



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ÉRIKA ALVES BEZERRA

Avaliação das atividades antioxidante, citotóxica, antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de *Platonia insignis* Mart.

TERESINA-PI
ÉRIKA ALVES BEZERRA

Avaliação das atividades antioxidante, citotóxica, antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de *Platonia insignis* Mart.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo

Co-orientadora: Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó

TERESINA-PI
ÉRIKA ALVES BEZERRA

Avaliação das atividades antioxidante, citotóxica, antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados a partir das flores de *Platonia insignis* Mart.

Dissertação de Mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo (Presidente)

Departamento de Biofísica e Fisiologia – CCN/UFPI

Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó (Examinador interno)

Departamento de Química – CCS/UFPI

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves (Examinador externo)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia – CCS/UFPI

Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes (Examinador externo)

Departamento de Biofísica e Fisiologia – CCS/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

COORDENADOR GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Welter Cantanhêde da Silva

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Carla Maria de Carvalho Leite

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos e graças alcançadas e por cuidar tão bem de mim e de tudo o que realmente importa.

Aos meus pais, por caminharem, sonharem e comemorarem cada vitória sempre junto a mim, por serem meu maior exemplo e por todo o amor incondicional.

As minhas irmãs, melhores amigas, pelos exemplos de amor, dedicação e cuidado ao próximo e a profissão.

Ao meu esposo, por todo companheirismo, paciência e amor. Por acreditar e me dar forças para seguir em frente.

Aos meus sogros, por todo o apoio e dedicação. Por cuidarem de mim como filha.

A Universidade Federal do Piauí e ao Núcleo de Pesquisas em Plantas medicinais pela estrutura cedida e oportunidades para concretização desse trabalho.

Ao meu Orientador, Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo, pelos ensinamentos, paciência e motivação diários para seguir em busca dos nossos objetivos. Pelo exemplo de dedicação e responsabilidade à docência e à pesquisa.

A minha Co-orientadora, Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó, por toda dedicação e colaboração.

Aos alunos do LINT, em especial Maísa, Altamiro e Mariely pelo apoio e ensinamentos compartilhados.

Ao Professor Dr. Fernando Aécio, por ter me recebido em seu laboratório para a execução dos experimentos.

Aos alunos do LAA, em especial ao Professor Michel e a Layane, pelo apoio, ensinamentos, motivação e auxílio na realização dos ensaios.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
pelos conhecimentos adquiridos.

À Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira, por ter despertado em mim o fascínio e
amor pela docência. Por ter deixado a marca do cuidado e amor pelas plantas
medicinais.

BEZERRA, Érika Alves. **Avaliação das atividades antioxidante, citotóxica, antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados a partir das flores de *Platonia insignis* Mart.** Orientador: Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo. Exame de Qualificação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí, 2017.

RESUMO

As leishmanioses afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com cerca de 3 milhões de novos casos a cada ano. As terapias de escolha são limitadas, apresentam efeitos tóxicos e contribuem para a resistência do parasita. A espécie *Platonia insignis* Mart. ("bacurizeiro") demonstra ser uma alternativa promissora ao tratamento de diversas enfermidades, por ser rica em compostos ativos com propriedades antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante, citotóxica e antileishmania. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade citotóxica, antioxidante, antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico (EHPI), fração acetato de etila (FACOEt) e compostos isolados das flores de *P. insignis*. Para avaliação da citotoxicidade *in vitro* foram realizados os ensaios do MTT em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro e antioxidante *in vivo* em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*. Constatou-se que a GFC foi a substância que apresentou o maior potencial citotóxico sobre os macrófagos murinos, com $CC_{50}=45,20 \mu\text{g/mL}$ e a FACOEt o menor, com $CC_{50}=134,28 \mu\text{g/mL}$, enquanto que a MB e o EHPI apresentaram valores de CC_{50} de 81,77 e 159,68 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As amostras não apresentaram atividade hemolítica em nenhuma das concentrações analisadas. O EHPI e a FACOEt apresentaram atividade antioxidante independente da concentração. Para avaliação da viabilidade celular sobre as formas promastigotas, utilizou-se o método colorimétrico da resazurina. A GFC apresentou o maior poder de redução da viabilidade de formas promastigotas ($IC_{50}=45,19 \mu\text{g/mL}$) e amastigotas ($IC_{50}=8,48 \mu\text{g/mL}$) de *L. amazonensis*. Para formas promastigotas, a FACOEt, o EHPI e MB apresentaram IC_{50} de 23,05, 30,80 e 45,71 $\mu\text{g/mL}$, reespectivamente. O EHPI (30 $\mu\text{g/mL}$) e a FACOEt (60 $\mu\text{g/mL}$) reduziram a infecção de macrófagos, porém não foram capazes de reduzir a infectividade quando comparados ao controle (Anf B). Na avaliação dos mecanismos de imunomodulação de macrófagos, o EHPI, a FACOEt e a MB promoveram aumento da atividade lisossomal, enquanto a FACOEt, a MB e a GFC foram capazes de promover aumento da capacidade fagocítica e da produção de nitrito. Portanto, conclui-se que a GFC apresenta significativo potencial antileishmania, demonstrado pela maior seletividade para o parasito. O EHPI, a FACOEt e a MB podem ser utilizados como uma terapia de suporte à quimioterapia convencional antileishmania, pois demonstraram ser proponentes imunostimuladores que auxiliariam no combate ao parasito.

Palavras-chave: Bacuri, biflavonas, citotoxicidade, GFC, imunomodulação, leishmanicida.

BEZERRA, Érika Alves. **Evaluation of the antioxidant, cytotoxic, antileishmania and immunomodulatory activities of the hydroalcoholic extract, ethyl acetate fraction and isolated compounds from flowers of *Platonia insignis* Mart.** Advisor: Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo. Master's Qualification Exam. Federal University of Piauí, 2017.

ABSTRACT

Leishmaniasis affect more than 12 million people worldwide, with around 3 million of new cases each year. The therapies of choice are limited, have toxic effects and contribute to the resistance of the parasite. The species *Platonia insignis* Mart. ("bacurizeiro") has been shown to be a promising alternative to the treatment of several diseases, since it is rich in active compounds with antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, anticonvulsant, cytotoxic and antileishmania properties. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic, antioxidant, antileishmania and immunomodulatory activity of the hydroalcoholic extract (EHPI), ethyl acetate fraction (FAcOEt) and compounds isolated from *P. insignis* flowers. In order to evaluate the *in vitro* cytotoxicity the MTT assays were performed on peritoneal macrophages from BALB/c mice, the hemolytic activity on sheep erythrocytes and *in vivo* antioxidant activity in *S. cerevisiae* yeasts. GFC was the substance with the highest cytotoxic potential on murine macrophages, with $CC_{50}=45.20 \mu\text{g/mL}$, and FAcOEt the lowest, one with $CC_{50}=134.28 \mu\text{g/mL}$, whereas MB and the EHPi presented intermediate CC_{50} values of 81.77 and 159.68 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The compounds did not present hemolytic activity at any tested concentrations. EHPi and FAcOEt presented antioxidant activity independent of concentration. The colorimetric method of resazurin was used to evaluate cell viability on promastigote forms. GFC presented the greatest viability reduction potential of promastigotes ($IC_{50}=45.19 \mu\text{g/mL}$) and amastigotes ($IC_{50}=8.48 \mu\text{g/mL}$) of *L. amazonensis*. Against promastigote forms, FAcOEt, EHPi and MB showed IC_{50} of 23.05, 30.80 and 45.71 $\mu\text{g/mL}$, respectively. EHPi (30 $\mu\text{g/mL}$) and FAcOEt (60 $\mu\text{g/mL}$) statistically decreased infection of macrophages, but not the infectivity when compared with control (Anf B). Concerning the evaluation of immunomodulatory mechanisms in macrophages, EHPi, FAcOEt and MB, but not GFC, promoted increase of lysosomal activity, while FAcOEt, MB and GFC were able to promote increase of phagocytic capacity and nitrite production. Thus, it was concluded that GFC present a marked antileishmania potential, demonstrated by a greater selectivity to the parasite, indicating a lower cytotoxicity for macrophages and erythrocytes. EHPi, FAcOEt and MB can be used as supportive therapy for conventional antileishmania chemotherapy, as they have demonstrate to be immunostimulatory and might assist in the combat against parasite.

Keywords: Bacuri, biflavone mixture, cytotoxicity, GFC, immunomodulation, leishmanicide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

- Figura 1 Flor, fruto e árvore do bacuri 23
- Figura 2 Casos confirmados de leishmaniose visceral e cutânea, respectivamente, nas regiões brasileiras, compreendidos nos anos de 2005 a 2015 26
- Figura 3 Ciclo heteroxênico da infecção da leishmaniose 28
- Figura 4 Formas digenéticas, promastigota (A) e amastigota (B), de *Leishmania* 29
- Figura 5 Resposta imunológica geral na infecção por *Leishmania* 31

Capítulo I

- Figura 6 Estruturas dos constituintes químicos identificados no extrato hidroalcoólico das flores de *P. insignis* por ESI-IT-MS 41
- Figura 7 Avaliação da citotoxicidade do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) sobre os macrófagos pelo teste do MTT. 46

Capítulo II

- Figura 8 Avaliação da citotoxicidade do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) sobre os eritrócitos de carneiro. 47
- Figura 9 Gráficos representando a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* induzido por EHPi (A), FAcOEt(B), IF (C) e GFC (D). 65

Figura 10	Efeitos do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) em macrófagos murinos infectados por amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . A para controle ou estatisticamente significativo com o controle (C) e a para quando diferir do C.	67
Figura 11	Avaliação dos efeitos das amostras EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) na infectividade de macrófagos murinos infectados por amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . A para controle ou estatisticamente significativo com o controle (C) e a para quando diferir do C.	68
Figura 12	Macrófagos infectados com <i>Leishmaniose amazonensis</i> (A), tratados com Anf B 0,2 µg/mL (B), EHPI 7,5 (C.1), 15 (C.2) e 30 µg/mL (C.3), FAcOEt 15 (D.1), 30 (D.2) e 60 µg/mL (D.3), MB 15 (E.1), 30 (E.2) e 60 µg/mL (E.3) e GFC 1,5 (F.1), 3,0 (F.2) e 6,0 µg/mL (F.3).	69
Figura 13	Macrófagos infectados com <i>Leishmaniose amazonensis</i> (A), tratados com Anf B 0,2 µg/mL (B), FAcOEt 30 (D.2) e 60 µg/mL (D.3), MB 15 (E.1), 30 (E.2) e 60 µg/mL (E.3) e GFC 1,5 (F.1). Aumento de 1000x.	70
Figura 14	Macrófagos infectados com <i>Leishmaniose amazonensis</i> (A), tratados com Anf B 0,2 µg/mL (B), GFC 3,0 (F.2) e 6,0 µg/mL (F.3). Aumento de 1000x.	71
Figura 15	Gráficos referentes à análise da atividade lisossomal dos macrófagos frente a ação do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D).	72
Figura 16	Gráficos referentes à capacidade fagocítica dos macrófagos frente a ação do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D).	73
Figura 17	Gráficos referentes à avaliação da indução da produção de óxido nítrico pelos macrófagos pela ação do EHPI (A), FAcOEt (B), IF (C) e GFC (D).	74

