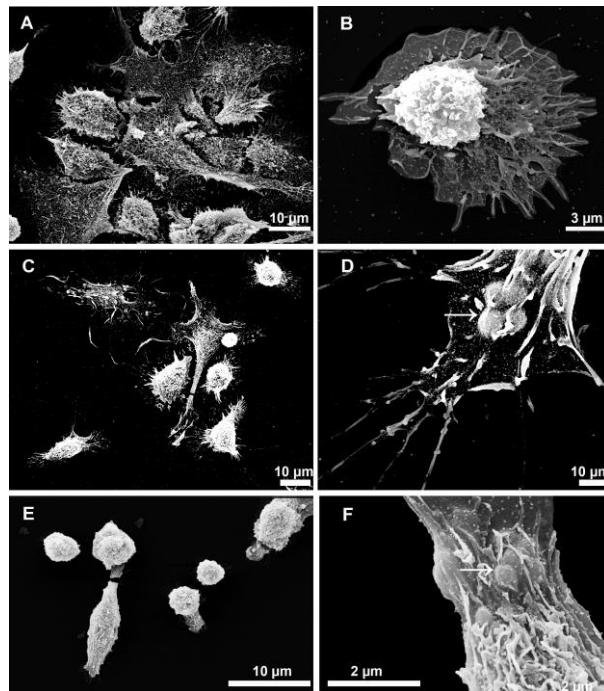


Figura 2 Efeito de Cramoll 1,4 na ultraestrutura de macrófagos. (A-B) Células de controle não tratadas apresentando uma morfologia plana espalhada. Notar em B a presença de membrana eriçada formando filopódios e lamelopódios bem desenvolvidos. (C-D) macrófagos tratados com 14,4 µg/mL de Cramoll 1,4 mostrando um encurtamento do corpo celular (C). No maior aumento foi possível observar a presença de estruturas intracelulares arredondadas semelhantes a vesículas endocíticas no córtex do corpo celular (seta). (E-F) Macrófagos tratados com 28,8 µg/mL mostrando corpo celular arredondado ou fusiforme com perda de filopódia e lamelopódio. Note que as organelas do tipo endossoma ainda estão presentes no citoplasma de uma célula tratada.

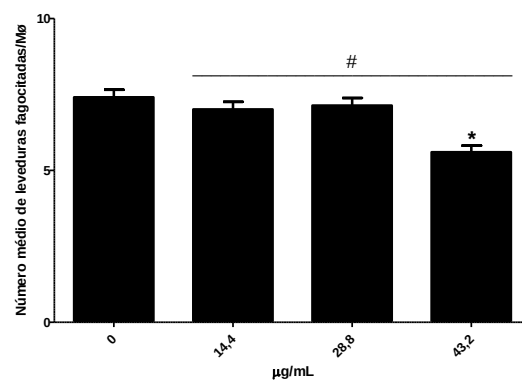


Figura 3 Efeitos de Cramoll 1,4 na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais murinos. Todos os valores são médias de ± 280 células contadas * $p < 0,01$, diferença significativa em comparação com as células não-tratadas. # $p < 0,01$ comparado com 14,4 µg/mL e 28,8 µg/mL.

O tratamento das formas promastigotas de *L. infantum* com Cramoll 1,4 inibiu o crescimento celular de maneira dose dependente após 48 h de cultivo, com o valor de $IC_{50} = 7,2 \pm 0,74 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Cramoll 1,4 foi capaz de inibir o crescimento de 100% de promastigotas de *L. infantum* em concentração inferior a $60 \mu\text{g/mL}$ após 48 h de tratamento (Figura 4). De acordo com Antarelli et al. (2016) o valor de IC_{50} para o medicamento de referência miltefosina é $8,3 \mu\text{g/mL}$. O valor de IC_{50} obtido para Cramoll 1,4 foi semelhante aos obtidos para miltefosina. Segundo um manual de treinamento para triagem em doenças negligenciadas, um composto ou molécula com $IS > 10$ é considerado como uma droga promissora para rastreamento secundário adicional contra *Leishmania sp.* (Brun et al., 2009). Quando comparamos o efeito de Cramoll 1,4 em células de mamíferos com os obtidos para as formas promastigotas, observamos que essa lectina mostrou-se mais seletiva em relação à promastigotas, como demonstrado pelos maiores valores de $IS > 55$ (Tabela 1), superior ao critério de seleção de resultados estabelecido pela DNDi. Isso é particularmente interessante, considerando-se a alta toxicidade dos medicamentos de referência para a leishmaniose.

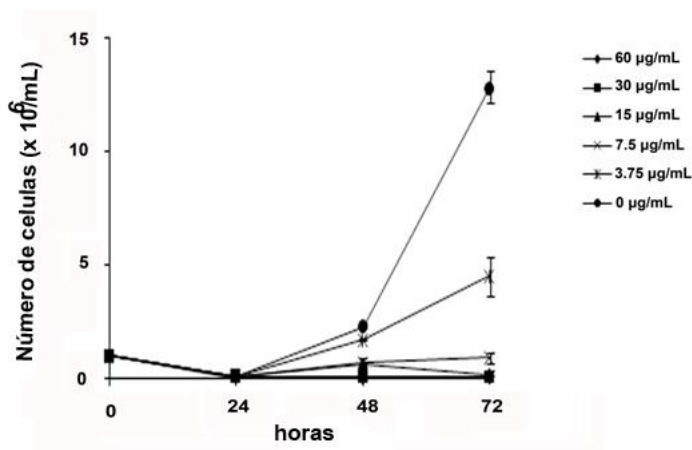


Figura 4 Curva de crescimento de promastigotas de *L. infantum* tratadas ou não com Cramoll 1,4 por até 72 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata * $p < 0,05$ quando comparados com o controle.

Com o objetivo de avaliar possíveis efeitos da Cramoll 1,4 na ultraestrutura de promastigotas e identificar possíveis alvos intracelulares da lectina, foi realizado o ensaio de

microscopia eletrônica. Microscopia eletrônica de transmissão de células do controle (Figura 5A) e células tratadas revelou que Cramoll 1,4 induziu severas alterações morfológicas nas formas promastigotas de *L. infantum* (Figuras. 5B-E), incluindo perda de polaridade celular, dilatação do retículo endoplasmático e intensa desorganização do citoplasma, especialmente em altas concentrações de lectina (Figuras 5E). Nesta última condição, foi possível observar o aparecimento de grande espaço elétron-luscente na maioria das células afetadas (Figuras 5E).

A mitocôndria única do parasita foi drasticamente afetada pelo tratamento com a lectina. Nas células tratadas, esta organela usualmente assumia um inchamento com cristas desorganizadas e apresentava perfis de membrana concêntricos e vesículas na matriz mitocondrial (Figura 5 B e 5D). Estas alterações na estrutura da mitocôndria dos parasitas, mesmo em menor concentração de lectina, sugeriram esta organela como alvo primário da ação da lectina. Corroborando nossos dados, um relato anterior da interação da Cramoll 1,4 com o protozoário tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi* mostrou que essa lectina causou permeabilização da membrana plasmática seguida de influxo de Ca^{2+} e morte celular por necrose (Fernandes et al., 2010). Cramoll 1,4 também foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial e prejudicou a fosforilação oxidativa em ambos, parasita inteiro e fração mitocondrial. Um estudo mais aprofundado mostrou que a Cramoll 1,4 se ligou à membrana do *T. cruzi* e após ser internalizada foi localizada na mitocôndria do parasita (Fernandes et al., 2014).

Análises por microscopia eletrônica de varredura reforçam a atividade de Cramoll 1,4 contra promastigotas de *L. infantum* (Figura 6). As células controle apresentaram morfologia alongada com membrana plasmática lisa apresentando intensa atividade exocítica (Figuras 6 A e B). O tratamento com 1x e 2x o valor da IC_{50} de Cramoll 1,4 induziu intensa aglutinação dos parasitas, provavelmente pelo reconhecimento de resíduos de manose na superfície do parasita pela lectina (Figuras 6 C e 6E). A morfologia celular foi alterada pelo tratamento com a lectina. Independentemente da concentração da lectina testada contra os parasitas, as células apareciam arredondadas com uma membrana plasmática acentuadamente enrugada (Figura 6 D). Em algumas células foi possível observar a presença de grandes perfurações na membrana plasmática, que apresentavam aspecto liso (Figuras 6D e 6F, ver setas). As células com divisão incompleta sugeriram que Cramoll 1,4 também pode ter um efeito citostático em promastigota. Em conjunto, as alterações morfológicas induzidas em promastigota de *L. infantum* sugeriram que o tratamento com Cramoll 1,4 causou alterações mitocondriais significativas que, em última análise, podem levar à morte celular por necrose, como ocorreu

em *Trypanosoma cruzi* tratados com a mesma lectina. O aumento da presença de fragmentos de células e modificações nas membranas celulares nos parasitas tratados com Cramoll 1,4, como observado por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, respectivamente, corrobora essa idéia.

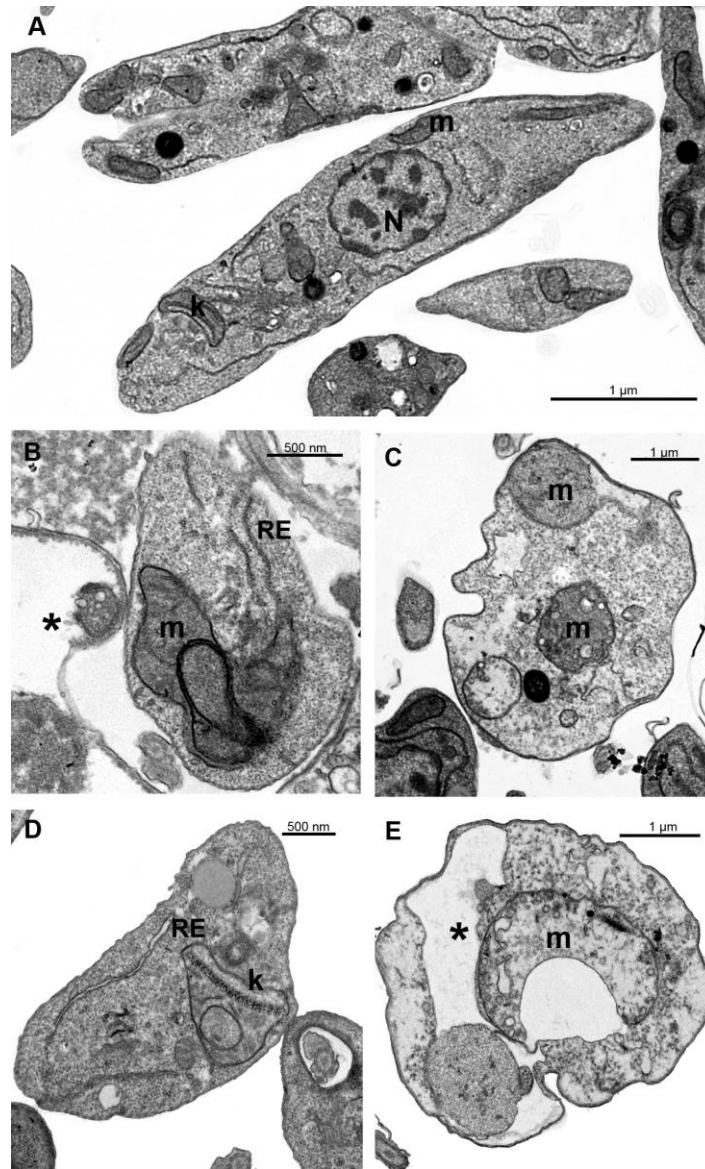


Figura 5 Efeitos de Cramoll 1,4 na ultra-estrutura de promastigotas de *Leishmania infantum*. Microscopia eletrônica de transmissão de controle (A) apresentando promastigotas tratadas com Cramol 1,4 (B-E). (A) Célula do controle mostrando ultra-estrutura bem preservada com citoplasma granular homogêneo, corpo celular alongado, núcleo bem definido, mitocôndria e retículo

endoplasmático. (B-C) Formas promastigotas tratadas com 1x IC₅₀ mostrando inchaço mitocondrial com perda do conteúdo da matriz, desorganização das cristas mitocondriais com formação de perfis concêntricos de membrana na matriz mitocondrial. Observe a presença de detritos celulares (*). (D-E) Promastigotas tratados com 2x IC₅₀ de Cramoll 1,4 apresentando retículo endoplasmático dilatado (RE) e cinetoplasto alterado (K). (F) Detalhe de um promastigota apresentando uma mitocôndria drasticamente alterada, com perda do conteúdo da matriz e vesículas na membrana interna (*) e grande espaço elétron-lucente no citoplasma.