LISTA DE QUADROS

Capítulo I

Quadro 1	Descrição das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Quadro 2	Avaliação da prevenção do EHPi frente ao dano oxidativo causado pelo agente estressor às linhagens de <i>S. cerevisiae</i> comparados ao H ₂ O ₂ e a SodWT.	49
Tabela 3	Efeito antioxidante do EHPi em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> comparados ao H ₂ O ₂ e a SodWT.	49
Tabela 4	Avaliação da reparação do dano oxidativo do EHPi em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> comparados ao H ₂ O ₂ e a SodWT.	50
Tabela 5	Efeito antioxidante da FAcOEt quando administrado duas horas antes do agente estressor em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> comparados ao CN.	50
Tabela 6	Avaliação da ação antioxidante da FAcOEt quando administrado conjuntamente ao H ₂ O ₂ em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> comparados ao CN.	51
Tabela 7	Avaliação da ação da FAcOEt frente ao H ₂ O ₂ em linhagens de <i>S. cerevisiae</i> comparados ao CN.	52

Capítulo II

Quadro 8	Atividade antileishmania, efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos e índice de seletividade calculados para EHPi, FAcOEt, MB e GFC	71
----------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Anf B	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
B. O. D	Demanda bioquímica de oxigênio
CC₅₀	Concentração citotóxica média
CH₅₀	Concentração hemolítica média
CI₅₀	Concentração inibitória média
CR1	Receptor do complemento 1
CR3	Receptor do complemento 3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doenças tropicais negligenciadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHPi	Extrato hidroalcoólico de <i>Platonia insignis</i> Mart.
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FAcOEt	Fração acetato de etila
Gp63	Glicoproteína 63
GFC	Garcinielliptona FC
GTP	Guanosina trifosfato
H₃PO₄	Ácido fosfórico
Hep-2	Linhagem celular de carcinoma de laringe humano
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepático humano
HL-60	Células leucêmicas
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
KB	Células de carcinoma oral
LAA	Laboratório de Atividades Antileishmania

LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LTh0	Linfócito T auxiliar do tipo 0
LV	Leishmaniose visceral
MA	Macrófago
MB	Mistura de biflavonas
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo
NCI-H-292	Carcinoma mucoepidermóide humano
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais
PBS	Salina tamponada com fosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UI	Unidade internacional
UV	Ultravioleta
WHO/OMS	“World Health Organization” – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Plantas medicinais	21
3.2 Leishmanioses	24
3.2.1 Epidemiologia	24
3.2.2 Agente etiológico e ciclo biológico	26
3.2.3 Resposta imunológica geral na infecção por Leishmania	29
3.2.4 Terapêutica convencional e alternativas	31
Capítulo I - Avaliação do potencial citotóxico e antioxidante do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de <i>Platonia insignis</i> Mart.	34
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1 Substâncias utilizadas.....	38
2.2 Células	38
2.3 Obtenção do extrato, fração e compostos isolados das flores de <i>P.</i> <i>Insignis</i>	39
2.4 Determinação da Citotoxicidade	41
2.4.1 Citotoxicidade sobre macrófagos e Índice de seletividade (IS).....	41
2.4.2 Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro	42
2.5 Ensaio antioxidante <i>in vivo</i> em levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
2.6 Análise estatística	44
3 RESULTADOS	45
3.1 Citotoxicidade sobre macrófagos	45
3.2 Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro	46
3.3 Ensaio antioxidante <i>in vivo</i> em levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÃO.....	55

Capítulo II - Ensaio de atividade antileishmaniana e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de <i>Platonia insignis</i> Mart.	56
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
2.1 Substâncias utilizadas.....	59
2.2 Equipamentos e materiais utilizados	59
2.3 Parasitas e células	59
2.4 Atividade antileishmaniana do EHPi, FAcOEt, MB e GFC sobre as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	60
2.5 Atividade antileishmaniana do EHPi, FAcOEt, MB e GFC sobre macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	61
2.6 Avaliação de mecanismos de ativação de macrófagos	61
2.6.1. Preparo de soluções	61
2.6.2 Avaliação da atividade lisossomal	62
2.6.3 Determinação da capacidade fagocítica	62
2.6.4 Avaliação da produção de nitrito.....	63
2.7 Análise estatística	64
3 RESULTADOS	65
3.1 Atividade antileishmaniana do EHPi, FAcOEt, MB e GFC sobre as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	65
3.2 Atividade antileishmaniana do EHPi, FAcOEt, MB e GFC sobre macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	66
3.3 Avaliação de mecanismos de ativação de macrófagos	71
3.3.1 Avaliação da atividade lisossomal	71
3.3.2 Determinação da capacidade fagocítica	72
3.3.3 Avaliação da produção de nitrito.....	73
4 DISCUSSÃO	75
5 CONCLUSÃO	80
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7 PERSPECTIVAS	82
Referências	83

1 INTRODUÇÃO

Na maior parte do mundo, a medicina moderna está bem desenvolvida, entretanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que 85% das pessoas do mundo utilizam plantas medicinais para tratar da saúde, sendo que 80% das pessoas dos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde (FREIRE, 2018). Cerca de 25% das prescrições médicas contém formulações com princípio ativo derivado de plantas medicinais ou análogos sintéticos destas (GURIB-FAKIN, 2006).

Ao longo dos séculos, o homem vem aprendendo a selecionar plantas medicinais para o alívio e cura de males e doenças. Estas práticas fazem parte da evolução humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelas civilizações, que passaram a dominar o conhecimento e a usá-las de forma mais segura (FERREIRA; PINTO, 2010). Observou-se que algumas plantas curavam, matavam ou produziam efeitos colaterais severos (DORTA, 1998). Elas biossintetizam substâncias químicas diversas que podem atuar em alvos farmacológicos diferentes (FERREIRA; PINTO, 2010). Em função disso, a observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies vegetais (VEIGA JUNIOR, 2005).

O Brasil apresenta uma rica biodiversidade, com cinco principais biomas: floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, apresenta-se como uma abundante fonte de espécies naturais com potencial terapêutico. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado e regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001).

Nesse contexto, a espécie *Platonia insignis* Mart. tem demonstrado ser uma alternativa promissora ao tratamento de diversas enfermidades. Popularmente conhecida como "bacuri", "bacuri açu", "parcori", "pakuri", pertence à família Clusiaceae, ao gênero *Platonia* e é um monotipo (BRAGA, 1976). Tem sua origem no estado do Pará, mas se dispersou para outras cidades das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (CARVALHO, 2008). Popularmente,

é utilizada no tratamento de diversas doenças de pele, reumatismos, artrites e picada de aranhas e cobras (COSTA JÚNIOR et al., 2013), e é rica em diversas substâncias ativas com propriedades antileishmania, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, anticonvulsivante, citotóxica, dentre outras (NASCIMENTO et al., 2014).

Grupos de Pesquisas da Universidade Federal do Piauí tem direcionado estudos químico-farmacológicos a essa espécie, gerando diversas publicações. Contudo, pesquisas envolvendo suas flores ainda são escassas. Em nosso grupo, já foram isolados e identificados, a partir do extrato hidroalcoólico das flores, dois biflavonoides em mistura (moreloflavona e volkensiflavona) e uma benzofenona poli-isoprenilada, garcinielliptona FC (GFC), a partir da fração hexânica das cascas do caule, o lupeol, e a partir do extrato hexânico das sementes, o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1). Estes compostos apresentam elevada relevância biológica, com potencial para serem exploradas na busca de novos fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas.

As leishmanioses afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Esse número vem crescendo, pois, anualmente, surgem cerca de 3 milhões de novos casos (CARVALHO et al., 2017). Representam um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os humanos são infectados pela picada de flebotomíneos, que vivem em áreas florestais, cavernas, tocas de roedores e em áreas urbanas. Amplamente distribuída em todo mundo, afeta o homem e os animais, ocorrendo na Ásia, Europa, África e Américas, sendo que existem relatos sobre a doença, no continente americano, desde a época colonial. (RATH, 2003; WHO, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em áreas de contaminação de leishmaniose. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, foram confirmados 81.730 casos de leishmaniose visceral entre os anos de 1990 a 2016. A Região Nordeste se destaca frente as demais regiões brasileiras, sendo responsável por 66,29% desses casos (MS, 2017).

Historicamente, a quimioterapia das leishmanioses tem sido baseada no uso dos antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha, como o estilbogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina

(Glucantime®) (BRENDELE et al., 2002). Os fármacos de segunda escolha como a Pentamidina e Anfotericina B, são importantes na terapia combinada, ou em casos de tratamento resistente aos antimoniais (SUNDAR et al., 2006; SUNDAR et al., 2010). No entanto, esses medicamentos necessitam de administração parenteral e o tratamento é longo. Os efeitos secundários são graves, além das altas taxas de recaída, em especial, nos pacientes imunocomprometidos (KAYSER et al., 2003; CROFT et al., 2006; BHATTACHARYA et al., 2007; SANTOS et al., 2008; SUNDAR et al., 2010).