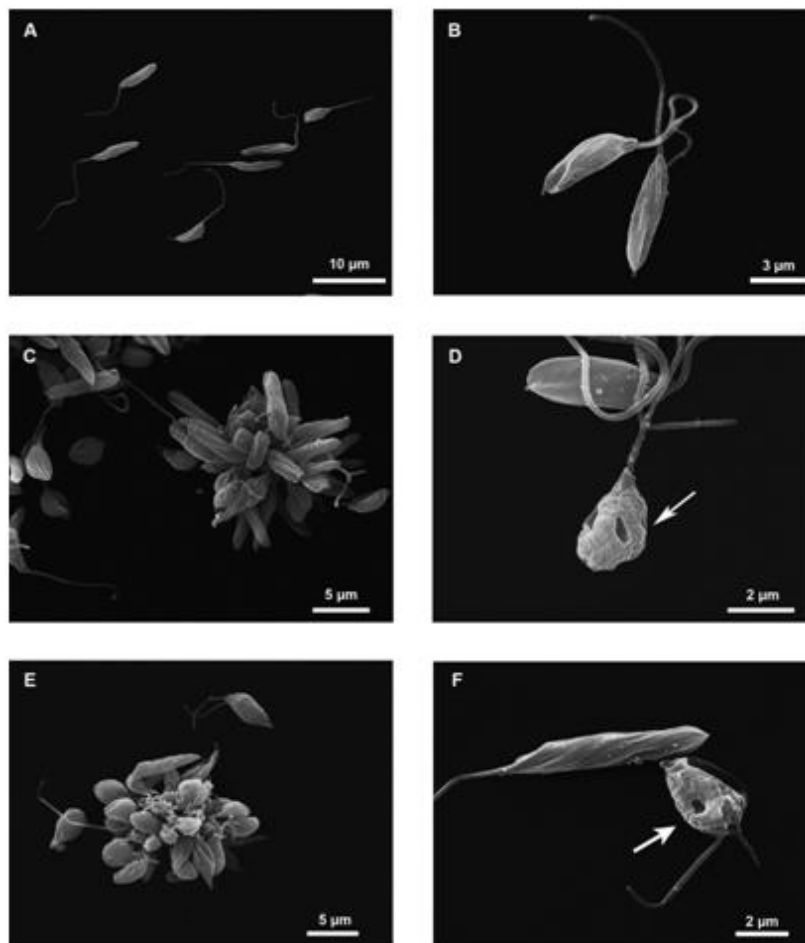


Figura 6 Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com Cramoll 1,4. (A-B) Aspecto geral de um promastigota do controle mostrando uma superfície celular alongada e lisa. (C-F) Culturas de promastigotas tratadas com 1x IC₅₀ (C-D) e 2x IC₅₀ Cramoll 1,4 (E-F) apresentando intensa aglutinação celular. Em (D e F) detalhe de células individuais alteradas drasticamente mostrando a membrana enrugada e ondulada com grandes perfurações (ver seta) e encurtamento do flagelo.

Além dos efeitos sobre o crescimento e viabilidade de formas promastigota, também mostramos que Cramoll 1,4 causou uma diminuição significativa na sobrevivência de formas amastigotas de *L. infantum* em macrófagos, em todas as concentrações testadas. Na concentração mais alta da lectina, uma diminuição de quase 100% foi observada no índice de sobrevivência de amastigotas, que foi comparável com o medicamento de referência pentamidina (Figura 7A). A lectina também causou uma diminuição no número de células infectadas (Figura 7B).

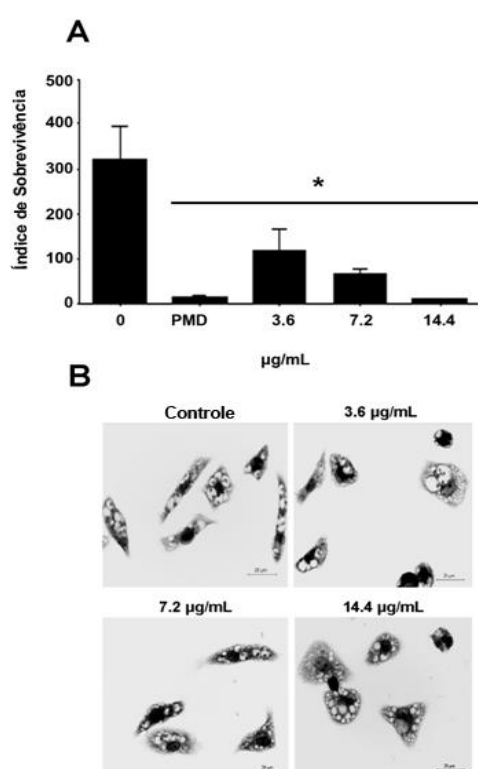


Figura 7 Efeito de Cramoll 1,4 em macrófagos infectados com *Leishmania infantum* (A) Índice de sobrevivência de *Leishmania infantum* dentro de macrófagos após 24 h de tratamento com a Cramoll 1,4. * Estatisticamente significativo ($p > 0,05$) em comparação com o controle (0), PMD = pentamidina usada como medicamento de referência. (B) Macrófagos corados com Giemsa infectados com *L. infantum* tratados ou não com diferentes concentrações de Cramoll 1,4.

É bem conhecido que os macrófagos são as principais células-alvo da *Leishmania* spp. Para mantê-lo dentro do ambiente intracelular hostil dos macrófagos, *Leishmania* desenvolveu várias estratégias para contra-atacar o poder microbicida dos macrófagos e prejudicar a resposta imune inata (Tiwari et al., 2017; Podinovskaia and Descoteaux, 2015).

Entre essas estratégias, as *Leishmanias* spp. previnem a ação de agentes antimicrobianos, como o NO e a função de macrófagos indutíveis por citocinas, necessária para uma resposta imune efetiva (Podinovskaia and Descoteaux, 2015). Evidências na literatura demonstram que Cramoll 1,4 tem importante atividade imunomoduladora, potencializando o óxido nítrico, o superóxido e citocinas pró-inflamatórias em células de exsudato peritoneal infectadas com *Staphylococcus aureus* (Da Silva et al., 2015a). Embora não possamos descartar a possibilidade da ação da Cramoll 1,4 diretamente no amastigota intracelular, é possível que o efeito inibitório de Cramoll 1, 4 sobre a sobrevivência de amastigotas no interior de macrófagos possa ser parcialmente devido ao seu papel imunomodulador nos macrófagos, reestabelecendo sua atividade antimicrobiana, bem como a atividade de macrófagos induzida por NO e outros radicais livres.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a Cramoll 1,4 foi efetiva em inibir o crescimento e a viabilidade de promastigotas, bem como em causar uma redução na sobrevivência de amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* sem afetar substancialmente a viabilidade e função dos macrófagos. Estes resultados apontam a Cramoll 1,4 como um agente promissor contra *Leishmania infantum*.

AGRADECIMENTOS

Carina Helena-Silva agradece a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de Doutorado. Os autores R. B. C. Q. Figueiredo, L. C. B. B. Coelho, M. T. S. Correia, M. G. Caneiro-da-Cunha, expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa e pelo apoio financeiro. Os autores também agradecem ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz pelo suporte analítico.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, P.B.S., Soares, P.A.G., Aragão-Neto, A.C., Albuquerque, G.S., Silva, L.C.N., Lima-Ribeiro, M.H.M., et al., 2017. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Int J BiolMacromol.* 102, 749-757. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.064.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Berna, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano J., Jannin J., Boer M., 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE.* 7. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Andrade, A.F., Saraiva, E.M., 1999. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 85. 576-581.
- Andrews, K.T., Fisher, G., Skinner-Adams, T.S. 2014. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 4, 95-111. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.02.002.
- Antinarelli, L.M.R., Pinto, N.C., Scio, E., Coimbra, E.S. 2015. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 87. doi:10.1590/0001-3765201520140288.
- Brun, R., Wenzler, T., Kaiser, M., Yardley, V., Ioset, J. 2009. The Pan-Asian Screening Network- Drug Screening for Kinetoplastids Diseases A Training Manual for Screening in Neglected Diseases. by, Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi).
- Cardoso, V.S., Vermelho, A.B., Ricci Junior, E., Rodrigues, I.A., Mazotto, A.M., Supuran, C.T. 2018. Antileishmanial activity of sulphonamidenanoemulsions targeting the β -carbonic anhydrase from *Leishmania* species. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 33, 850-857, doi:10.1080/14756366.2018.1463221.
- Castillo, E., Dea-Ayuela, M.A., Bolás-Fernández, F., Rangel, M., González-Rosende, M.E. 2010. The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. *CurrMedChem.* 17, 4027-4051.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.S., Lima, V.L.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., et al. 2017. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017, doi: 10.1155/2017/1594074.

- Coriolano, M.C., Santana, J.B., Patriota, L.L.S., Soares, A.K.A., Lorena, V.M.B., Paiva, P.M.G., et al. 2018. Immunomodulatory Effects of the Water-soluble Lectin from *Moringa oleifera* Seeds (WSMoL) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). *Proteína PeptLett.* 25, 295-301. doi: 10.2174/ 0929866525666180130141736.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 261-273. doi: 0273-2289/195/5503--0261506.40.
- Da Silva, G.A.R., Eyer-Silva, W.A., Magalhães, M.C., Fernando, F.R.A, J.F.C. Pinto, J.F.C., Azevedo, M.C.V.M. et al. 2017. A novel case of human visceral leishmaniasis from the urban area of the city of Rio de Janeiro: autochthonous or imported from Spain?. *Rev. Inst. Med. trop. S.* 59. doi: 10.1590/S1678-9946201759011.
- Da Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., De Castro, M.C.A.B., Pereira, V.R.A., Da Paz, N.V., Coelho, L.C.B.B., et al. 2015. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *Int J BiolMacromol.* 72, 848-54. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.045.a
- Da Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., De Castro, M.C.A.B., HIGINO, T.M.M., Da Cunha, C.R.A., Pereira, V.R.A., et al. 2015. pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *OxidMedCell Longev.* 2015. doi: 10.1155/2015/520872b.b
- De Medeiros, M.L.S., De Moura, M.C., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Bezerra, A.C.D.S., et al. 2018. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*, *Int J Biol Macromol.* 108, 782-789. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.167.
- Dutra, F.L., Oliveira, M.M., Santos, R.S., Silva, W.S., Alviano, D.S., Vieira, D.P., et al. 2016. Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum chagasi* within macrophages. *Acta Tropica.* 164, 69-76, doi: 10.1016/j.actatropica.2016.08.026.
- Fernandes, M.P., Leite, A.C., Araújo, F.F., Saad, S.T., Baratti, M.O., Correia, M.T., et al. 2014. The *Cratylia mollis* seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine a-insensitive permeability transition in *Trypanosoma cruzi* mitochondria. *J Eukaryot Microbiol.* 61, 381-388. doi: 10.1111/jeu.12118.

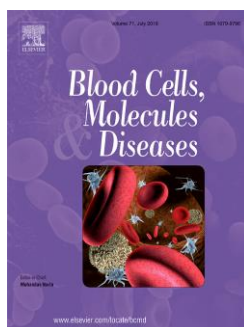
- Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M.R., Araújo, F.F.B., Meirelles, F.V., Correia, M.T.S., et al. 2010. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratyliia mollis* seed lectin. *Bioenerg Biomembr.* 42, 68-78, doi: 10.1007/s10863-010-9268-9.
- Heinrich, F., Lehmbecker, A., Raddatz, B.B., kegler, K., Tipold, A., Stein, V.M., et al. 2017. Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages *in vitro*. *PLoS ONE* 12 e0183572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183572>. doi: 10.1371/journal.pone.0183572.
- Iordache, F., Ionita, M., Mitrea, L.I., Fafaneata, C., Pop, A. 2015. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. *Curr Pharm Biotechnol.* 16, 152-61.
- Kaltner, H., Caballero, G.G., Ludwig, A.K., Manning, J.C., Gabius, H.J. 2018. From glycophenotyping by (plant) lectin histochemistry to defining functionality of glycans by pairing with endogenous lectins, *Histochem Cell Biol.* 149, 547-568, doi: 10.1007/s00418-018-1676-7.
- Li, G., Cheng, J., Mei, S., Wu, T., Ye, T. 2018. *Tachypleus tridentatus* Lectin Enhances Oncolytic Vaccinia Virus Replication to Suppress In Vivo Hepatocellular Carcinoma Growth. *Mar Drugs.* 16, doi: 10.3390/md16060200.
- Maciel, E.V., Araújo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C., Correia, M.T. 2004. Mitogenic activity of *Cratyliia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32, 57-60. doi: 10.1016 / j.biologicals.2003.12.001.
- Melo, C.M.L., Lima, A.L.R., Beltrão, E.I.C., Cavalcanti, C.C.B., Melo-Júnior, M.R., Montenegro, S.M.L., et al. 2011. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*, *Acta Trop.* 118, 152-8, doi: 10.1016/j.actatropica.2011.01.008.
- Mohapatra., S. 2014. Drug Resistance in Leishmaniasis: Newer Developments. *Trop Parasitol.* 4, 4-9. doi: 10.4103/2229-5070.129142.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Jimmunol Methods.* 65, 55-63.
- Muniz-Junqueira, M.I., Silva, F.O., de Paula Júnior, M.R., Tosta, C.E. 2005. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop.* 94, 128-138. doi:10.1016/j.actatropica.2005.03.002.
- Podinovskaia, M., Descoteaux, A. 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Medicine.* doi: 10.2217/fmb.14.103.

- Sales, V.S., Monteiro, Á.B., Delmondes, G.A., Nascimento, E.P., Figueiredo, F.R.S.D.N., Rodrigues, C.K.S. 2018. Antiparasitic Activity and Essential Oil Chemical Analysis of the Piper Tuberculatum Jacq Fruit. Iran J Pharm Res. 17, 268-275.
- Santos, A.C., Peixoto, C.A., Coelho, L.C.B.B. 2004. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. Micron. 35, 613-8. doi:10.1016/j.micron.2004.01.004.
- Sica, A., Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. J Clin Invest. 122, 787-795. doi:10.1172/jci59643.
- Silva, J.M., Antinarelli, L.M.R., Ribeiro, A., Coimbra, E.S., Scio, E. 2015. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* mediated by mitochondrial dysfunction. Exp Parasitol. 159. 143-150, doi: 10.1016/j.exppara.2015.09.009.
- Singh, O.P, Sundar, S. 2014. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects, Front Immunol. 5, doi:10.3389/fimmu.2014.00296.
- Soleimanifard, S., Arjmand, R., Saberi, S., Salehi, M., Hejazi, S.H. 2017. Treatment Outcome of the Drug-resistant Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis by Glucantime. Adv Biomed Res.6. doi: 10.4103/2277-9175.201329.
- Sunter, J., Gull, K. 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. Abra Biol.7. doi: 10.1098/ rsob.170165.
- Tiwari, B., Pahuja, R., Kumar, P., Rath, S.K., Gupta, K.C., Goyal, N. 2017. Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 61. doi: 10.1128/AAC.01169-16. Print 2017 Mar.
- Vieira-Araújo, F.M., Rondon, F.C.M., Vieira, Í.G.P., Mendes, F.N.P., Freitas, J.C.C., Morais, S.M. 2018. Sinergism between alkaloids piperine and capsaicin with meglumine antimoniate against *Leishmania infantum*. Exp Parasitol. 188, 79-82, doi: 10.1016/j.exppara.2018.04.001.
- Xu, P., Zhang, T., Guo, X., Ma, C., Zhang, X. 2015. Purification, characterization, and biological activities of broccolinilectin. BiotechnolProg. 31, 736-43. doi:10.1002/btpr.2070.

Zampini, R., Sequeira, S., Argañaraz, M.E., Apichela, S.A. 2017. SL15: a seminal plasma-derived lectin from the sperm of llama (*Lama glama*). Mol Reprod. 13. doi: 10.1002/mrd.22816.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Libidibia ferrea* VAR *ferrea*

Artigo submetido na versão em inglês para a revista Blood Cell, Molecules Diseases



Fator de Impacto: 1.836

Qualis B1

Avaliação da atividade leishmanicida de extratos orgânicos de *Libidibia ferrea* var *ferrea*
Carina Helena-Silva^a, Rosimere da Silva^a, Vanderlan N. Holanda^a, Magda R. A.
Ferreira^b, Luiz A. L. Soares^b, Mary A. Souza^c, Priscilla Albuquerque^{a,d}, Regina B. C. Q.
Figueiredo^c, Maria T. S. Correia^a, Maria G. Carneiro-da-Cunha^{a,d*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil -

^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil - magda_nani@hotmail.com/ phtech@uol.com.br

^cDepartamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, CEP 50670-901 Recife, PE, Brazil - maryaranda88@gmail.com/ rcbqf01@gmail.com

^dLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE, CEP 50670-901 Recife, PE, Brazil

* Autor correspondente. Tel.: +55 81 21268540; fax: +55 81 21268576.

Endereço de E-mail: mgcc1954@gmail.com (Maria G. Carneiro-da-Cunha)

RESUMO

Leishmania amazonensis e *Leishmania infantum* são importantes agentes causadores das leishmanioses tegumentar e visceral, respectivamente. O tratamento contra as infecções é tóxico e a resistência dos parasitas tem impulsionado a busca por novas substâncias químicas que afetam o funcionamento celular. Extratos e metabólitos secundários de plantas apresentam diversas atividades biológicas. Dentre estas plantas destaca-se a *Libidibia ferrea* var *ferrea*. Nós avaliamos o efeito de extratos metanólicos da entrecasca (EME) e vagem (EMV) de *L. ferrea* e de um metabólito secundário detectado nos extratos (Ácido Gálico) sobre promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, e seus efeitos sobre células de mamíferos. Ácidos Gálico (AG) e Elágico (AE) foram os metabólitos secundários detectados por HPLC em EME e EMV de *L. ferrea*. EME e EMV apresentaram valores de $CC_{50} > 500$ $\mu\text{g/mL}$. EMV preveniu a perda de viabilidade celular em células Vero submetidas ao estresse oxidativo. O AG comercial apresentou CC_{50} de $126 \pm 36,8 \mu\text{g/mL}$, porém, a partir da concentração de $25 \mu\text{g/mL}$, os níveis de ATP foram reduzidos em macrófagos, e importantes alterações morfológicas foram observadas. EME foi ativo contra *L. amazonensis* e inibiu o crescimento com valor de IC_{50} de $79,21 \pm 7,48$, enquanto EMV foi ativo contra *L. infantum*, apresentando IC_{50} de $23,3 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$. AG apresentou IC_{50} de $8,95 \pm 1,95 \mu\text{g/mL}$ para *L. amazonensis* e $18,8 \pm 5,1 \mu\text{g/mL}$ para *L. infantum*. Importantes alterações ultraestruturais foram evidenciadas em parasitas tratados com AG. Nossos achados apontam EME, EMV e AG como agentes promissores contra a *L. amazonensis* e a *L. infantum*.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; *Leishmania amazonensis*; *Libidibia ferrea*; Metabólitos secundários.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um complexo de doenças infecciosas causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. Cerca de 20 espécies diferentes de parasitas são responsáveis pela transmissão através de insetos flebotomíneos em 98 países. O amplo espectro de sintomas que caracterizam os diferentes tipos de leishmaniose depende principalmente das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção [1].

Leishmania brasiliensis e *Leishmania amazonensis* constituem os principais agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar (LT). É a manifestação mais comum da doença, caracterizada pela presença de lesões ulcerativas na pele, no local do repasto sanguíneo dos insetos. *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* são os principais agentes causadores da Leishmaniose Visceral (LV), a manifestação mais grave da doença e quase sempre fatal quando não tratada, em que o parasita se espalha para órgãos vitais como fígado, baço e medula óssea [2, 3].

No ano de 2015 foram registrados 197.552 novos casos de LT, dos quais mais de 90% foram registrados em duas regiões: região do Mediterrâneo Oriental com 70% dos registros e Região das Américas, com 23%. Para a LV, a distribuição ocorreu de forma mais igualitária em todo o mundo, com 23.804 novos casos [4].

O tratamento convencional para diferentes tipos de leishmaniose é realizado com a administração de antimoniais pentavalentes como estiboglucanato de sódio e antimonato de meglumina. No entanto, a alta toxicidade e o desenvolvimento de resistência nos parasitas estimularam estudos para a síntese de outras drogas, como o Desoxicolato de anfotericina B, bem como formulações lipídicas (lipossomas) da anfotericina B, mas o alto custo e a persistência da citotoxicidade são fatores cruciais na inviabilidade do tratamento. A paromomicina e a miltefosina também são aplicadas no combate às infecções causadas pelos parasitas do gênero *Leishmania*, porém todas essas formas de tratamento apresentam falhas clínicas [5]. Leishmanioses são doenças negligenciadas, especialmente devido aos baixos investimentos em diagnóstico, tratamento e controle. Afetam principalmente populações mais pobres e áreas sem saneamento básico, baixa renda e baixa escolaridade [6, 7]. Na busca por novos tratamentos contra doenças infecciosas e parasitárias, as plantas se destacam como vastas fontes de compostos bioativos.

O bioma da Caatinga, encontrado exclusivamente no Brasil, é caracterizado por baixas taxas pluviométricas, causando a formação de solos secos, principalmente vegetação arbustiva. Possui uma grande diversidade de plantas, que apresentam diferentes atividades biológicas, no entanto pouco estudadas [8].

Libidibia ferrea var *ferrea* (Mart. Ex Tul.) L. P. Queiroz var., pertencente à família Fabaceae, popularmente conhecida como pau ferro, é uma árvore de médio porte, amplamente encontrada em todo o território brasileiro, incluindo a Caatinga. É utilizada para diversos fins, como a recuperação de áreas degradadas e amplamente aplicadas na medicina popular [9]. Estudos comprovaram as aplicações biológicas de extratos e frações de diferentes partes desta planta. Extratos da vagem e da casca mostraram atividade anti-inflamatória e antiúlcera [10]. O extrato bruto da vagem de *L. ferrea* apresentou atividade antiproliferativa contra células de câncer colorretal [11], atividade antifúngica [12], hepatoprotetora [13] e antimicrobiana [14].

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a constituição química de extratos metanólicos da entrecasca e vagem de *L. ferrea*, bem como a atividade antileishmania contra *L. amazonensis* e *L. infantum* dos extratos e de um metabólito secundário detectado nos extratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A entrecasca e a vagem de *L. ferrea* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil), em outubro de 2014 e abril de 2015, respectivamente. O material vegetal foi identificado e um espécime foi depositado no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), e esta amostra foi utilizada como material de referência (Número 84.035). O Ácido Gálico (AG 98%), o meio Schneider's, o MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), a Quercetina e a Rutina foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Aldrich Brasil), o Ácido Elágico (AE 97%) foi adquirido da Acrôs Organic. O Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%) foi adquirido da Sinth, o soro fetal bovino foi adquirido pela Gibcon e a Catequina foi adquirida da Fisher Chemical.

2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS - SOLUÇÃO ESTOQUE

A partir de amostras da entrecasca e vagens de *L. ferrea*, secas e maceradas em um moinho Tecnal tipo Willy TE-650, extratos orgânicos foram obtidos com o solvente metanol (10% p/v), sob agitação por 24 h e em seguida filtrados em papel de filtro, os quais foram denominados de EME (Extrato Metanólico da Entrecasca) e EMV (Extrato Metanólico da Vagem). Após filtração, o solvente foi removido em um evaporador rotativo e finalmente amostras de 50 mg foram solubilizadas em 1 mL de DMSO. O AG foi diluído em água destilada a uma concentração de 1 mg/mL

2.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As amostras dos EME, EMV e padrões (Tabela 1) foram diluídas em metanol para uma concentração final de 1 mg/mL e aplicadas a 5 mm da origem e com término de 5 mm do final das placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Germany), com auxílio de capilares. As placas (5 X 5 cm) foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Tabela 1) à temperatura ambiente (25 °C). As bandas foram aplicadas com largura de 3 mm entre elas e com uma distância das bordas das placas de 3 mm.

Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente (25 °C) e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível e em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Tabela 1). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Tabela 1 Classes de metabólitos secundários e reveladores.

Classe de Metabólito		Fase Móvel	Revelador	Padrão
Polifenóis Hidrolisáveis)	(Taninos	90:5:5	NEU + PEG	Ác. gálico e Ác. elágico
Taninos condensados		90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonóides		90:5:5	NEU + PEG	Quercetina e Rutina

Derivados Cinâmicos	90:5:5	NEU + PEG	Ác. Cafeico e Ác. Clorogênico
Terpenos e Esteroides	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β -Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	Lieberman-Burchard+ Δ	Escina
Açúcares redutores	50:20:10:10	Timol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-frutose

Fases móveis: 90:5:5 – Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 – Tolueno: acetato; 50:50:50 – Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água.

2.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE ARRANJO DE FOTODIODOS (CLAE-DAD)

Preparação das amostras

Inicialmente, foram preparadas soluções estoques a partir de 5 mg dos extratos EME e EMV, os quais foram transferidos individualmente para um balão volumétrico de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de metanol e levados ao ultrassonicador durante 30 minutos para completa solubilização. Ao final, o volume foi aferido com metanol para 5 mL.

As soluções das amostras foram obtidas de alíquotas de 1,5 mL da solução estoque, as quais foram transferidas para balão volumétrico de 5 mL, e o volume aferido com água ultrapura. Ao final, as amostras foram filtradas em filtros de PVDF de 25 mm e 0,45 μ m, e transferidas para frascos certificados para usos cromatográficos.

Soluções padrões:

A partir de uma solução padrão de Ácido gálico a 100 μ g/mL procedeu-se diluições necessárias, a fim de obter a curva de calibração.

A solução padrão de Ácido elágico a 100 µg/mL foi preparada em metanol: água (3:1). Em seguida, procedeu-se com as diluições necessárias, a fim de obter a curva de calibração.

Método por CLAE-DAD

A quantificação dos ácidos gálico e elágico foi conduzida em HPLC (Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific®), acoplado com Detector de Arranjo de Fotodiodos (DAD; Thermo Fisher Scientific®) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific®), degaseificador e amostrador automático com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific®). Os dados cromatográficos foram processados com o auxílio do programa computacional Chromeleon versão 6.0 (3000 RS Dionex, Thermo Fisher Scientific®). O comprimento de onda foi fixado em 254 nm para detecção do ácido elágico e em 270 nm para o ácido gálico, de acordo com o máximo de absorção observado no espectro de varredura capturado pelo DAD. A separação cromatográfica foi realizada com coluna C₁₈ (250 mm x 4.6 mm d.i., tamanho de partícula 5 µm; NST®) protegida por pré-coluna (C₁₈, 4 mm x 3.9 µm, Phenomenex®). As separações foram realizadas com temperatura do forno da coluna a 26 °C. A fase móvel consistiu em água ultrapura (A) e metanol (B) ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético, com fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa gradiente foi aplicado como segue: 0–10min, 20–40% B; 10–30min, 40–70% B; 30–31min, 70% B; 31–32 min, 70–20% B; 32–33min, 20% B.

Foram injetados, separadamente, 20 µL das soluções padrão e solução amostra, e os cromatogramas foram registrados para mensurar as áreas dos picos. O resultado foi expresso em g% de ácido gálico e g% de ácido elágico, de acordo com a curva analítica construída com os respectivos padrões. Os cálculos consideraram a pureza de 98% e 96% para os padrões de ácido gálico e de ácido elágico, respectivamente.