Sendo assim, a procura por novos compostos com ação terapêutica, nos direciona em busca de conhecimento sobre princípios ativos de plantas. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania, *in vitro*, do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e constituintes majoritários produzidos a partir de flores de *Platonia insignis* Mart., assim como investigar seus potenciais citotóxicos, antioxidantes e imunomoduladores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antioxidante, citotóxica, antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de *Platonia insignis* Mart.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados de *P. insignis* sobre macrófagos peritoneais murinos e sobre eritrócitos de carneiro;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados de *P. insignis*, em ensaio *in vivo* em leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar a atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados de *P. insignis* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Investigar a ação *in vitro* do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados de *P. insignis* sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas em macrófagos;
- Investigar a atividade lisossomal *in vitro* de macrófagos pré-tratados com o extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados de *P. insignis*;
- Verificar o efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados de *P. insignis* sobre a atividade fagocítica de macrófagos;
- Verificar o efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados de *P. insignis* sobre a síntese de óxido nítrico por macrófagos murinos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais para a prevenção, tratamento e cura de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal utilizada pelos povos. No Brasil, essa prática se deu inicialmente com os índios e, posteriormente, foi fortalecida com a contribuição de imigrantes vindos das mais diversas regiões do mundo (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Ao longo dos últimos anos, o interesse dos povos de países industrializados por terapias naturais e uso de plantas medicinais e fitoterápicos tem crescido substancialmente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial, principalmente os de países em desenvolvimento, fazem uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. Tudo isto se deve a alguns fatores, como a busca por hábitos de vida mais saudáveis, como alternativa ao uso dos medicamentos tradicionais, uma vez que não estão atingindo os objetivos esperados, além de apresentarem menos efeitos adversos e colaterais (MARTINS et al., 2003; TANG; HALLIWELL, 2010).

As plantas medicinais se tornam fontes promissoras para a síntese de uma grande variedade de novos fármacos, em virtude da magnitude da biodiversidade e da quantidade de compostos químicos biologicamente ativos que apresentam (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; LOVKOVA et al., 2001). Nesse contexto, diversos estudos com plantas medicinais têm sido direcionados a atividade antileishmania. Compostos pertencentes aos grupos dos alcalóides, flavonoides, taninos, esteroides, chalconas, quinonas, triterpenos, sesquiterpenos, dentre outros, foram relacionados a essa propriedade medicinal (GIL et al., 2008; SEN, 2011).

Dentre a grande diversidade da flora brasileira, a família Clusiaceae, também conhecida como Guttiferae, merece destaque. É de grande interesse comercial, pois produz frutos comestíveis, madeira nobre e derivados químicos importantes para indústria, inclusive a farmacêutica (FERREIRA et al., 2012). É composta por plantas tropicais e apresenta cerca de 55 gêneros e 1200 espécies em regiões tropicais e subtropicais do mundo (YAMAGUCHI et al., 2014). No

Brasil, distribui-se em cerca de 18 gêneros e 150 espécies, evidenciando-se *Kielmeyera* Mart & Zucc (pau-santo), *Caraipa Aubl* (Camaçari), *Platonia insignis* Mart. (bacuri), *Calophyllum brasiliense* (guanandi) e *Rheedia L.* (bacupari) (FERREIRA et al., 2012). Os biflavonoides, as benzofenonas, as xantonas e as cumarinas são as principais classes de compostos encontrados nessa família. As plantas os produzem, principalmente, como mecanismo de defesa (ACUÑA et al., 2012).

Dentre as espécies desse gênero, a *Platonia insignis* Mart. merece notoriedade. Trata-se de uma espécie promissora, pois é de uso múltiplo: frutífera, madeireira, produtora de óleo e medicinal (NASCIMENTO et al., 2007). Em seus frutos foram identificados diversos compostos como vitaminas C e E, glutamina, ácido glutâmico, carboidratos (glicose, frutose e sacarose) e minerais (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu e Mn), nas sementes ácidos graxos, oleico palmítico, éster metílico do ácido linoleico, ácido erúcico, mirístico, linoléico, esteárico, palmitoleico, tripalmitina, alcoóis graxos como eicosanol, octadecanol e hidrocarbonetos (LUSTOSA, 2012). Tem crescido substancialmente o número de estudos com a *Platonia insignis*, como os realizados por COSTA JÚNIOR et al. (2011) e PINHEIRO et al. (2016), que permitiram o isolamento, caracterização dos compostos químicos de dois biflavonóides em mistura (moreloflavona e volkensiflavona) e a benzofenona poli-isoprenilada garcinielliptona FC (GFC) a partir do extrato hidroalcoólico das flores de *P. insignis*. Estes compostos têm demonstrado ser responsáveis por importantes atividades farmacológica.

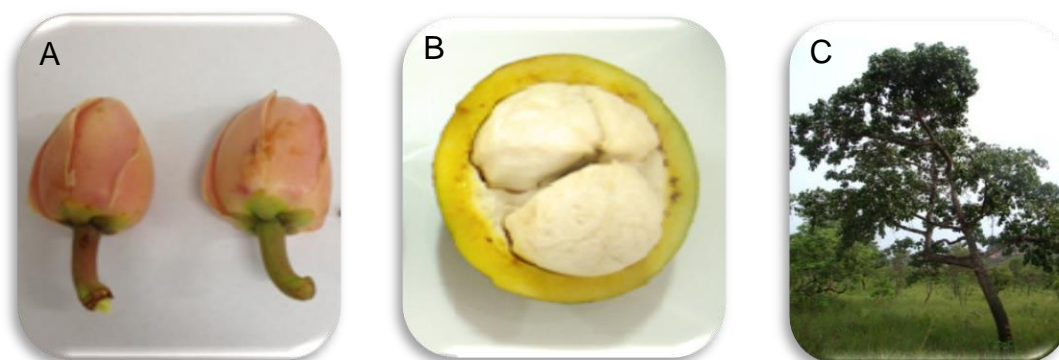
Ensaio realizados com as sementes dos frutos demonstraram as atividades cicatrizante e anti-inflamatória (SANTOS JÚNIOR et al., 2010), anticonvulsivante (COSTA-JÚNIOR et al., 2010), antileishmania (COSTA-JÚNIOR et al., 2012), imunomoduladora (LUSTOSA et al., 2016), antimicrobiana e anti-inflamatória (COSTA-JUNIOR et al., 2011), antioxidante, a partir da polpa dos frutos (RUFINO et al., 2010) e tratamento de eczemas e artrites a partir da casca do tronco (SHANLEY; MEDINA, 2005).

As benzofenonas poli-isopreniladas raramente ocorrem em outras famílias, que não a Clusiaceae, são os maiores intermediários na via biossintética das xantonas (BEERHUES, 1996) e apresentam as propriedades

antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 1999), leishmanicida (COSTA JÚNIOR et al., 2012) e antioxidante (COSTA JÚNIOR et al., 2011). Por sua vez, os biflavonóides são compostos polifenólicos, presentes nas plantas vasculares, frequentemente e abundantemente encontrado nesta família. As atividades biológicas analgésica (LIN et al., 1997), antibacteriana (GONTIJO et al., 2014), anti-inflamatória (OTUKI et al., 2011), antioxidante (VERDI et al., 2004) e antiparasitária (TUANSULONG, et al., 2011) foram reportadas à moreloflavona, enquanto que a volkensiflavona foram reportadas as atividades analgésica, antibacteriana e antitumoral (VERDI et al., 2004).

O bacuri está presente no Estado do Piauí, sendo amplamente utilizado na medicina popular. Porém, há escassez de estudos voltados para essa espécie, a qual apresenta uma grande variedade de fitoquímicos providos de atividades biológicas de alta relevância e que até então os estudos não demonstraram significativa toxicidade. É de grande importância que novas pesquisas sejam voltadas a essa planta, visando à análise do seu potencial medicinal, já que estudos prévios demonstraram essa espécie como promissora no tratamento de doenças.

Figura 1 – Flor (A), fruto (B) e árvore do bacuri (C).



Fonte: PINHEIRO, E. E. A. e CERRATINGA.

3.2 Leishmanioses

3.2.1 Epidemiologia

As doenças tropicais negligenciadas, prevalentes em regiões tropicais e subtropicais, atingem mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo e estão presentes em cerca de 149 países. Afetam, principalmente, populações que vivem em regiões mais pobres, onde as condições de higiene, alimentação e saneamento básico são mais precárias, e que convivem com vetores infecciosos e animais domésticos (REIS et al., 2016).

As leishmanioses são um conjunto de doenças infectoparasitárias que podem causar sérios danos físicos, cognitivos e socioeconômicos à população e que, embora de grande relevância para a saúde pública, não recebem a devida atenção da indústria farmacêutica e órgãos públicos para o desenvolvimento de pesquisas que visem a descoberta de novos fármacos (SANTOS et al., 2017). Atualmente, mais de 20 doenças são classificadas como DTN (doenças tropicais negligenciadas) (WHO, 2017). Dentre elas, a leishmaniose é estimada como sendo a segunda em mortalidade e a quarta em morbidade (ALMEIDA et al.; 2015).

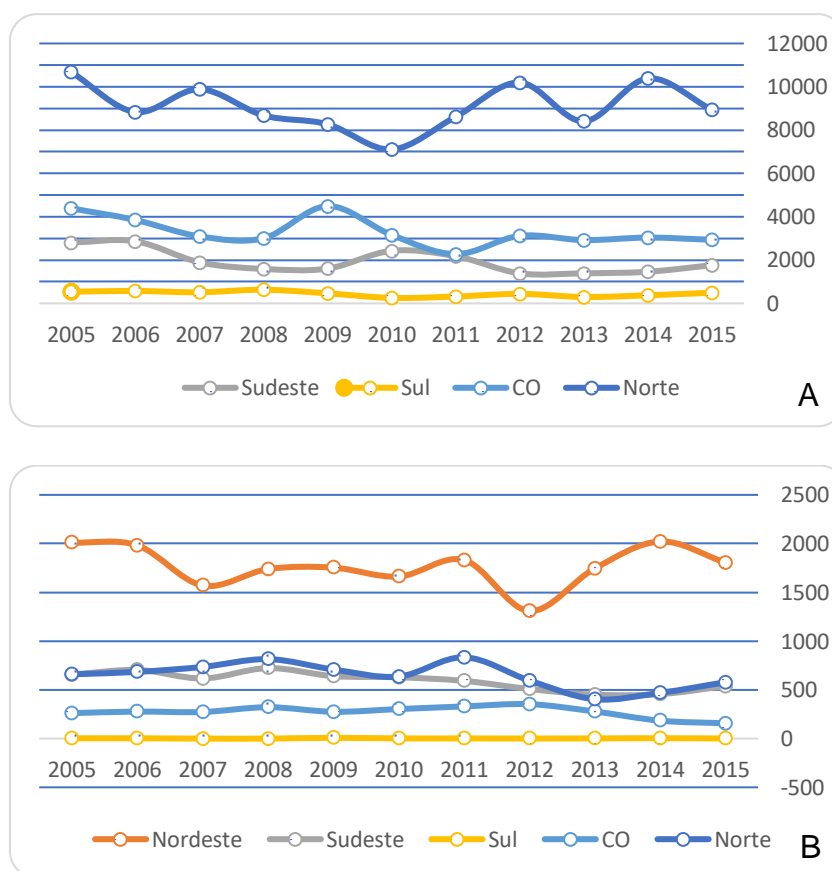
A leishmaniose é um complexo de doenças parasitárias infecciosas, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (KEVRIC et al., 2015). Afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e, estima-se que surgem cerca de 3 milhões de novos casos por ano (MITROPOULOS et al., 2010). A transmissão da doença se dá através da picada do inseto vetor fêmea, díptero flebotomíneo, que transmite o parasita ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo. A apresentação da doença varia de acordo com o vetor de transmissão, a espécie de *Leishmania* e o estado de saúde do indivíduo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2017), existem três formas de leishmanioses: visceral, cutânea e mucocutânea. As manifestações clínicas apresentam amplo espectro, podendo variar de infecções assintomáticas a desfiguração e infecção sistêmica letal (OLIVEIRA et al., 2015).