2.5 PARASITAS

Promastigotas de *L. amazonensis* (Cepa LTB0016) e *L. infantum* (cepa BH46) foram cultivadas em meio de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em incubadora BOD a 28 °C, passadas a cada três a quatro dias. Os ensaios utilizaram parasitas na fase log de crescimento (três dias).

2.6 CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos em estufa umidificada com 5% de CO_2 a 37°C .

2.7 ENSAIO DE MTT- EFEITO DE EME, EMV E AG SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A viabilidade celular em células de mamíferos foi avaliada utilizando o ensaio do MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) de acordo com Mosman (1983) [15]. Para isso, macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c na concentração de $1 \times 10^6/\text{mL}$ foram incubados na presença de EME, EMV (5, 50 e $500 \mu\text{g}/\text{mL}$) e AG (6,25 - $200 \mu\text{g}/\text{mL}$) por 48 h. No final do tratamento, o meio foi removido e foi adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL em RPMI 1640) e as células foram incubadas durante mais 3 h (37°C e 5% de CO_2). Posteriormente, o meio foi removido novamente e o produto formado de cristais de formazan intracelular foi dissolvido em DMSO. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi). A concentração pela qual a viabilidade celular foi inibida em 50% em comparação com as células do controle (CC_{50}) foi determinada por análise de regressão usando o programa SPSS8. Dois ensaios foram realizados em quadruplicata. Células incubadas em meio livre dos extratos e AG foram consideradas como controle.

Para avaliar a viabilidade celular em células Vero tratadas com EME e EMV submetidas ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), células Vero a $1 \times 10^5/\text{mL}$ foram incubadas na presença de EME e EMV (1, 10 e $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. Após o tratamento, H_2O_2 foi adicionado à concentração de 2 mM durante 1 h de incubação e finalmente o meio de cultura foi removido para realização do ensaio do MTT aplicado como descrito acima. Dois ensaios independentes foram realizados em quadruplicata.

2.8 QUANTIFICAÇÃO DE ATP

Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Balb/c (1×10^6 /mL) foram tratados com AG (25 - 400 $\mu\text{g/mL}$) por 48 h. No final do período de tratamento, o meio foi removido e a quantificação dos níveis de ATP foi determinada pelo *kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi).

2.9 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA IN VITRO DOS EXTRATOS DE *L. ferrea* e AG EM *L. amazonensis* E *L. infantum*

Promastigotas (1×10^6 parasitas/mL) foram incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações de EME e EMV (6,25 - 200 $\mu\text{g/mL}$) e AG (3,13 - 100 $\mu\text{g/mL}$). A quantificação dos níveis de ATP foi determinada após 48 h de tratamento pelo *kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 570 nm em um leitor de placas (GloMax®-Multi). A concentração que inibiu o crescimento da cultura em 50% (IC_{50}) foi determinada após 48 h de tratamento por análise de regressão usando o software SPSS 18. Dois ensaios foram realizados em quadruplicata.

2.10 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), os parasitas tratados e não tratados foram fixados por 1 h a 4 °C em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído a 4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e aderidos em lamínulas recobertas com poli-L-lisina. Após lavagem no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas durante 1 h com 1% de tetróxido de ósmio a 0,8% de ferricianeto de potássio/5mM CaCl_2 em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Macrófagos peritoneais, cultivados em lamínulas de vidro, foram fixados e pós-fixados como descrito para promastigotas. Ambas as amostras de parasitas e de células de mamíferos foram lavadas no mesmo tampão usado na pós-fixação, desidratadas em etanol graduado, secas em ponto crítico em CO_2 , revestidas com uma camada de ouro de 20 nm de espessura e observadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância one-way (ANOVA) e teste de Turkey para determinar a significância estatística. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.9 PADRÕES ÉTICOS

Todos os experimentos envolvendo o uso de animais experimentais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e foram aprovados pelo comitê de ética (CEUA-FIOCRUZ 77/2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE QUÍMICA

Extratos e metabólitos secundários de plantas apresentam importantes atividades biológicas, como prevenção contra alopecia androgenética e no eflúvio telógeno, antioxidante, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária [16, 17, 18, 19]. Extratos de *L. ferrea* apresentam diversas atividades biológicas, no entanto, extratos metanólicos da entrecasca e vagem desta planta, sobretudo de espécimes encontradas na Caatinga (Pernambuco - Brasil), nunca foram avaliadas contra parasitas do gênero *Leishmania*, agente etiológico das leishmanioses. Uma triagem dos perfis fitoquímicos foi realizada através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Em relação à coloração após revelação e observação sob luz adequada foi evidenciada a presença de taninos hidrolisáveis, flavonóides, terpenos/esteroides, saponinas, e açúcares redutores conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 Análise fitoquímica dos extratos metanólicos da entrecasca (EME) e vagem (EMV) de *L. ferrea*.

Classe de Metabólitos	Extratos

	EME	EMV
Polifenóis (Taninos Hidrolisáveis)	+	+
Taninos condensados	-	-
Flavonoides	+	+
Derivados Cinâmicos	-	-
Terpenos e Esteroides	+	+
Cumarinas	-	-
Saponinas	+	+
Açúcares redutores	+	+
Alcaloides	-	-
Derivados antracênicos	-	-

Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Comandolli-Wyrepkowski et al., (2017) [20], em que a análise fitoquímica do extrato metanólico da vagem de *L. ferrea* foi positiva para compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos e saponinas.

Neste estudo, a identificação e quantificação de compostos presentes em EME e EMV foi analisada por HPLC. Os resultados experimentais indicaram que os principais constituintes dos dois extratos foram os compostos fenólicos ácido elágico (AE) e ácido gálico (AG). A tabela 3 apresenta os resultados das áreas e concentrações obtidas a partir da equação da reta dos padrões (ácido gálico, pureza 96%, onde $y = 1,1534x + 0,1667$, $R^2 = 0,9981$ e ácido elágico, pureza 96%, onde $y = 4,559x + 7,882$, $R^2 = 0,9990$).

Tabela 3 Valores de área e teor calculados em g% de ácido gálico e g% de ácido elágico.

Amostras	Área	g% de AG	Área	g% de AE
EME	4,349	0,1209	35,399	1,3045

EMV	23,861	0,6849	106,964	4,3316
-----	--------	--------	---------	--------

Devido à grande polaridade dos compostos, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com gradiente de eluição utilizando o sistema água/metanol. Com base no perfil cromatográfico os padrões AE e AG foram escolhidos como marcadores para EME e EMV e uma grande quantidade destes metabólitos secundários foi detectada (Tabela 3 e Figura 1).

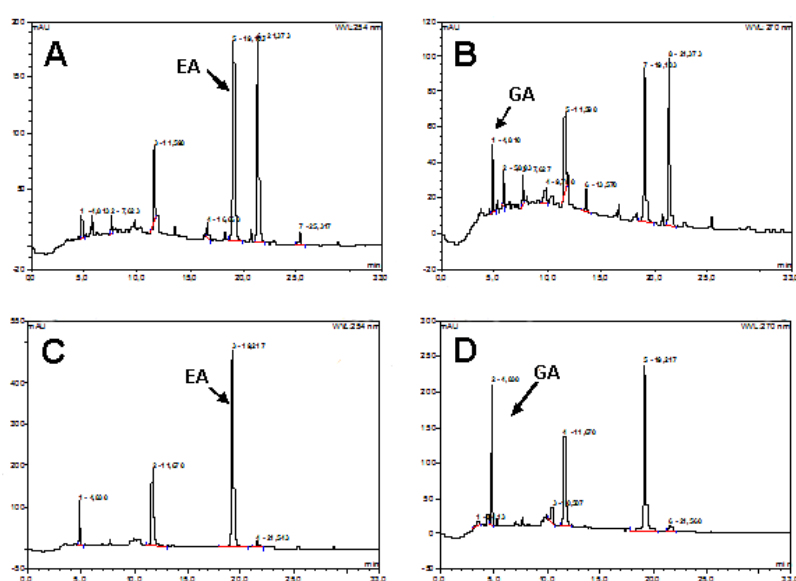


Figura 1 Cromatografia obtida para detecção do Ácido Elágico (EA) no comprimento de onda de 254 nm e Ácido Gálico (AG) a 270 nm em amostras de EME em A-B e EMV em C-D.

Taninos hidrolisáveis como galotaninos e elagitaninos são considerados os principais metabólitos secundários de extratos aquosos e orgânicos de *L. ferrea*, devido a suas propriedades biológicas e farmacológicas atribuídas a esta planta, assim como a estes metabólitos secundários [21, 22]. No presente estudo, os Ácido elágico e gálico foram detectados nos extratos, nos espectros de 254 e 270 nm respectivamente através dos devidos padrões. Em outro trabalho de nosso grupo de pesquisa identificamos, através da análise química por cromatografia líquida de alta eficiência de extratos aquosos da vagem de *L. ferrea* coletadas em Pernambuco, Ceará, Alagoas, Amazonas, Rio Grande do Norte, Goiás e

Mato Grosso do Sul (Brasil), a presença dos padrões AG e AE em grandes quantidades, com variações apenas nas porcentagens de áreas [21].

Fenois são amplamente avaliados quanto a suas atividades biológicas como cardioprotetora [23], preventiva contra doenças neurodegenerativas [24] e antiparasitárias [25]. Ácidos gálico e elágico são amplamente estudados e atividades como antitumoral, protetora contra o estresse oxidativo e recentemente antileishmania contra *Leishmania major* foram comprovadas [26]. Cerca de 20 espécies de *Leishmania* são responsáveis por causar as leishmanioses e os tratamentos atualmente realizados são potencialmente tóxicos, acarretando graves efeitos colaterais.

3.2 Citotoxicidade

Os EME, EMV e o padrão AG (um dos principais metabólitos secundários detectados nestes extratos) foram analisados quanto aos efeitos citotóxicos frente a macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (Tabela 4). O ácido elágico não foi utilizado devido aos seus efeitos citotóxicos em baixas concentrações comprovados em outro estudo [26] e a baixa solubilidade em água, Dimetilsulfóxido (DMSO) e Carboximetilcelulose (CMC).

Tabela. 4 Efeitos dos EME, EMV e AG em macrófagos e promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Tratamento	µg/mL				
	CC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IS pro. (<i>L. amazonensis</i>)	IS pro. (<i>L. infantum</i>)
	Macrófagos de Balb/c	Promastigotas <i>L. amazonensis</i>	Promastigotas <i>L. infantum</i>		
EME	> 500	79,21 ± 7,48	-	> 6,3	-
EMV	> 500	-	23,3 ± 5,8	-	> 21,5
AG	126 ± 36,8	8,95 ± 1,95	18,8 ± 5,1	14,19	14,19

IS= Índice de Seletividade; CC₅₀= concentração dos extratos e AG capaz de inibir a viabilidade celular em 50%; IC₅₀= Concentração dos extratos e AG capaz de inibir em 50% o crescimento de promastigotas.

O EME apresentou efeito citotóxico a partir da concentração de 500 µg/mL em macrófagos peritoneais, EMV não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. EME e EMV apresentaram CC₅₀ > 500 µg/mL em macrófagos pelo ensaio do MTT (Figura 2).

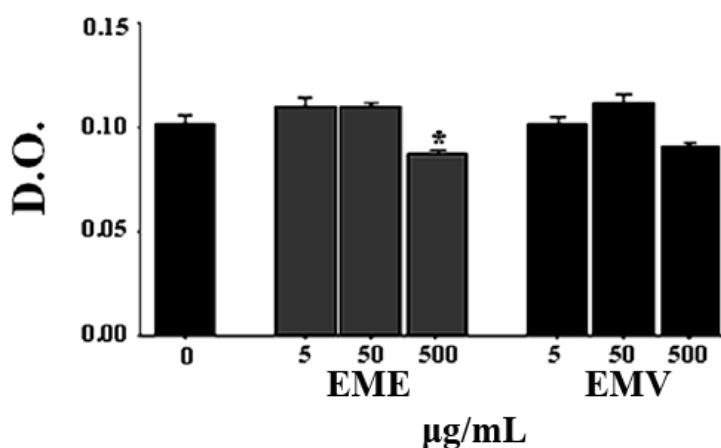


Figura 2 Efeitos citotóxicos dos EME e EMV contra macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Macrófagos foram incubados com EME e EMV por 48 h. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste do MTT. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (0).

No presente estudo, analisamos os efeitos citotóxicos de EME, EMV e do AG, um dos principais metabólitos secundários detectados nestes extratos frente a macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os EME e EMV apresentaram valores de CC₅₀ superiores a 500 µg/mL. Em outro trabalho, extratos de diferentes partes de *L. ferrea* com solventes orgânicos (metanol e hexano) apresentaram efeito citotóxico frente a macrófagos peritoneais a partir da concentração de 500 µg/mL [20].

Os efeitos citotóxicos induzidos pelo AG contra macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c estão representados na figura 3.

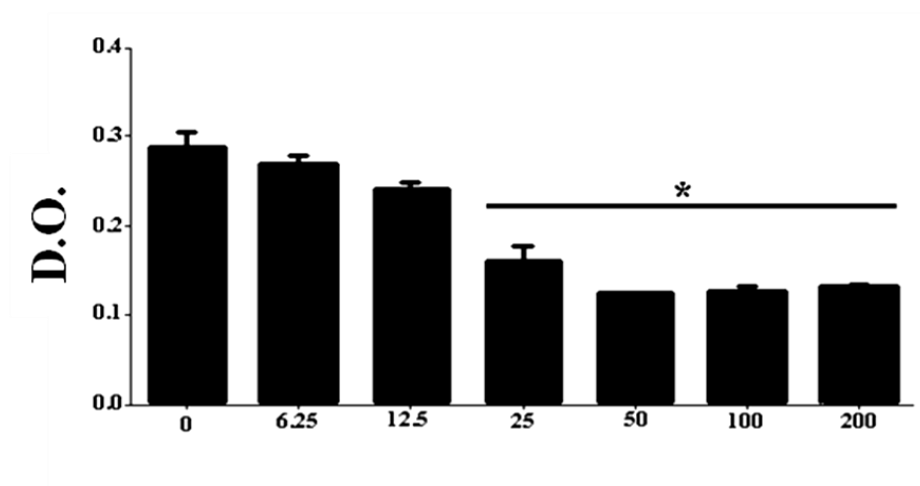


Figura 3 Efeitos citotóxicos do AG contra macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Macrófagos foram incubados com AG por 48 h. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste do sal de tetrazólio (MTT). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (0).

O valor da concentração citotóxica, capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (CC_{50}) foi $126 \pm 36,8$ $\mu\text{g/mL}$. Nossos resultados estão de acordo com Alves et al. (2017) [26] em que a CC_{50} para o mesmo tipo celular tratados com AG foi $126,6$ $\mu\text{g/mL}$ pelo ensaio do MTT.

Para analisar a viabilidade celular e confirmar os efeitos citotóxicos do AG em macrófagos peritoneais após 48 h de tratamento nas concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$, foi realizada a quantificação de ATP produzido por estas células. Baixos níveis de ATP foram detectados em todas as concentrações testadas (Figura 4).

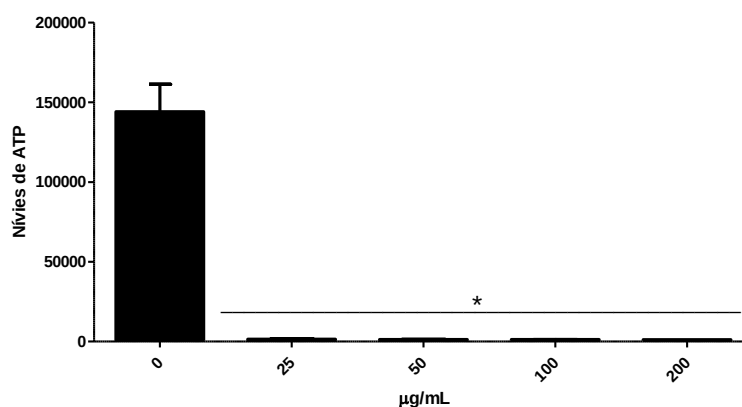


Figura 4 Efeitos do AG sobre a produção de ATP em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (a). Macrófagos foram incubados com AG por 48 h. A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (0).

A análise da viabilidade celular é realizada por diferentes ensaios, principalmente o teste de redução do sal tetrazolio (MTT) e quantificação luminogênica de ATP, devido sua rapidez e praticidade. Estes testes por vezes levam à divergência dos resultados. Em estudos realizados para análise da citotoxicidade de nanopartículas em células indicadoras de TZM-bl (HeLa), a comparação dos resultados dos ensaios de MTT, quantificação de ATP - CellTiterGlo e o ensaio WST-1 apontou o teste de quantificação de ATP - CellTiterGlo como ensaio de melhor correlação com os dados de contagem [27]. Nossos resultados de quantificação de ATP (Kit CellTiterGlo) indicam que o AG possivelmente induziu a uma redução drástica dos níveis de ATP em macrófagos em todas as concentrações testadas.

Para investigar os possíveis efeitos dos EME, EMV e do AG, sobre a morfologia de macrófagos peritoneais de Balb/c após 48 h de tratamento, foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura (Figura 5). Células do controle apresentaram morfologia alongada com presença de filopódios na superfície externa da membrana. Macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de EME (Figura 5B) e EMV (Figura 5C) não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas às células do controle. Células bem preservadas, com filopódios e lamelopódios evidentes foram observadas. Macrófagos submetidos ao tratamento com 3 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 6C e 6D) e 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 6E e 6F) de AG apresentaram modificações estruturais, quando comparados com o controle (Figuras 6A e 6B) como perda e retração dos filopódios e lamelopódios. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, o AG possivelmente induziu a modificações estruturais nos macrófagos, como aparecimento de estruturas arredondadas na superfície celular, desaparecimento e retração dos filopódios e lamelopódios (Figuras 6G e 6H). Em todas as concentrações testadas de AG foi observado o arredondamento celular.

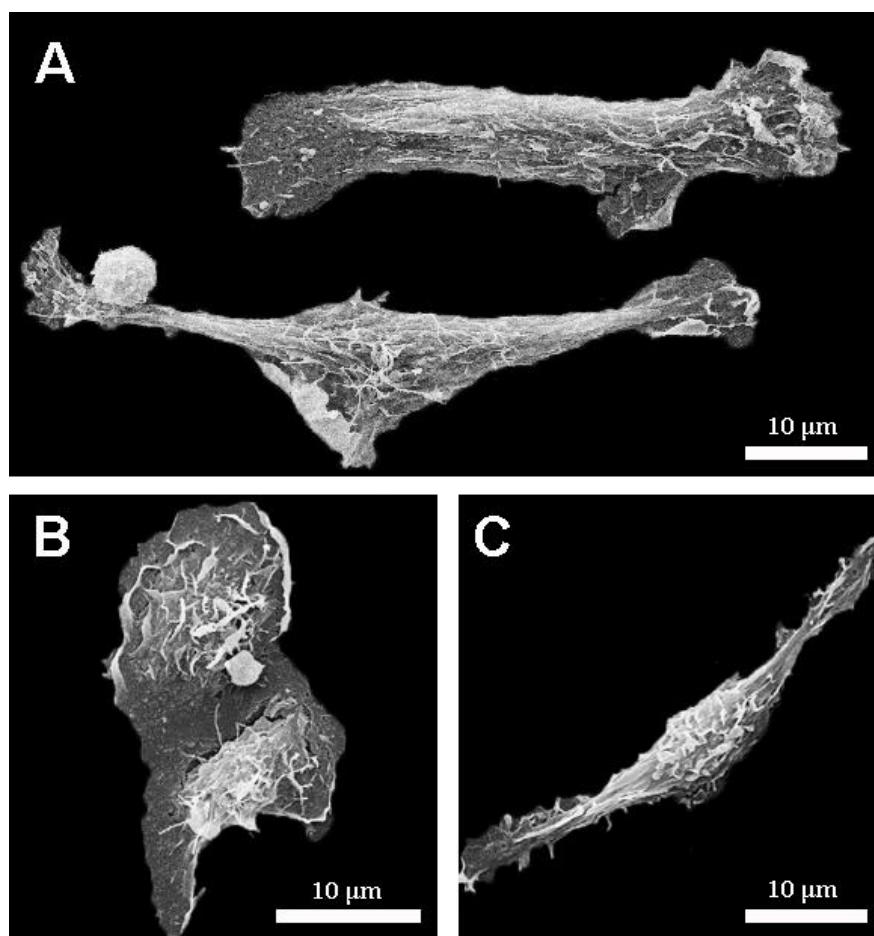


Figura 5 Efeito dos EME e EMV sobre a ultraestrutura de macrófagos. (A) Células do controle não tratadas apresentando morfologia plana e espalhada. Presença de filopódios e lamelopódios na superfície externa da membrana. (B) macrófagos tratados com 50 µg/mL de EME. Células planas e espalhadas com filopódios e lamelopódios em sua superfície. (C) Macrófagos tratados com 50 µg/mL de EMV. Células alongadas semelhantes as do controle.

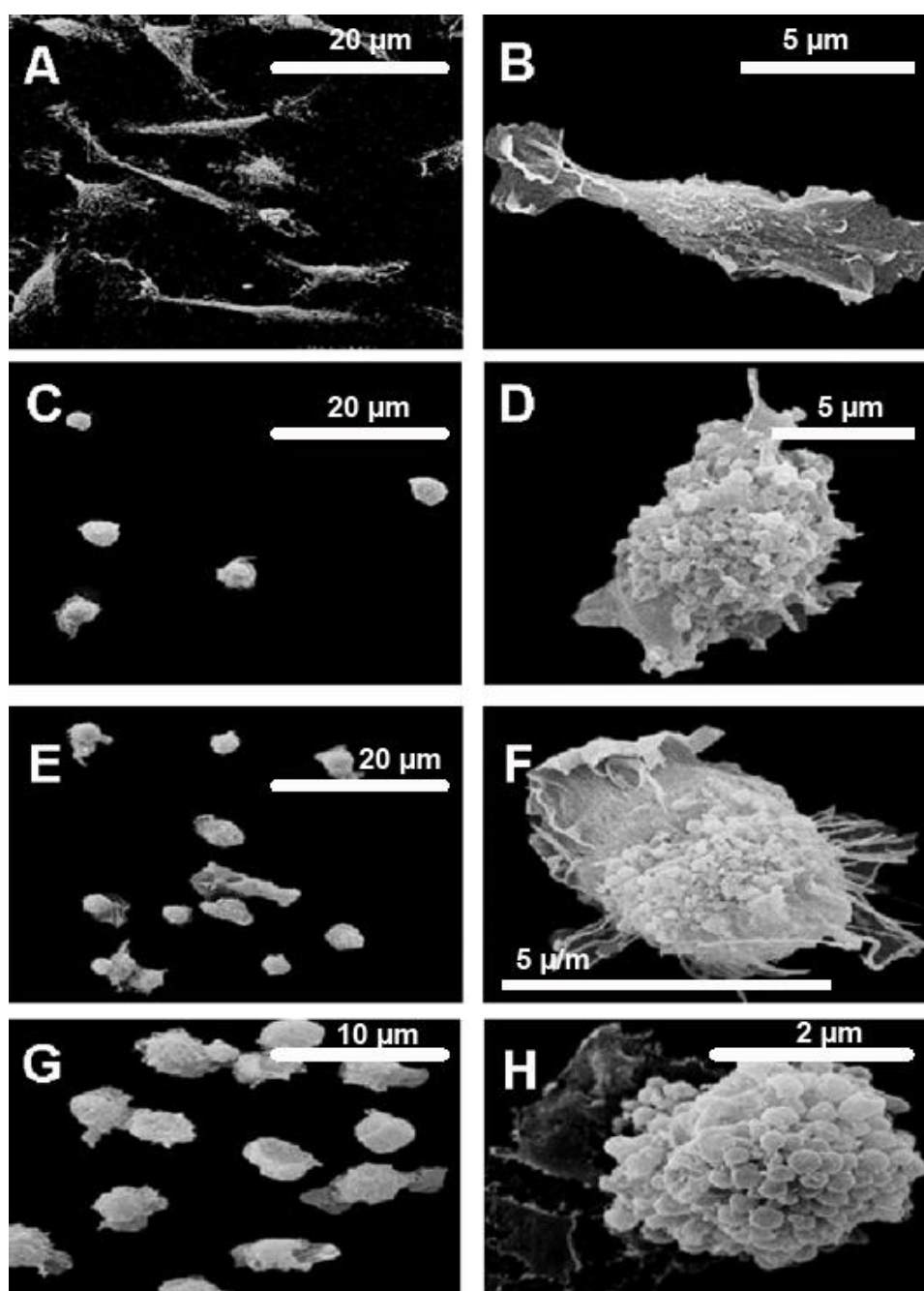


Figura 6 Efeitos do AG sobre a ultraestrutura de macrófagos. (A-B) Células do controle não tratadas apresentando morfologia plana e espalhada. Filopódios e lamelopódios são observados na superfície externa da membrana. (C-D) Macrófagos tratados com 3 µg/mL, e 25 µg/mL (E-F) de AG apresentando morfologia arredondada com encurtamento da célula, filopódios e lamelopódios, quando comparadas ao controle. (G-H) Macrófagos tratados com 50 µg/mL de AG apresentaram alterações semelhantes às descritas para os demais tratamentos. Observar em H o surgimento de estruturas arredondadas em todo o corpo celular.

O ácido gálico é amplamente estudado quanto a suas funções terapêuticas, como preventivo contra o câncer [22], antibacteriano, antioxidante e antiinflamatório e embora estudos recentes indiquem que o fenol induz efeitos citotóxicos em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c a partir da concentração de 50 µg/mL [26]. Nesta pesquisa, os efeitos citotóxicos do AG em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c foram observados a partir da concentração de 25 µg/mL. Tais efeitos são confirmados pelos baixos níveis de ATP e pelas alterações morfológicas significativas provocadas nas células. Mudanças na morfologia dos macrófagos foram observadas desde o tratamento com 3 µg/mL. A intensificação das alterações foram evidenciadas nos macrófagos tratados com 25 e 50 µg/mL. Segundo Alves et al. (2017) [26] a capacidade fagocítica, o volume lisossomal e a liberação de nitrito e cálcio intracelular [Ca^{2+}] em macrófagos foi mantida mesmo na concentração de 50 µg/mL de AG, revelando, portanto, o potencial imunomodulador mesmo em concentrações citotóxicas. Para os extratos, a análise por MEV não identificou alteração na morfologia dos macrófagos tratados na concentração de 50 µg/mL.