A leishmaniose mucocutânea (LM), por exemplo, pode levar a destruição das mucosas do nariz, boca e garganta. Em média, 3 a 5% dos casos desenvolvem lesão mucosa. Mais de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Etiópia, Brasil e Peru (WHO, 2017).

A leishmaniose visceral (LV), popularmente conhecida como calazar, quando não tratada, a mortalidade pode chegar a 100% em dois anos. Os pacientes acometidos apresentam febres de ocorrência irregulares, anemia, perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia. É altamente endêmica na Índia e na Ásia. Em 2015, mais de 90% dos casos reportados ocorreram em sete países, dentre eles, o Brasil, onde são registrados cerca de 3.500 casos por ano, e cuja taxa de letalidade vem crescendo gradualmente, passando de 3,1%, no ano de 2000, para 7,1% em 2012 (MS, 2014). A região Nordeste lidera o número de casos confirmados de LV, sendo o estado da Bahia o mais endêmico, seguido do Maranhão, Ceará e Piauí, onde se deu a primeira grande epidemia urbana do país (WHO, 2017; MS, 2014; WERNECK et al., 2008).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum, causando lesões cutâneas e ulcerosas na pele, cujas formas clínicas podem ser classificadas em: forma cutânea localizada, forma cutânea disseminada, forma recidiva cútis e forma cutânea difusa. Em média, 95% dos casos ocorrem nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Nas Américas só não há registros no Chile e Uruguai. Dois terços dos novos casos ocorrem em seis países, dentre eles, o Brasil. Estima-se que surgem de 600.000 a 1 milhão de novos casos por ano no mundo e, no Brasil, são registrados cerca de 21.000 casos por ano, sendo mais prevalentes na região Norte, seguida das regiões Nordeste e Centro-Oeste.

Figura 2. Casos confirmados de leishmaniose cutânea (A) e visceral (B), respectivamente, nas regiões brasileiras, compreendidos nos anos de 2005 a 2015.



Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

3.2.2 Agente etiológico e ciclo biológico

Os agentes etiológicos das leishmanioses são constituídos por mais de 20 espécies de protozoários pertencentes ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (BARDARÓ; SCHOOLEY, 2008).

Cerca de 30 espécies de flebotomíneos são capazes de transmitir o parasita *Leishmania*, sendo o *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie vetor no Brasil e cujos principais reservatórios são o cão doméstico (*Canis familiaris*) e a raposa do campo (*Cerdocyon thous*). Apenas os mosquitos fêmeas transmitem a doença, pois realizam o repasto sanguíneo para o desenvolvimento dos seus

ovos. O período para o desenvolvimento do parasita no vetor pode variar de 4 a 25 dias (SILVEIRA et al., 2016).

No Brasil, sete espécies de *Leishmania* estão associadas a leishmaniose tegumentar americana: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg*, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (SILVA et al., 2015).

Trata-se de uma doença metaxênica, cujo ciclo de vida do parasita apresenta duas etapas principais, sendo uma no hospedeiro invertebrado e a outra no hospedeiro vertebrado (TORRES et al., 2012).

O flebotomíneo, ao realizar repasto sanguíneo no mamífero, ingere as formas infectantes do parasita, forma amastigota, presentes nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). No intestino, ocorre lise celular e os parasitas são liberados do interior dos macrófagos. A diminuição da temperatura e o aumento do pH induzem a mudança da forma amastigota para promastigota, fenômeno denominado de metaciclogênese. O processo se dá, em média, em 7 dias, e ocorrem alterações estruturais, morfológicas, bioquímicas (como a perda do glicolípido de superfície, o lipofosfoglicano, e, conseqüentemente, da adesão do parasita no intestino do vetor) e genéticas (DIAS, 2014).

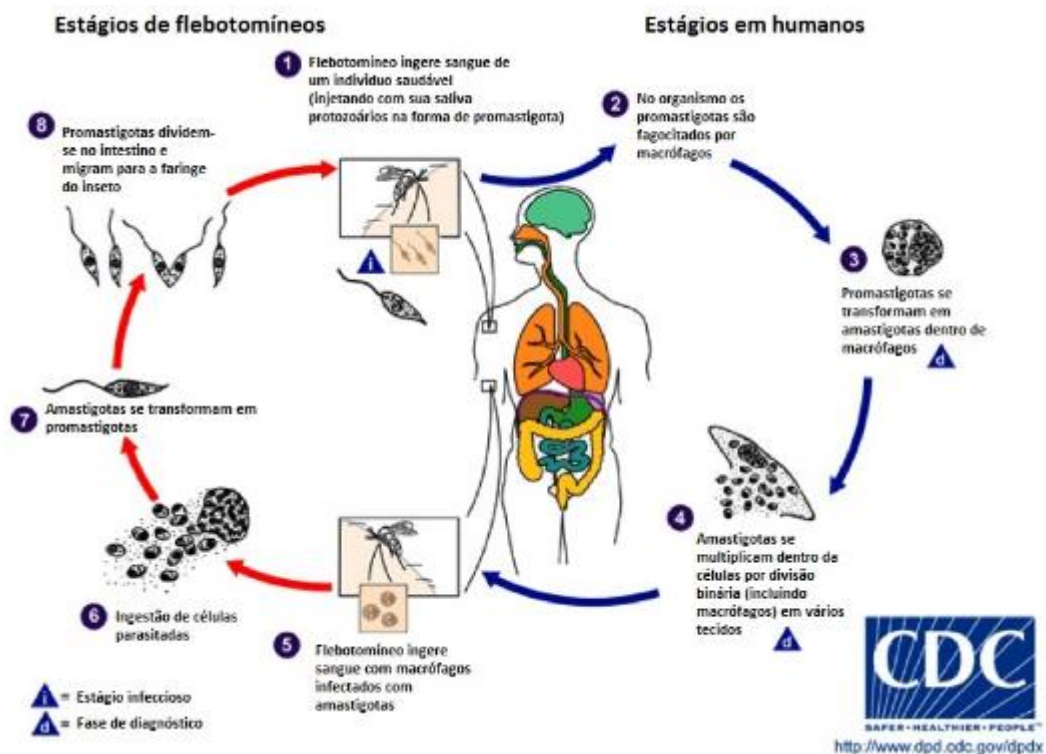
O processo da transformação morfológica se dá em algumas etapas. Inicialmente, a forma amastigota se transforma na forma promastigota procíclica. Após 48 a 72 horas, ocorre uma nova diferenciação para a forma nectomônada, que se transforma na forma leptomônada. Na porção anterior do intestino, ocorrem novas diferenciações para a forma haptomônada e, posteriormente, para a forma metacíclica, forma infectante que apresenta grande motilidade, pois apresenta grande flagelo e corpo celular reduzido. (BVS, 2006; DIAS, 2014).

Uma vez infectada, o inseto fêmea, ao realizar novamente o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado regurgitará e inoculará as formas infectantes do parasita. A sua saliva apresenta componentes com ações anticoagulantes, vasodilatadoras e imunomoduladoras, que provocarão resposta anti-inflamatória e migração de células de defesas (FONTAINE et al., 2011;

ABDELADHIM et al., 2014; PETERS et al., 2008). As formas metacíclicas serão, então, fagocitadas pelas células do SFM (neutrófilos, células dendríticas, monócitos e, principalmente, macrófagos).

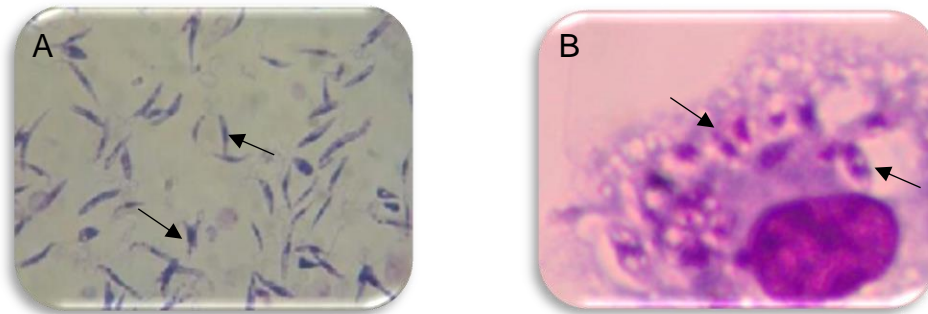
O fagossoma se fundirá ao lisossoma e será formado o fagolisossoma, também denominado de vacúolo parasitóforo. Nesta região, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas e ocorrerão sucessivas divisões binárias. A multiplicação se dá de forma rápida e intensa, o que levará ao rompimento da membrana celular. Ocorrerá disseminação hematogênica e as formas amastigotas estarão livres para serem novamente fagocitadas. Esse processo é contínuo e permite que o parasita chegue a outros tecidos ricos em células do SFM, como linfonodos, baço, fígado e medula óssea (BVS, 2006).

Figura 3 – Ciclo heteroxênico da infecção da leishmaniose



Fonte: Adaptado de <http://dpd.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

Figura 4 – Formas digenéticas, promastigota (A) e amastigota (B), de *Leishmania* (aumento de 1000x).



Fonte: Bezerra, É. A. e ALVES, M. M. A.