Os macrófagos estão localizados em todos os tecidos do corpo e são diretamente envolvidos na resposta imunológica, atuando de forma sequencial e coordenada para a resolução da inflamação, reparação tecidual e remoção de patógenos [28]. Macrófagos teciduais originam-se de monócitos circulantes do sangue ou se estabelecem nos tecidos desde a origem embrionária, desenvolvendo funções especializadas em cada órgão [29].

Macrófagos, originados a partir de monócitos, desempenham um papel fundamental na fagocitose de detritos celulares e patógenos, existindo uma correlação entre a morfologia do macrófago e suas propriedades de superfície, sobretudo as propriedades inflamatórias. Desta forma, o estado de ativação dos macrófagos aderentes, com a liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral ($\text{TNF}\alpha$), está diretamente relacionado com a morfologia da célula. Estas células apresentam normalmente morfologia amebóide, com extensões lamelopoidais, forma hemisférica, ou arredondada, a depender da superfície em que estão aderidas [30].

Os macrófagos constituem as principais células alvo nas infecções causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, que alteram a cascata de sinalização do hospedeiro, evitando os mecanismos básicos de defesa, como mudanças na expressão da família de proteínas G (GTPases), que estão diretamente ligadas a regulação dos mecanismos de proliferação e sobrevivência da célula, apoptose e transporte intracelular [31]. Os macrófagos apresentam flexibilidade na mudança de forma, alterando assim o seu fenótipo em adaptação a mudanças

no ambiente [32]. Possivelmente a presença do AG induziu a queda dos níveis de ATP e modificação da morfologia dos macrófagos, porém estas células permaneceram em atividade.

Como os EME e EMV apresentaram melhores resultados na preservação da viabilidade e integridade celular, tanto para o ensaio de MTT quanto para a análise da morfologia em microscopia eletrônica de varredura em relação ao AG, os efeitos dos EME e EMV foram também avaliados em células Vero (Figura 7).

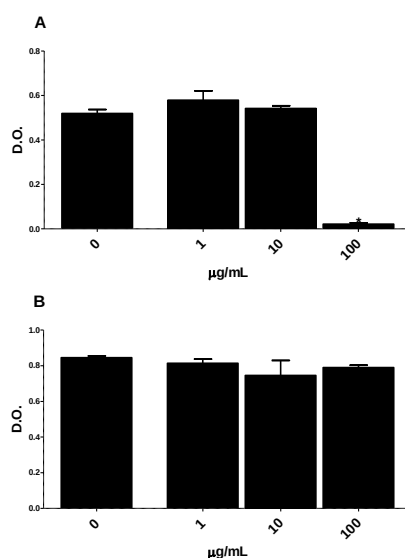


Figura 7 Efeitos citotóxicos dos EME (A) e EMV (B) em células Vero. As células foram incubadas com EME e EMV por 24 h. A viabilidade das células foi avaliada pelo teste do sal de tetrazólio (MTT). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (0).

Células Vero tratadas com 1 µg/mL e 10 µg/mL de EME não apresentaram redução da viabilidade celular, no entanto o tratamento com 100 µg/mL causou redução significativa da viabilidade (Figura 7A). O tratamento com 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL de EMV não induziu a qualquer alteração na viabilidade celular pelo ensaio do MTT (Figura 7B).

Para identificar se os extratos apresentam potencial protetor contra o estresse oxidativo provocado por H₂O₂, células tratadas com EME e EMV durante 24 h foram expostas por uma hora ao H₂O₂ na concentração de 2 mM. Os resultados estão representados na figura 8.

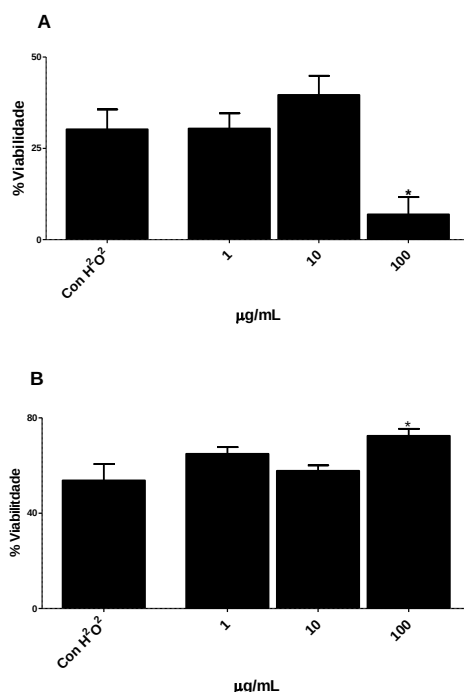


Figura 8 Efeitos citotóxicos do H₂O₂ sobre a viabilidade de células Vero após 1 h de incubação. Células Vero foram incubadas previamente com EME (A) e EMV (B) por 24 h e posteriormente incubadas com H₂O₂ por 1 h. A viabilidade das células foi avaliada pelo teste do sal de tetrazólio (MTT). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (H₂O₂).

Através da Figura 8A é possível verificar que não houve alteração significativa na viabilidade das células tratadas com 1 e 10 µg/mL de EME quando expostas ao estresse oxidativo causado por H₂O₂, porém o mesmo não ocorreu com as células tratadas com 100 µg/mL de EME. Como nesta concentração, o extrato apresentou efeito citotóxico sobre células Vero (Figura 7A), possivelmente, a redução da viabilidade se deve a toxicidade do próprio extrato, somada aos efeitos citotóxicos do H₂O₂. Contudo, quando as células foram tratadas com 100 µg/mL de EMV sob as mesmas condições, a viabilidade celular foi preservada de forma significativa, quando comparadas às células tratadas apenas com H₂O₂ (Figura 8B), corroborando com os resultados obtidos com as células vero (Figura 7B).

Importantes atividades biológicas já foram reportadas pela utilização de extratos e frações da vagem de *L. ferrea*. A propriedade antioxidante e efeitos quimioprotetores foram atribuídos aos extratos brutos da vagem [11]. Segundo Da Silva (2011) [33] o extrato hidroalcoólico da vagem de *L. ferrea*, além de exercer potencial atividade antioxidante de

21,08% de captura frente ao fosfomolibidênio, apresentou alta capacidade de inibição contra espécies reativas (radicais superóxidos, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) e efeito protetor ao DNA submetido a danos por radicais hidroxila. Tais efeitos estão diretamente relacionados ao conteúdo fenólico dos extratos.

Os tratamentos contra as infecções causadas por parasitas do gênero *Leishmania* induzem elevada toxicidade. O antimoniato de meglumina - Glucantime, além de induzir a danos oxidativos contra lipídeos e proteínas, provoca danos ao DNA devido ao estresse oxidativo, portanto estudos têm sido direcionados para a descoberta de drogas que, em associação com o antimoniato de meglumina, reduza os efeitos oxidativos [34]. Macrófagos infectados por parasitas como *Leishmanias* podem ter os níveis de radicais livres aumentados, para o combate a infecção [35]. Portanto, torna-se imprescindível a busca por novos tratamentos contra as leishmanioses que, além do combate à infecção, exerçam o efeito protetor em células de mamíferos contra o estresse oxidativo.

3.4 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE *L. FERREA* E ÁCIDO GÁLICO CONTRA *L. amazonensis* E *L. infantum*

L. ferrea é relatada na literatura por suas diversas aplicações biológicas, dentre elas recentemente foi investigada a atividade antileishmania frente a *L. amazonensis*. O extrato metanólico da vagem de *L. ferrea* inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* - Cepa MHO/BR/2006/IM5584, com IC₅₀ de 15,4 µg/mL. O mesmo extrato não foi efetivo contra *L. guyanensis* [20].

Em nossos estudos os extratos metanólicos da entrecasca e vagem de *L. ferrea* apresentaram atividade contra promastigotas *L. amazonensis* e *L. infantum*, com baixos valores de IC₅₀. Ambos os extratos foram ativos contra os parasitas, porém EME apresentou efeito antileishmania apenas para *L. amazonensis* - Cepa LTB0016 com IC₅₀ de 79,21 ± 7,48, não sendo efetivo contra *L. infantum*, enquanto que EMV foi efetivo contra *L. infantum* com IC₅₀ 23,3 ± 5,8, não sendo efetivo contra *L. amazonensis*, conforme está representado na tabela 4. Nossos resultados divergem dos de Comandolli-Wyrepkowski et al. (2017) [20], possivelmente devido as diferentes Cepas de *L. amazonensis* utilizadas, bem como o local de origem da espécime de *L. ferrea* utilizada. Na presente pesquisa vagem e entrecasca de *L. ferrea* foram coletadas no Vale do Catimbau - Pernambuco, já as utilizadas por Comandolli-

Wyrepkowski et al. [20] foram coletadas em Manaus - Amazonas. De acordo com Ferreira et al. (2015) [21] extratos brutos da vagem de *L. ferrea* coletadas de diferentes locais do Brasil apresentaram variações quantitativas nos conteúdos fenólicos, sobretudo dos ácidos gálico e elágico.

Neste estudo, apenas EME foi efetivo contra *L. amazonensis*, em contrapartida EMV apresentou efeito inibitória apenas contra *L. infantum*. Esta divergência pode estar relacionada às variações de forma e função entre as espécies de *Leishmania*, que se adaptam ao hospedeiro e o vetor [36].

Em ambos os extratos foi detectada a presença dos compostos fenólicos: ácido gálico e ácido elágico. Estes metabólitos secundários apresentam atividade antiinflamatória, anticâncer e protetora contra o estresse oxidativo. Além destes metabólitos secundários, a presença de paufferol-A, um composto derivado de chalconas, presente na casca do caule de *L. ferrea*, pode estar diretamente ligada à inibição contra *L. amazonensis* tratadas com o EME, uma vez que já foi relatada a ação inibitória deste extrato sobre a DNA topoisomerase II, resultando em apoptose em células leucêmicas [37, 38].

Recentemente, foi investigada a atividade dos ácidos gálico e elágico contra *Leishmania major*. Ambos apresentaram atividade contra a forma promastigota do parasita, com valores de IC₅₀ de 16,4 µg/mL para ácido gálico e 9,8 µg/mL para ácido elágico [26]. No presente estudo, o ácido gálico foi testado contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. AG foi efetivo contra *L. amazonensis* com IC₅₀ de 9,95 µg/mL e de 18,8 µg/mL para *L. infantum* (tabela 4). Os valores de IC₅₀ dos extratos para as duas espécies de *Leishmania*, sobretudo para a *L. infantum*, não diferiram muito quando comparadas aos valores de IC₅₀ dos parasitas tratados apenas com o AG, sugerindo que outros compostos do extrato estão envolvidos na inibição da viabilidade do parasita, de forma aditiva ou sinérgica com o AG.

O AG foi efetivo contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* e os efeitos causados na morfologia das células são apresentados nas figuras 9 e 10.

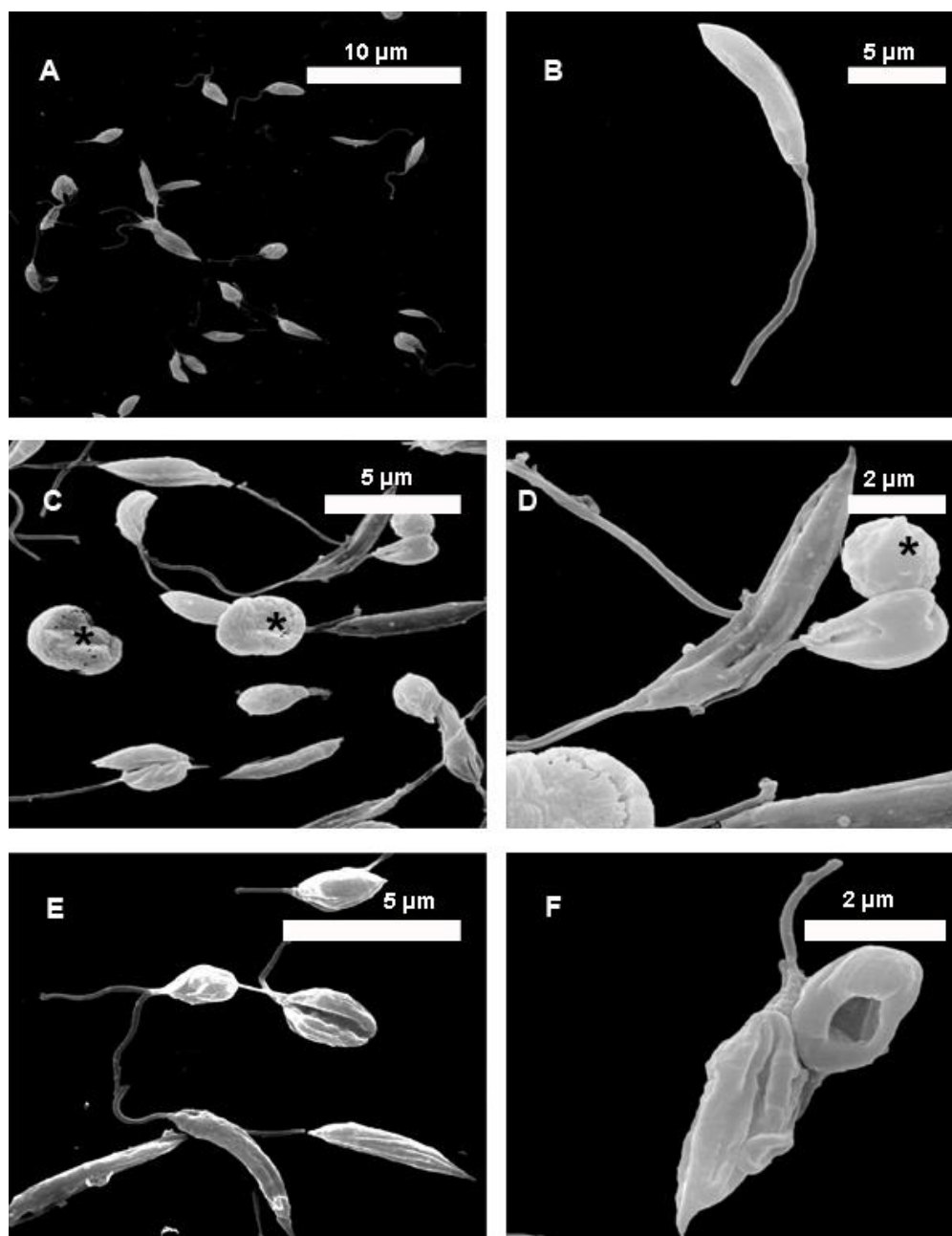


Figura 9 Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com AG. (A-B) Aspecto geral de uma promastigota de controle mostrando uma superfície celular lisa e alongada. (C-D) Culturas de promastigotas tratadas com IC₅₀ e (E-F) 2x IC₅₀ de AG. (C, D e E) células com morfologia arredondada (*) com divisão incompleta (E). Detalhe de células alteradas drasticamente, com perfuração (F).