3.2.3 Resposta imunológica geral na infecção por *Leishmania*

A função imunológica pode ser, conceitualmente, dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo. Ela é ativada na presença de microrganismos que não ocorrem na espécie humana e que apresentam na sua superfície moléculas que interagem com receptores de reconhecimento de padrão celular presentes nas células do SFM. Os macrófagos têm ação central nesses mecanismos (SOUSA et al., 2010). Após essa etapa, surge uma resposta tardia, mais específica e complexa, denominada de imunidade adquirida, sendo determinante a ação dos linfócitos. Quando mediada pelos anticorpos, produzidos pelos linfócitos B, tem-se a imunidade humoral. Quando mediada pelos linfócitos T, tem-se a imunidade celular. O modelo animal usando camundongos BALB/c é o que melhor representa os processos imunológicos e as consequências da infecção por leishmanias (MORATO, 2006).

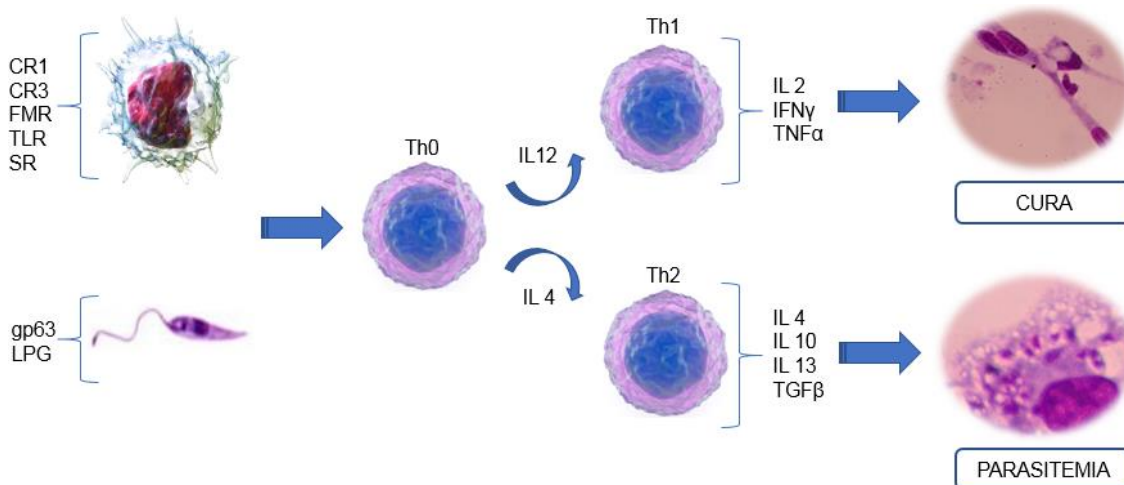
Os principais ligantes presentes na superfície da *Leishmania* que estão envolvidos na interação com os MA (macrófagos) são o LPG e a glicoproteína gp63. Essas moléculas podem se ligar a receptores como CR1 e CR3, fucose-manose, *toll-like* e *scavenger*. O tipo de receptor envolvido no processo da fagocitose pelos MA implicará no mecanismo da infecção. Caso o parasita interaja com o receptor manose, ocorrerá a liberação de enzimas hidrolíticas. Caso haja interação com os receptores da via do complemento, como o CR1 e

CR3, não haverá inflamação e nem processos oxidativos, facilitando, assim, a viabilidade dos parasitas (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX; 2015; LIEVIN-LE; LOISEAU, 2016). A LPG pode sofrer variações entre as espécies de *Leishmania* e ela é capaz de induzir diferentes mecanismos de resposta imunológica, além de conferir proteção as formas promastigotas da ação das EROS produzidas no processo da fagocitose, da ação da proteína cinase C e da digestão no interior do fagolisossomo (AMBRÓSIO, 2008).

A ativação dos MA pode se dar por dois mecanismos distintos, pela via clássica ou pela via alternativa, passando a serem designados de MA M1 e M2 respectivamente. Cada um deles exercerá diferentes funções: M1, citotóxico, tem ação crucial no combate a patógenos intracelulares e M2 favorece o desenvolvimento do agente invasor (MOSSER e EDWARDS, 2008; GEISSMANN et al., 2010). A via clássica é ativada na presença de IFN- γ , TNF, LPS e TLT, e leva a produção de mediadores como IL-12, TNF, ROS e NO. Enquanto que a via alternativa é ativada mediante os estímulos de IL-4 e IL-13, e leva a produção de IL-10 e quimiocinas (GORDON, 2003).

As citocinas presentes no meio e a via de ativação dos MA exercem um papel decisivo na apresentação de antígenos e na ativação dos linfócitos, podendo resultar no controle ou não da infecção. As citocinas IL-12 e IFN- γ levam a diferenciação dos linfócitos Th0 a Th1, que são produtores de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF, importantes na ativação microbicida dos macrófagos, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), como o NO, compostos responsáveis pela morte intracelular das leishmanias. A presença de TGF- β , IL-10, IL-4 polariza a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th2, sintetizadores de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β , favorecendo a infecção com aumento da imunossupressão (MORATO, 2013).

Figura 5: Resposta imunológica geral na infecção por *Leishmania*



Fonte: BEZERRA, É. A.

3.2.4 Terapêutica convencional e alternativas

Em 1920, Bramachari desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, a ureia estibamina. Em 1936, Schimidt introduziu nas práticas o gluconato de antimônio (V) sódico, comercialmente conhecido por Pentosan[®] e Solustibosan[®]. Durante a Segunda Guerra Mundial, na França, um novo medicamento surgiu, o antimoníato de N-metil glucamina, conhecido comercialmente por Glucantime[®]. Este fármaco é a droga de primeira escolha e amplamente utilizado até hoje no tratamento da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral (RATH et al., 2003).

O antimoníato de N-metilglucamina é uma pró-droga que, para exercer sua ação antileishmania, deve ser convertida de antimonial pentavalente a antimonial trivalente. Apesar de amplamente utilizado, o tratamento é complexo, de alto custo e apresenta riscos. A administração do fármaco se dá por via intramuscular ou endovenosa, a eficácia depende da adequação da dose e está relacionada ao surgimento de efeitos colaterais graves como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e pancreatite. Tem duração média de 20 a 28 dias e requer internação do paciente. Estes fatores dificultam a adesão a terapia e, em países em desenvolvimento, o custo elevado do tratamento é um grande

desafio para as autoridades de saúde. O seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, porém, sabe-se que várias enzimas da *Leishmania spp.* são inibidas e que há inibição da fosfofrutoquinase, com bloqueio da produção de adenosina trifosfato (ATP) e da guanosina trifosfato (GTP) (ROATT et al., 2014; ANVISA, 2015). O uso não controlado do glucantime e a imunossupressão, presente, principalmente, em pacientes co-infectados com HIV, levou à seleção de linhagens que têm apresentado mecanismos de resistência a essa droga e aumentado o número de pacientes não responsivos a terapia (SILVA et al., 2016).

Em 1960, a Anfotericina B foi introduzida no tratamento da leishmaniose visceral. É um fármaco de segunda escolha, com taxa de cura entre 90 a 95%. Porém, é uma droga que apresenta algumas desvantagens. A administração se dá pela via endovenosa e deve ser lenta, por um período de 2 a 6 horas, para evitar efeitos adversos. Para isso, requer internação do paciente, além de apresentar taxa de nefrotoxicidade superior a 50%. A sua ação se deve à ligação aos esteroides, ergosterol e episterol, presentes na membrana plasmática do parasita, alterando a sua permeabilidade e provocando o extravasamento dos componentes intracelulares (BVS, 2015; ROATT et al., 2014), bem como a formação de poros na membrana do parasita e do hospedeiro, alterando a permeabilidade aos cátions, levando a lise celular. As formulações lipossomais da anfotericina B foram desenvolvidas como alternativa para a redução da toxicidade. Elas são mais seguras e apresentam maior atividade antileishmania (NAN et al., 2004; KAYSER et al., 2003; GIL et al., 2008). Entretanto, apresentam elevado custo.

O tratamento atualmente disponível requer monitoramento clínico e laboratorial contínuo, apresenta efeitos colaterais graves, levando a intolerância e, por vezes, a desistência do tratamento. Nesse contexto, é imprescindível a busca por novos tratamentos que apresentem baixa toxicidade, menor custo e fácil acesso.

Diante do exposto, este trabalho descreve o primeiro estudo das atividades antileishmania e citotóxica com as flores do bacuri. Tornando-o altamente relevante, visto que a *Platonia* apresenta uma diversidade de

compostos bioativos com potenciais ações farmacológicas, aliado ao interesse em investigar novas terapias para leishmaniose, doença prevalente no estado do Piauí, e cujo tratamento é um problema crítico.

Capítulo I - Avaliação do potencial citotóxico e antioxidante do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de *Platonia insignis* Mart.

BEZERRA, E. A.^a; PINHEIRO, E. E. A.^b; ALVES, M. M. M.^c; AMORIM, L. V.^c; LIMA NETO, J. S.^b; CARVALHO, F. A. A.^{a,c}; CITÓ, A.M.G.L.^{a,b}; ARCANJO, D. D. R.^{a,c}. **Avaliação do potencial citotóxico e antioxidante do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de *Platonia insignis* Mart.**

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64049-550, Teresina, PI, Brasil. [*erikka.ab@gmail.com](mailto:erikka.ab@gmail.com)

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil

^cNúcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil

RESUMO

O uso popular e tradicional, embora sejam de extrema importância, não são suficientes para garantir o uso seguro e eficaz, a fim de validar eticamente as plantas medicinais. Porém, é crucial que ensaios toxicológicos sejam realizados a fim de garantir a segurança do uso, seja da planta medicinal *in natura* ou do medicamento sintetizado a partir dela. Portanto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da citotoxicidade *in vitro* do EHPi, FAcOEt, MB e GFC a partir das flores de *Platonia insignis* Mart, espécie usada popularmente no tratamento de doenças de pele, picadas de aranhas e cobras, reumatismos, artrites e como agente cicatrizante. Para isso, foram realizados os ensaios de MTT em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e da atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro. Constatou-se que a GFC foi a substância que apresentou o maior potencial citotóxico sobre os macrófagos murinos, com CC₅₀ de 45,20 µg/mL e a FAcOEt o menor, com CC₅₀ de 159,68 µg/mL, enquanto que a MB e o EHPi apresentaram valores de CC₅₀ intermediários, 81,77 e 134,28 µg/mL respectivamente. Os compostos não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações analisadas (6,25 a 800 µg/mL), bem como o EHPi e a FAcOEt apresentaram atividade antioxidante frente a ação do agente estressor sobre leveduras de *S. cerevisiae*, independentes da concentração. Dentre a faixa de concentração analisada, as amostras produzidas a partir das flores do bacuri apresentaram citotoxicidade, dependente da concentração, para os macrófagos, entretanto não foram tóxicas para os eritrócitos, células responsáveis pelo transporte de gases no sangue. Estes são excelentes indicativos de que o bacuri é uma planta que apresenta grande potencial para o desenvolvimento de um fármaco seguro e eficaz e que seus compostos podem atuar como biomoduladores da resposta imune. Porém, faz-se necessário a realização de estudos *in vivo* para obtenção de resultados mais aprofundados.

Palavras-chave: *Platonia insignis*, extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila, GFC, mistura de biflavonas, citotoxicidade

1 INTRODUÇÃO

O uso popular e tradicional, embora sejam de extrema importância, não são suficientes para garantir o uso seguro e eficaz e validar eticamente as plantas medicinais. O desenvolvimento de ensaios toxicológicos é crucial para garantir a segurança do uso, seja da planta medicinal *in natura* ou do medicamento sintetizado a partir dela (DICSON et al., 2015).

Diversos ensaios toxicológicos, como MTT e atividade hemolítica, são bastante úteis na avaliação da citotoxicidade de um fármaco e representam um modelo preliminar de toxicidade. Eles auxiliam na determinação da dose e do perfil de segurança de uma droga. O MTT é um ensaio utilizado como instrumento de avaliação da viabilidade celular. Ele permite analisar se um dado composto é capaz de induzir dano ao metabolismo celular dos glicídios por meio da avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais. (OLIVEIRA, 2012). Enquanto que o ensaio de atividade hemolítica avalia o potencial que uma droga tem em promover dano à membrana plasmática dos glóbulos vermelhos, seja pela formação de poros na membrana ou pela lise celular total. (LUSTOSA et al., 2016).

É interessante que sejam avaliados os potenciais antioxidantes de compostos naturais, uma vez que eles podem atuar como biomoduladores do sistema imunológico, ativando mecanismos de defesa do hospedeiro, ativando células fagocíticas e auxiliando no combate aos agentes infecciosos (AJITH et al., 2017). Além disso, é de conhecimento que os radicais livres estão relacionados ao desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas, Alzheimer, Parkinson, convulsões e que compostos antioxidantes que ativem enzimas como Sod e Cat atuam no combate aos oxidantes, prolongando a qualidade e expectativa de vida (REUTER ET AL., 2010; TOMÉ ET AL., 2010).

Os compostos fenólicos são os principais representantes antioxidantes produzidos pelas plantas medicinais (COSTA-JÚNIOR et al., 2012). Os antioxidantes apresentam grande aplicabilidade, seja na indústria de alimentos (evita a ocorrência de reações químicas indesejáveis, aumentando a qualidade e tempo de vida útil) (BASANTA et al., 2016), de cosméticos (proteção UV, anti-aging, restauração da homeostase da pele prevenindo a formação de eritemas e reações inflamatórias) (MANSUR et al., 2016) e de medicamentos (anti-aging,

prevenção de doenças infecciosas, cardiovasculares, neurodegenerativas e cânceres) (BECKER et al., 2014).

É importante que esses mecanismos sejam bem elucidados previamente para que estudos subsequentes sejam realizados. Eles são fundamentais na triagem de novos compostos que venham a ser possíveis alternativas ao tratamento da leishmaniose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias utilizadas

Anticoagulante EDTA, solução tampão PBS, água ultrafiltrada e deionizada, dimetilsulfóxido (DMSO 99%), adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha), meio RPMI, soro fetal bovino (SFB), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólico bromo (MTT), Azul de Alamar (Resazurina®), antibióticos Penicilina e Esteptomicina, adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras-teste foram diluídas em DMSO a uma concentração de 80 mg/mL, para a realização dos experimentos.

2.2 Células

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (machos e fêmeas, com idade entre 4 e 6 semanas) mantidos no biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí. Administrou-se 1,5 mL de tioglicolato via intraperitoneal, para indução do processo inflamatório. Após 72 h, os animais foram eutanasiados e mantidos em álcool a 70%, para descontaminação e, posteriormente, na capela de fluxo laminar, foram fixados em placa de cortiça na posição de decúbito dorsal. Administrou-se 8 mL de salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,4), com auxílio de seringa estéril em suas cavidades abdominais. Em seguida, foi realizada massagem suave na região abdominal e aspirado o PBS com macrófagos. O material obtido foi transferido para um tubo Falcon, centrifugado a 1000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. Posteriormente, realizou-se a contagem das células coradas com azul de Trypan (Sigma, EUA) em câmara de Neubauer, para averiguação da viabilidade celular.

Amostra de sangue de carneiro (9 meses de idade), foi coletada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI), localizado em Teresina, PI, Brasil. Todos os protocolos realizados tiveram aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal, parecer Nº 321/17.

As linhagens de *S. cerevisiae* (SodWT, Sod1 Δ , Sod2 Δ , Sod1 Δ Sod2 Δ , Cat1 Δ , Sod1 Δ Cat1 Δ), proficientes e deficientes em superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat), foram cedidas pela Prof. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, do Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica da Universidade Federal do Piauí (Quadro 1).

Quadro 1: Descrição das linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em sod e cat.

LINHAGENS	GENÓTIPO	ORIGEM
EG103 (SodWT)	MATa leu2-3,112 hist 3 Δ 1, trp1-289 ura3-52	
EG118 (Sod1 Δ)	EG103 except Sod1::URA3	
EG110 (Sod2 Δ)	EG103 except Sod2::TRP1	Edith Gralla E, Los Angeles
EG133 (Sod1 Δ Sod2 Δ)	EG103 except Sod1::URA3 Sod2::TRP1	
EG223 (Cat1 Δ)	103 except Cat1::TRP1	
EG (Sod1 Δ Cat1 Δ)	EG103 except Sod1::URA3 Cat1::TRP1	

2.3 Obtenção do extrato, fração e compostos isolados das flores de *P. Insignis*

As amostras utilizadas para a realização dos ensaios biológicos, extrato hidroalcoólico (EHPI), fração acetato de etila (FACoEt), mistura de biflavonóides (MB) e a GFC foram obtidas de acordo com PINHEIRO, 2016.

As flores de *Platonia insignis* Mart. foram coletadas no município de Parnarama, no estado do Maranhão, em agosto de 2014. A exsiccata encontrada depositada no Herbário Graziella Barroso, da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob o número ICN TEPB 27174.

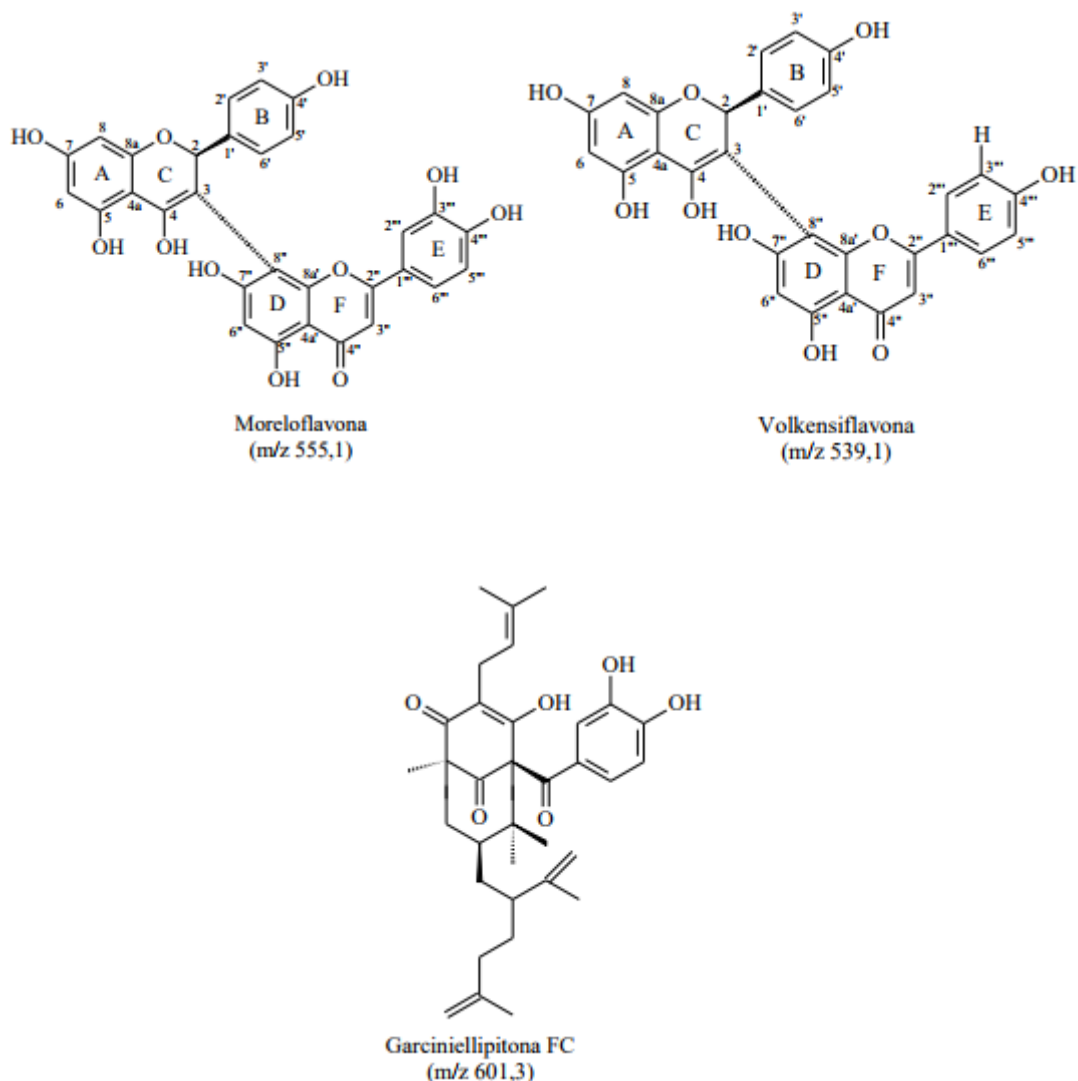
As pétalas das flores frescas da *P. insignis* foram trituradas em moinho de facas, resultando em uma massa de 576,2 g. 300 g desse material permaneceu

em maceração, numa mistura de solvente EtOH/H₂O, na proporção de 7:3 (m/v), na razão de 1:5 de material vegetal/solvente (m/v) a temperatura ambiente, por 9 dias. Após rotaevaporação, para extração do solvente volátil, e liofilização, para retirada do volume residual de água, foram obtidos uma massa de 28,2 g de extrato hidroalcoólico seco, resultando em um η (rendimento) = 9,4%. 14,38 g do EHPi foram resuspensos em MeOH/ H₂O 9:1 (v/v) e submetido a uma partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade. Das frações adquiridas, a fração acetato de etila, FAcOEt, foi obtida com massa de 3,82 g e η =26,56%.