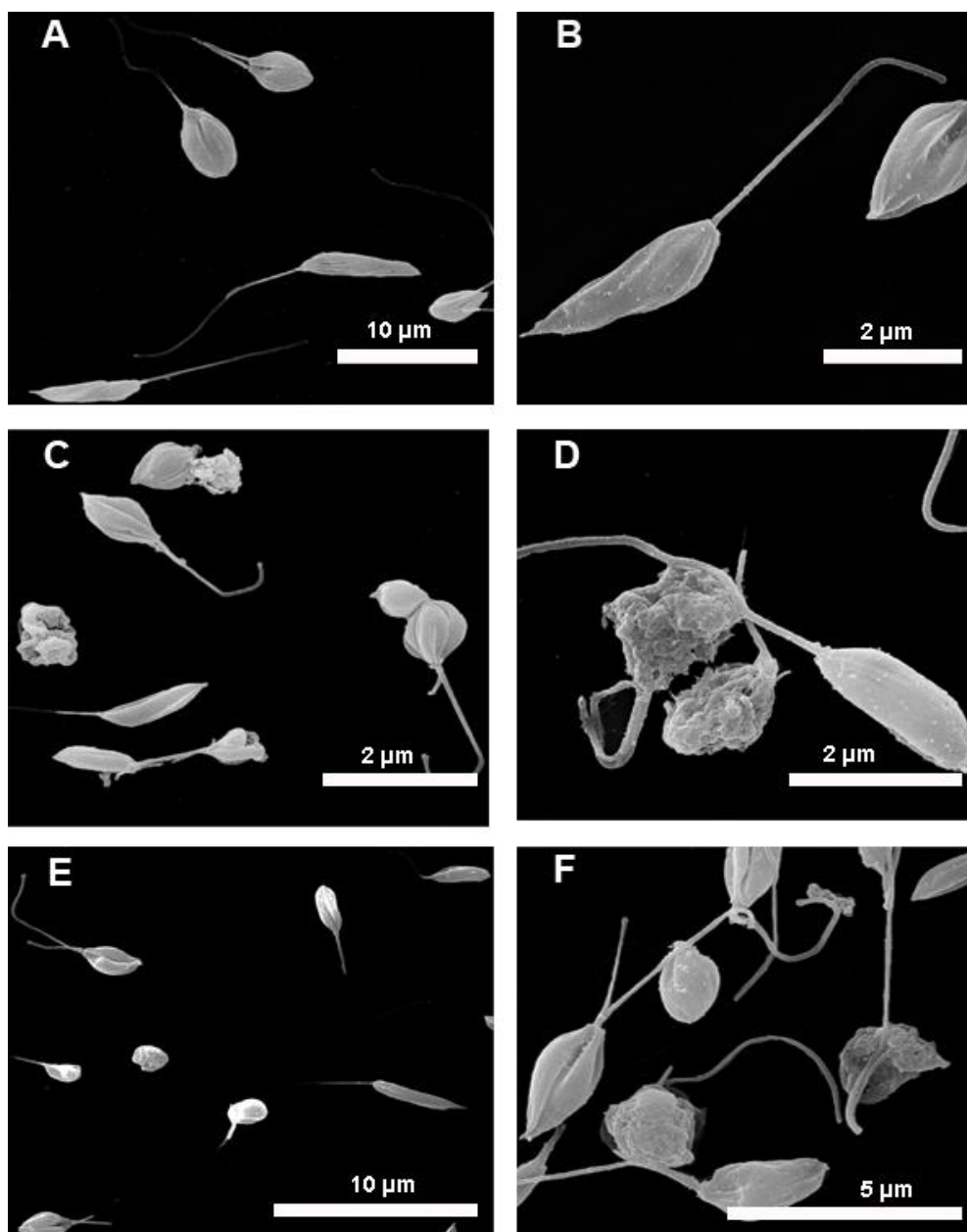


Figura 10 Microscopia eletrônica de varredura de promastigotas de *Leishmania infantum* tratada com AG. (A-B) Aspecto geral de promastigota do controle mostrando uma superfície celular lisa e alongada. Culturas de promastigotas tratadas com IC₅₀ (C-D). Células com morfologia drasticamente alterada, com membrana enrugada. (E-F) 2x IC₅₀ AG. (E) células com morfologia arredondada.

A microscopia eletrônica constitui uma importante ferramenta para análise da eficácia de drogas e mudanças ultraestruturais nos parasita, auxiliando na investigação de alvos para a descoberta de novas ações terapêuticas [39]. Análises por MEV revelaram que promastigotas

de *L. amazonensis* e *L. infantum* se tornaram arredondadas em resposta ao tratamento com AG, indicando mudanças na organização do citoesqueleto [40]. Perda de material citoplasmático e enrugamento da membrana constituem alterações compatíveis com a perda de viabilidade celular. Em ambas as espécies tratadas com AG foram observadas células com divisão incompleta, sugerindo um efeito citostático deste metabólito secundário. Compostos naturais, especialmente metabólitos secundários, como fenóis são relatados por causarem alterações ultraestruturais capazes de levarem a perda de viabilidade celular em parasitas [41].

Extratos metanólicos da entrecasca e vagem de *L. ferrea* e AG apresentaram seletividade para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, sendo EMV o extrato mais seletivo (IS=21,5). Segundo um manual de treinamento para triagem em doenças negligenciadas, um composto ou molécula com IS > 10 é considerado como uma droga promissora para rastreamento secundário adicional contra as leishmanioses [42].

Conclusões

Os extratos metanólicos da entrecasca e vagem (EME e EMV) de *L. ferrea* não afetaram a viabilidade de macrófagos peritoneais. O AG induziu efeitos citotóxicos em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c a partir da concentração de 25 µg/mL. Além disso, EMV foi capaz de preservar a viabilidade em células Vero submetidas ao estresse oxidativo. Finalmente EME, EMV e AG se apresentam como agentes promissores contra *L. amazonensis* e *L. infantum*, uma vez que foram efetivos para inibir o crescimento de suas formas promastigotas.

Agradecimentos

Carina Helena-Silva agradece a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de Doutorado. Os autores Regina B. C. Q. Figueiredo, Maria T. S. Correia, Maria G. Carneiro-da-Cunha expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa e apoio financeiro. Os autores também agradecem ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz pelo suporte analítico.

REFERÊNCIAS

- [1] Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. PLoS One 2012; 7. Doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- [2] Matéria G, Torti C, Mazzitelli M, et al. Depression of lymphocyte activity during cutaneous leishmaniasis: a case report. Diagn Microbiol Infect Dis 2018; 30: 182-200. Doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.025.
- [3] Diro E, Lynen G, Gebregziabher B, Clinical aspects of paediatric visceral leishmaniasis in North-west Ethiopia. Trop Med Int Health 2015; 20: 8-16. doi: 10.1111/tmi.12407.
- [4] World Health Organization. Weekly epidemiological record, 22 SEPTEMBER 2017, 92th YEAR/22 SEPTEMBRE 2017, 92e ANNÉE No 38, 2017, 92, 557–572 <http://www.who.int/wer>.
- [5] Monge-Maillo B, López-Vélez R. Treatment of Visceral Leishmaniasis. In: Bruschi F., Gradoni L. (eds) The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. Springer 2018: 169 - 190. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_8.
- [6] Gonçalves SVCB, Costa CHN. Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: an efficacy and safety study. Um Bras Dermatol 2018; 93: 347-355. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20186415.
- [7] Srivastava S.; Mishra J, Gupta AK, Singh A, Shankar P. Singh, S. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. Parasit Vectors 2017; 10. Doi: 10.1186/s13071-017-1969-z, 2017.
- [8] Vieira PB, Silva NL, Da Silva GN. Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. Caatinga plants 2016; 26: 2229-36. Doi: 10.1016/j.bmcl.2016.03.061.
- [9] Santana JAS, Ferreira, LS, Coelho, RRP, Vieira, FA, Pacheco, M.V. Tecnologias de baixo custo para superação de dormência em sementes de *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* Mart. ex. Tul. (pau-ferro). Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável 2011; 6: 225-229, 2011.

- [10] Ferreira MRA, Soares, LAL, *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. Academic Journals 2015; 9: 140-150.
- [11] Guerra ACVA, Soares LAL, Ferreira MRA, et al. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. Farmacêutico Biomed 2017; 92: 696-706. Doi: 10.1016 / j.biopha.2017.05.123.
- [12] Martins M, Kluczkowski AM, De Souza TP, Pacheco C, Savi GD, Scussel VM. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by guaraná (*Paullinia cupana Kunth*) and jucá (*Libidibia ferrea Mart*) extracts. Afr J Biotechnol 2014; 13:131-137. Doi: 10.5897/AJB2013.13444.
- [13] Barros AL, Souza RS, Aranha ESP, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. Int J Pharm Pharm Sci 2014; 6: 71-76.
- [14] Ferreira JVA, Lima LF, Figueredo FG. Evaluación de la actividad antimicrobiana y modulatória del extracto etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. Rev Cubana Plant Med 2016; 21.
- [15] Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods 1983; 65: 55-63.
- [16] Tsivileva O, Pankratov Um, Misin V, et al. Antioxidant Properties of the Artist's Conk Medicinal Mushroom, *Ganoderma applanatum* (Agaricomycetes), upon Cultivation with para-Substituted Phenolic Compounds and Tea Leaf Extracts. Int J Med Mushrooms 2018; 20: 549-560. doi: 10.1615 / IntJMedMushrooms.2018026329.
- [17] Zuzana B, Frantisek K, Greifova M, et al. Antibacterial and antifungal activity of phytosterols and methyl dehydroabietate of Norway spruce bark extracts. J Biotechnol 2018; 30: 30517-0. doi: 10.1016 / j.jbiotec.2018.06.340.
- [19] Metwally DM, Al-Olayan EM, Alanazi M, Alzahrany SB, Semlali A. Antischistosomal and anti-inflammatory activity of garlic and allicin compared with that of praziquantel in vivo. BMC Complement Altern Med 2018; 18. Doi: 10.1186/s12906-018-2191-z.

- [20] Comandolli-Wyrepkowski CD, Jensen BB, Grafova I. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. *Acta Amaz* 2017; 47. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201700871>.
- [21] Ferreira MRA, Fernandes MTM, Silva WAV, et al. Chromatographic and spectrophotometric analysis of phenolic compounds from fruits of *Libidibia ferrea* Martius. *Pharmacognosy Magazine* 2016; 12: 285-291. Doi: 10.4103/0973-1296.182165.
- [22] Nakamura ES, Kurosaki, F, Arisawa M, et.al. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. *J Ethnopharmacol* 2002; 81: 135-137, 2002.
- [23] Pedret A , Fernández-Castillejo S, Valls RM, et al. Cardiovascular Benefits of Phenol-Enriched Virgin Olive Oils: New Insights from the Virgin Olive Oil and HDL Functionality (VOHF) Study. *Mol Nutr Food Res* 2018 e1800456. doi: 10.1002 / mnfr.201800456.
- [24] Rosado-Ramos R, Pereira JG, Figueira I, Jardim C, Garcia G, Menezes R. Exploring the benefits of cellular models to uncover bioactive polyphenols for neurodegeneration. *Curr Pharm Des.* 2018. Doi: 10.2174/1381612824666180629112148.
- [25] Kalmobé J, Ndjonga D, Boursou D, Vildina JD, Liebau E. Phytochemical analysis and in vitro anthelmintic activity of *Lophira lanceolata* (Ochnaceae) on the bovine parasite *Onchocerca ochengi* and on drug resistant strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Complemento BMC Altern Med* 2017; 17. Doi: 10.1186 / s12906-017-1904-z.
- [26] Alves MMM, Brito, LM, Souza AC, et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2017; 390: 893-903. Doi: 10.1007/s00210-017-1387-y.
- [27] Braun K, Stürzel CM, Biskupek J, Kaiser U, Kirchhoff F, Lindén M. Comparison of different cytotoxicity assays for in vitro evaluation of mesoporous silica nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 2018; 52: 214-221. Doi: 10.1016/j.tiv.2018.06.019.
- [28] Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf)* 2017; 4: 39 - 53. Doi 10.1002/reg2.77.