A partir da espectrometria de massas com ionização por eletrospray no modo negativo acoplado a espectrômetro de massas (híbrido ion trap) (ESI-IT-MS) no modo scan, uma mistura de biflavonoides, a morelloflavona e a volkensiflavona, e um acilfloroglucinol policíclico poliprenilado, a garcinialiptona FC, destacaram-se como majoritários no extrato hidroalcoólico.

Para a identificação dos constituintes presentes na fração FAcOEt, foi realizada cromatografia em coluna seca de sílica, obtendo-se uma subfração, eluída com MeOH/H₂O 1: 1 (v/v), apresentando-se na forma de um sólido amarelo amorfo. E, após análise em ESI-MS, no modo de ionização negativo e da realização de RMN, foram evidenciados os compostos morelloflavona, de forma molecular C₃₀H₁₉O₁₁, majoritária e, a volkensiflavona, cuja forma molecular é C₃₀H₁₉O₁₀.

Figura 6: Estruturas dos constituintes químicos identificados no extrato hidroalcoólico das flores de *P. insignis* por ESI-IT-MS



2.4 Determinação da Citotoxicidade

2.4.1 Citotoxicidade sobre macrófagos e Índice de seletividade (IS)

Para a determinação da citotoxicidade das amostras-teste sobre os macrófagos, foi realizado o ensaio do MTT. Em uma placa de 96 poços, 2×10^5 macrófagos, por poço, foram incubados juntamente com 100 μL de meio RPMI (suplementado com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , por 4 horas, para adesão celular. Após esse tempo, retirou-se o sobrenadante, para remoção das células que não

aderiram. Em uma placa espelho, foram realizadas oito diluições seriadas (6,25 a 800 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das amostras (EHPI, FAcEt, IF e GFC) em meio RPMI suplementado. Posteriormente, o conteúdo de cada poço da placa espelho foi transferido para o poço correspondente da placa que continha os macrófagos aderidos, e incubados a 37°C e 5% de CO_2 , por 48 h. Quatro horas antes, 10 μL de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazolium brometo), diluído em 100 μL de RPMI, a 5 mg/mL, foi adicionado por poço, incubou-se, novamente, a placa por 4 h a 37°C e 5% de CO_2 . Decorrido o período de incubação, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 100 μL de DMSO, para dissolução dos cristais de formazan formados, e agitou-se a placa, em agitador de placas Kleine por 30 min. Para determinação da citotoxicidade em macrófagos, a placa foi lida em em leitor de placas Biotek (Elx800) em absorvância de 550 nm. Foi utilizado como controle 0,5% de DMSO. O índice de seletividade de cada amostra foi calculado dividindo a concentração citotóxica média (CC_{50}) pela concentração inibitória média (CI_{50}) (CARNEIRO et al., 2012).

2.4.2 Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro

Para avaliação da atividade hemolítica das amostras-teste, foram utilizados os eritrócitos de carneiro, de acordo com ALVES et al. (2017). A coleta do sangue foi realizada a partir da punção da veia jugular do carneiro, e o sangue foi transferido para tubo com EDTA. Posteriormente, as hemácias foram diluídas em 80 μL de PBS, para ajuste de concentração a 5% de hematócrito. Logo após, as substâncias (EHPI, FAcOEt, MB e GFC) foram adicionadas em concentrações seriadas (6,25 a 800 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), diluídas em 20 μL de PBS. As amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C e, após esse tempo, foi adicionado 200 μL de PBS, para interrupção da reação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, por 10 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura da placa, em absorvância de 550 nm, por meio do leitor de placas Biotek (Elx800). A presença de 100% de hemólise (controle positivo) e a ausência de hemólise (controle negativo) foram determinadas pela substituição das amostras testadas por igual volume de água ultrafiltrada e deionizada e PBS, respectivamente. O percentual de hemólise

obtido foi determinado em comparação com o controle positivo, 100% de hemólise.

2.5 Ensaio antioxidante *in vivo* em levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Para avaliação do potencial antioxidante, a nível celular, foi realizado o ensaio segundo via do metabolismo aeróbico descrito por FRAGOSO et al. (2008). As linhagens de *S. cerevisiae* (Sodwt, Sod1 Δ , Sod2 Δ , Sod1 Δ Sod2 Δ , Cat1 Δ , Sod1 Δ Cat1 Δ), proficientes e deficientes em Superóxido dismutase (Sod) e Catalase (Cat), previamente cultivadas, foram semeadas linearmente em placas de Petri de 90 x 15 mm de diâmetro com swab em meio YEPD sólido (2% de glicose, 2% de de peptona e 1% de extrato de levedura, todos E. Merck). As linhagens foram expostas a diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e fração AcOEt (6,25, 12,5, 25, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para avaliação de quatro condições distintas: atividade oxidante (tratamento), atividade antioxidante (co-tratamento), atividade protetiva ao dano oxidativo (pré-tratamento) e atividade de reversão ao dano oxidativo causado à célula (pós-tratamento). Para o tratamento, aplicou-se 0,01 mL da amostra em disco de papel filtro estéril no centro da placa, para o co-tratamento, aplicou-se 0,005 mL da amostra conjuntamente a 0,005 mL do agente estressor peróxido de hidrogênio, para o pré-tratamento aplicou-se a 0,005 mL da amostra e, após 2 horas, 0,005 mL do agente estressor H₂O₂ e para o pós-tratamento, aplicou-se 0,005 mL do agente estressor H₂O₂ e, após 2 horas, 0,005 mL da amostra. Posteriormente, as placas foram invertidas em 180° e incubadas a 30 °C por 48h em estufa. O halo de inibição do crescimento foi determinado em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro, contado a partir da margem do disco do papel filtro ao início do crescimento celular. Os valores podem variar de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.6 Análise estatística

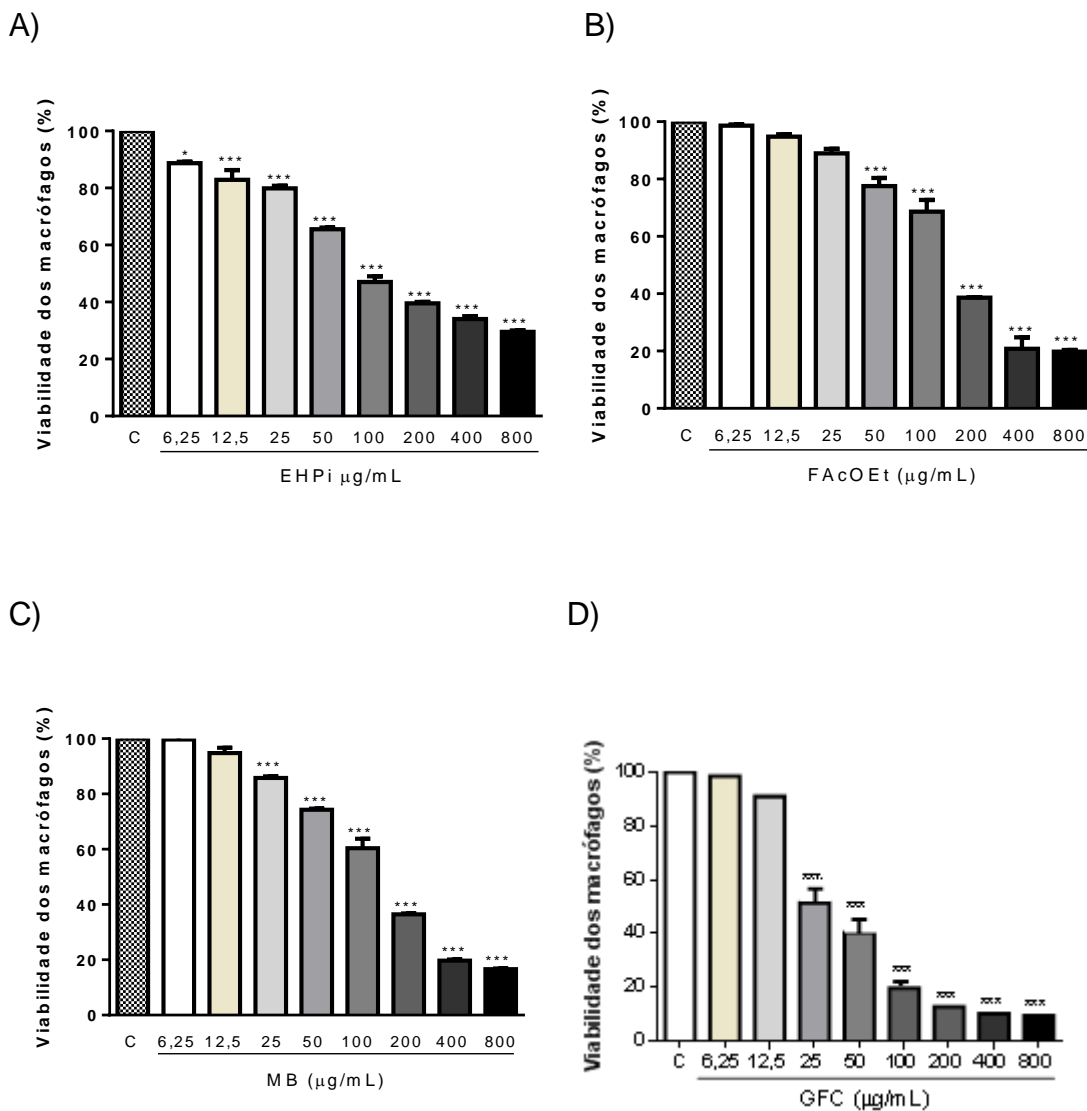
A concentração citotóxica média (CC_{50}) com limite de confiança de 95%, foi calculada utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13,0. As análises de variância foram realizadas por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, por meio do programa *GraphPad Prism* versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística. Para o ensaio antioxidante, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e as análises de variância foram determinadas pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey, do programa *GraphPad Prism* versão 6.0.