- [29] Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 2014; 41: 21 - 35. Doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013
- [30] Lee H, Stachelek SJ, Tomczyk N, Finley MJ, Composto RJ, Eckmann DM. Correlating macrophage morphology and cytokine production resulting from biomaterial contact. *J Biomed Mater Res A* 2013; 2013: 203 - 212. doi: 10.1002/jbm.a.34309.
- [31] Husein A, Jamal A, Ahmed MZ, et al. esfregar um. *Leishmania donovani* infection differentially regulates small G-proteins. *J Cell Biochem* 2018. doi: 10.1002/jcb.27186.
- [32] Kikuchi K, Iida M, Ikeda N, et al. Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation. *J Immunol* 2018. doi: 10.4049/jimmunol.1800040.
- [33] Da Silva LC, Da Silva CA Jr., De Souza RM, Macedo AJ, Da Silva MV, Correia MTS. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 2222-8. Doi: 10.1016 / j.fct.2011.06.019.
- [34] De Jesus LCL, Soares RP, Moreira VR, Pontes R, Castelo-Branco PV, Pereira SRF. Genistein and Ascorbic Acid reduce oxidative stress-derived DNA damage induced by antileishmanial meglumine antimoniate 2018 doi: 10.1128 / AAC.00456-18.
- [35] Cadet J, KJA, D. Oxidative DNA damage & repair: an introduction. *Free Radic Biol Med* 2017; 107: 2-12. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.030.
- [36] Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Abra Biol.* Setembro de 2017; 7. doi: 10.1098 / rsob.170165.
- [37] Nozaki H, Hayashi K, Kido M, et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters* 2007; 48: 8290-8292. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.130>
- [38] Drozino RN, Zulin MJP, Casagrande L, Pereira AV. Breve revisão: bioativos de *libidibia ferrea* e suas ações em odontologia. *Arquivos do MUDI* 2017; 21: 39-47, 2017.

- [39] Moraes LS, Donza MR, Rodrigues AP, et al. Leishmanicidal Activity of (+)-Phyllanthidine and the Phytochemical Profile of *Margaritaria nobilis* (Phyllanthaceae). *Moléculas* 2015; 20: 22157-69. doi: 10.3390 / molecules201219829.
- [40] Verçozza BRF, Godinho JLP, De Macedo-Silva ST, Huber K, Bracher F, De Souza W, Rodrigues JCF. KH-TFMDI, a novel sirtuin inhibitor, alters the cytoskeleton and mitochondrial metabolism promoting cell death in *Leishmania amazonensis*. *Apoptosis* 2017; 22: 1169-1188. Doi: 10.1007 / s10495-017-1397-8.
- [41] Ramírez-Macías I, Marín C, Chahboun R. In vitro evaluation of new terpenoid derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2012; 107. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074 02762012000300012>.
- [42] Brun R, Wenzler T., Kaiser M, Yardley V, Ioset J, The Pan-Asian Screening Network-Drug Screening for Kinetoplastids Diseases A Training Manual for Screening in Neglected Diseases. by, Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), (2009).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que:

- A lectina de *Cratylia mollis* não apresentou efeitos citotóxicos em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c, não afetando a viabilidade destas células. Cramol 1,4 mostrou-se efetiva em inibir o crescimento e a viabilidade de promastigotas, bem como em causar redução na sobrevivência de amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum*.
- Os extratos metanólicos da entrecasca e vagem (EME e EMV) de *L. ferrea* não afetaram a viabilidade de macrófagos peritoneais. O AG induziu efeitos citotóxicos em macrófagos peritoneais de camundongo Balb/c a partir da concentração de 25 µg/mL. Além disso, EMV foi capaz de preservar a viabilidade em células Vero submetidas ao estresse oxidativo. EME, EMV e AG foram efetivos para inibir o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Finalmente, a Cramoll 1,4, EME, EMV e AG se apresentam como agentes promissores contra *L. amazonensis* e *L. infantum*.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, P.B.S., Soares, P.A.G., Aragão-Neto, A.C., Albuquerque, G.S., Silva, L.C.N., Lima-Ribeiro, M.H.M., et al., 2017. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Int J BiolMacromol.* 102, 749-757. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.064.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Berna, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano J., Jannin J., Boer M., 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE.* 7. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Andrade, A.F., Saraiva, E.M., 1999. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 85. 576-581.
- Andrews, K.T., Fisher, G., Skinner-Adams, T.S. 2014. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 4, 95-111. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.02.002.
- Antinarelli, L.M.R., Pinto, N.C., Scio, E., Coimbra, E.S. 2015. Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 87. doi:10.1590/0001-3765201520140288.
- Brun, R., Wenzler, T., Kaiser, M., Yardley, V., Ioset, J. 2009. The Pan-Asian Screening Network- Drug Screening for Kinetoplastids Diseases A Training Manual for Screening in Neglected Diseases. by, Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi).
- Cardoso, V.S., Vermelho, A.B., Ricci Junior, E., Rodrigues, I.A., Mazotto, A.M., Supuran, C.T. 2018. Antileishmanial activity of sulphonamidenanoemulsions targeting the β -carbonic anhydrase from *Leishmania* species. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 33, 850-857, doi:10.1080/14756366.2018.1463221.
- Castillo, E., Dea-Ayuela, M.A., Bolás-Fernández, F., Rangel, M., González-Rosende, M.E. 2010. The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. *CurrMedChem.* 17, 4027-4051.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.S., Lima, V.L.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., et al. 2017. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017, doi: 10.1155/2017/1594074.
- Coriolano, M.C., Santana, J.B., Patriota, L.L.S., Soares, A.K.A., Lorena, V.M.B., Paiva, P.M.G., et al. 2018. Immunomodulatory Effects of the Water-soluble Lectin from *Moringa*

oleifera Seeds (WSMoL) on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). *Proteína PeptLett.* 25, 295-301. doi: 10.2174/0929866525666180130141736.

Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B. 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 261-273. doi: 0273-2289/195/5503--0261506.40.

Da Silva, G.A.R., Eyer-Silva, W.A., Magalhães, M.C., Fernando, F.R.A., J.F.C. Pinto, J.F.C., Azevedo, M.C.V.M. et al. 2017. A novel case of human visceral leishmaniasis from the urban area of the city of Rio de Janeiro: autochthonous or imported from Spain?. *Rev. Inst. Med. trop. S.* 59. doi: 10.1590/S1678-9946201759011.

Da Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., De Castro, M.C.A.B., Pereira, V.R.A., Da Paz, N.V., Coelho, L.C.B.B., et al. 2015. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *Int J BiolMacromol.* 72, 848-54. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.045.a

Da Silva, L.C.N., Alves, N.M.P., De Castro, M.C.A.B., HIGINO, T.M.M., Da Cunha, C.R.A., Pereira, V.R.A., et al. 2015. pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *OxidMedCell Longev.* 2015. doi: 10.1155/2015/520872b.b

De Medeiros, M.L.S., De Moura, M.C., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Bezerra, A.C.D.S., et al. 2018. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringaoleifera*, *Int J Biol Macromol.* 108, 782-789. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.167.

Dutra, F.L., Oliveira, M.M., Santos, R.S., Silva, W.S., Alviano, D.S., Vieira, D.P., et al. 2016. Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum chagasi* within macrophages. *Acta Tropica.* 164, 69-76, doi: 10.1016/j.actatropica.2016.08.026.

Fernandes, M.P., Leite, A.C., Araújo, F.F., Saad, S.T., Baratti, M.O., Correia, M.T., et al. 2014. The *Cratylia mollis* seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine a-insensitive permeability transition in *Trypanosoma cruzi* mitochondria. *J Eukaryot Microbiol.* 61, 381-388. doi: 10.1111/jeu.12118.

Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M.R., Araújo, F.F.B., Meirelles, F.V., Correia, M.T.S., et al. 2010. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioenerg Biomembr.* 42, 68-78, doi: 10.1007/s10863-010-9268-9.

Heinrich, F., Lehmecker, A., Raddatz, B.B., kegler, K., Tipold, A., Stein, V.M., et al. 2017. Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages *in vitro*. *PLoS ONE* 12 e0183572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183572>. doi: 10.1371/journal.pone.0183572.

Iordache, F., Ionita, M., Mitrea, L.I., Fafaneata, C., Pop, A. 2015. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. *Curr Pharm Biotechnol.* 16, 152-61.

Kaltner, H., Caballero, G.G., Ludwig, A.K., Manning, J.C., Gabius, H.J. 2018. From glycophenotyping by (plant) lectin histochemistry to defining functionality of glycans by pairing with endogenous lectins, *Histochem Cell Biol.* 149, 547-568, doi: 10.1007/s00418-018-1676-7.

Li, G., Cheng, J., Mei, S., Wu, T., Ye, T. 2018. *Tachypleus tridentatus* Lectin Enhances Oncolytic Vaccinia Virus Replication to Suppress In Vivo Hepatocellular Carcinoma Growth. *Mar Drugs.* 16, doi: 10.3390/md16060200.

Maciel, E.V., Araújo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C., Correia, M.T. 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32, 57-60. doi: 10.1016 / j.biologicals.2003.12.001.

Melo, C.M.L., Lima, A.L.R., Beltrão, E.I.C., Cavalcanti, C.C.B., Melo-Júnior, M.R., Montenegro, S.M.L., et al. 2011. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*, *Acta Trop.* 118, 152-8, doi: 10.1016/j.actatropica.2011.01.008.

Mohapatra., S. 2014. Drug Resistance in Leishmaniasis: Newer Developments. *Trop Parasitol.* 4, 4-9. doi: 10.4103/2229-5070.129142.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65, 55-63.

Muniz-Junqueira, M.I., Silva, F.O., de Paula Júnior, M.R., Tosta, C.E. 2005. Thalidomide influences the function of macrophages and increases the survival of *Plasmodium berghei*-infected CBA mice. *Acta Trop.* 94, 128-138. doi:10.1016/j.actatropica.2005.03.002.

Podinovskaia, M., Descoteaux, A. 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Medicine.* doi: 10.2217/fmb.14.103.

Sales, V.S., Monteiro, Á.B., Delmondes, G.A., Nascimento, E.P., Figuêiredo, F.R.S.D.N., Rodrigues, C.K.S. 2018. Antiparasitic Activity and Essential Oil Chemical Analysis of the Piper Tuberculatum Jacq Fruit. *Iran J Pharm Res.* 17, 268-275.

Santos, A.C., Peixoto, C.A., Coelho, L.C.B.B. 2004. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. *Micron.* 35, 613-8. doi:10.1016/j.micron.2004.01.004.

Sica, A., Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest.* 122, 787-795. doi:10.1172/jci59643.

Silva, J.M., Antinarelli, L.M.R., Ribeiro, A., Coimbra, E.S., Scio, E. 2015. The effect of the phytol-rich fraction from *Lacistema pubescens* against *Leishmania amazonensis* mediated by mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol.* 159. 143-150, doi: 10.1016/j.exppara.2015.09.009.

Singh, O.P, Sundar, S. 2014. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects, *Front Immunol.* 5, doi:10.3389/fimmu.2014.00296.

Soleimanifard, S., Arjmand, R., Saberi, S., Salehi, M., Hejazi, S.H. 2017. Treatment Outcome of the Drug-resistant Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis by Glucantime. *Adv Biomed Res.*6. doi: 10.4103/2277-9175.201329.

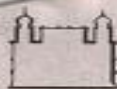
Sunter, J., Gull, K. 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Abra Biol.*7. doi: 10.1098/ rsob.170165.

Tiwari, B., Pahuja, R., Kumar, P., Rath, S.K., Gupta, K.C., Goyal, N. 2017. Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 61. doi: 10.1128/AAC.01169-16. Print 2017 Mar.

Vieira-Araújo, F.M., Rondon, F.C.M., Vieira, Í.G.P., Mendes, F.N.P., Freitas, J.C.C., Moraes, S.M. 2018. Sinergism between alkaloids piperine and capsaicin with meglumine antimoniate against *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol.* 188, 79-82, doi: 10.1016/j.exppara.2018.04.001.

Xu, P., Zhang, T., Guo, X., Ma, C., Zhang, X. 2015. Purification, characterization, and biological activities of broccolinilectin. *BiotechnolProg.* 31, 736-43. doi:10.1002/btpr.2070.
Zampini, R., Sequeira, S., Argañaraz, M.E., Apichela, S.A. 2017. SL15: a seminal plasma-derived lectin from the sperm of llama (*Lama glama*). *Mol Reprod.* 13. doi: 10.1002/mrd.22816.

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Saúde

Fiocruz

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

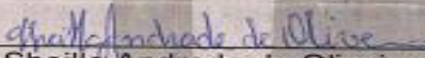
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Prospecção de novas drogas contra leishmaniose: Estudo da atividade de lectinas sobre *Leishmania sp.***, protocolado sob nº 77/2014 pelo (a) pesquisador (a) Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 21/08/2015. **Este projeto está aprovado e terá licença emitida após regularização desta CEUA junto ao CONCEA.**

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo Balb/c machos	820

We certify that project entitled **Prospecção de novas drogas contra leishmaniose: Estudo da atividade de lectinas sobre *Leishmania sp.*** Protocol nº 77/2014, coordinated by Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on August, 21, 2015. **This project has been approved and its license will be issued upon regularization of this CEUA by the CONCEA.**

Recife (PE, Brazil) August, 21, 2015.


 Drª Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora da Comissão de Ética
 no Uso de Animais - CEUA
 Mat. SIAPE 1554975
 e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br