3 RESULTADOS

3.1 Citotoxicidade sobre macrófagos

Para avaliação do efeito citotóxico das amostras teste sobre macrófagos murinos, foi realizado o ensaio do MTT. A citotoxicidade foi observada para todas as amostras, e observou-se que é dependente da concentração, ou seja, na medida em que as concentrações das substâncias aumentam, há aumento do efeito citotóxico (FIGURA 7). O EHPi apresentou redução significativa na viabilidade dos macrófagos na menor concentração testada, de 6,25 µg/mL, e apresentou CC_{50} de 81,77 µg/mL. A FAcOEt demonstrou citotoxicidade significativa a partir da concentração de 50 µg/mL, e uma CC_{50} de 159,68 µg/mL. A MB e a GFC apresentaram redução significativa na viabilidade dos macrófagos a partir da concentração de 25 µg/mL, com CC_{50} de 134,28 e 45,20 µg/mL, respectivamente. A GFC foi o composto que apresentou o maior índice de seletividade (39,01), seguida do EHPi (13,44), FAcOEt (9,81) e MB (3,49). Este índice representa o quanto a amostra é mais tóxica para as formas amastigotas do que para os macrófagos murinos.

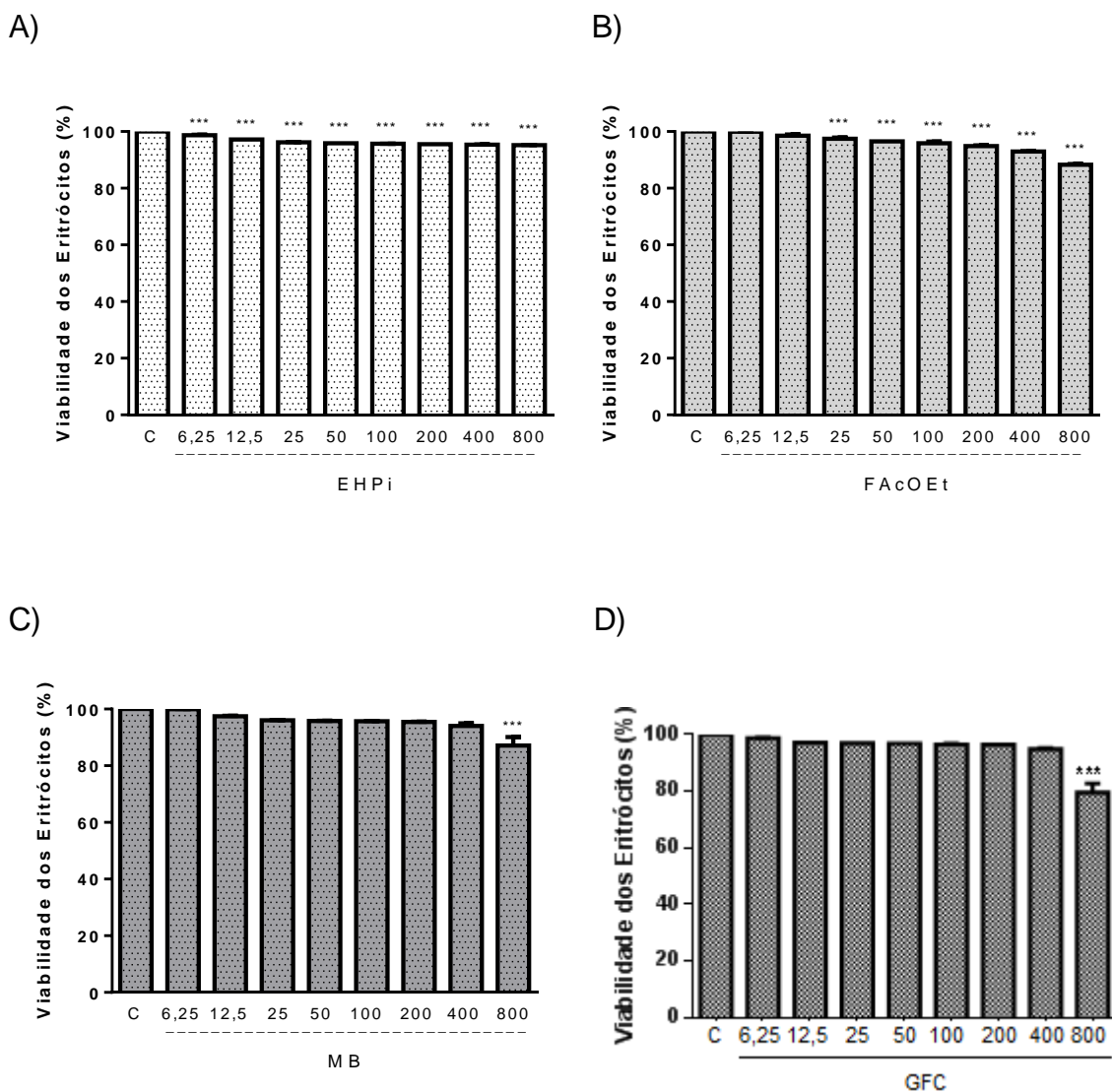
FIGURA 7: Avaliação da citotoxicidade do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) sobre os macrófagos pelo teste do MTT.



3.2 Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro

Na avaliação do efeito citotóxico das amostras teste sobre eritrócitos de carneiro, foi observada citotoxicidade para todas elas. Houve redução na viabilidade celular para o EHPi (6,25 a 800 µg/mL), FAcOEt (25 a 800 µg/mL), MB (800 µg/mL) e GFC (800 µg/mL). A maior redução foi observada para a GFC, 20,42% a 800 µg/mL. Porém, não foi possível calcular a CH_{50} para nenhuma das amostras nas concentrações analisadas.

Figura 8: Avaliação da citotoxicidade do EHPi (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) sobre eritrócitos de carneiro.



3.3 Ensaio antioxidante in vivo em levedura *Saccharomyces cerevisiae*

No presente estudo, as amostras apresentam atividade antioxidante em todas as concentrações analisadas, podendo-se observar aumento da viabilidade celular e consequente diminuição da inibição do crescimento no pré-tratamento, co-tratamento e pós-tratamento, quando comparados aos efeitos oxidativos causados pelo agente estressor, H_2O_2 .

Na condição tratamento, em que apenas a amostra é aplicada no disco de papel filtro, não houve inibição do crescimento em nenhuma das

concentrações analisadas das amostras. Sugerindo, então, que as amostras não apresentam atividade oxidante.

No pré-tratamento, o EHPi foi capaz de auxiliar na prevenção ao dano oxidativo do peróxido de hidrogênio em todas as concentrações, aumentando a viabilidade celular de todas as linhagens. Em concentrações superiores (100 a 400 µg/mL), observa-se maior capacidade protetora. A FAcOEt também apresentou atividade antioxidante em todas as concentrações analisadas, não apresentando diferença significativa entre as concentrações analisadas da FAcOEt (6,25 a 50 µg/mL). As linhagens Cat1Δ (12,5 µg/mL) e a Sod1Δ (50 µg/mL) do EHPi exibiu diferença significativa da SodWT, sugerindo que a ausência da catalase citosólica e da superóxido dismutase citosólica podem ter contribuído para essa diferença (Tabelas 2 e 5).

Para o co-tratamento, onde as amostras são adicionadas conjuntamente ao peróxido de hidrogênio, observou-se que o EHPi e a FAcOEt exerceram ação antioxidante em todas as concentrações analisadas, não sendo observada diferença significativa entre as concentrações analisadas da FAcOEt. Porém, observa-se diferença significativa entre a SodWT (6,25 e 25 µg/mL) com a Cat1Δ do EHPi e SodWT (25 e 50 µg/mL) com a Sod1Δ e a Cat1 da FAcOEt, sugerindo que a catalase e a superóxido dismutase citosólica são enzimas importantes no processo antioxidante da FAcOEt e a catalase citosólica para o EHPi, para essas concentrações (Tabelas 3 e 6).

Na condição do pós-tratamento, observou-se que as amostras foram capazes de auxiliar na reversão do dano oxidativo causado pelo agente estressor em todas as concentrações analisadas, com redução da inibição do crescimento das linhagens de *S. cerevisiae*. Assim como para os demais testes, não foi observado diferença significativa entre as concentrações analisadas da FAcOEt, indicando que a menor concentração analisada (6,25 µg/mL) já exerce efeito tão significativo quanto a maior (50 µg/mL). As maiores concentrações analisadas do EHPi (100 a 400 µg/mL) apresentaram o maior potencial antioxidante, não sendo observada diferença significativa entre essas três concentrações. No entanto, observou-se diferença significativa entre a SodWT (6,25, 25 e 50 µg/mL) e a Cat1Δ do EHPi e a SodWT (50 µg/mL) com a Cat1Δ da FAcOEt (50), sugerindo que a catalase citosólica é uma enzima importante na reversão aos danos causados pelo H₂O₂. (Tabelas 4 e 7).

Quadro 2. Avaliação da prevenção do EHPI frente ao dano oxidativo causado pelo agente estressor às linhagens de *S. cerevisiae* comparados ao H₂O₂ e a SodWT.

Pré-tratamento						
Grupo (µg/mL)	Linhagens					
	SodWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1Δ Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
H ₂ O ₂	28.5 ± 1.44	30.25 ± 0.85	32.00 ± 0.40	33.00 ± 1.22	30.50 ± 0.64	33.25 ± 0.63
Salina	1.50 ± 0.29	1.00 ± 0.82	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.28	1.50 ± 0.29
6,25 + H ₂ O ₂	6.25 ± 1.44 ^a	7.00 ± 0.91 ^a	4.00 ± 0.82 ^a	2.00 ± 1.08 ^a	6.25 ± 0.63 ^a	4.25 ± 0.95 ^a
12,5 + H ₂ O ₂	3.25 ± 1.31 ^a	5.75 ± 1.25 ^a	4.00 ± 1.96 ^a	6.00 ± 1.08 ^a	9.00 ± 0.58 ^{ab}	3.25 ± 0.75 ^a
25 + H ₂ O ₂	4.00 ± 1.08 ^a	5.00 ± 0.58 ^a	1.50 ± 1.50 ^a	5.50 ± 1.68 ^a	4.75 ± 2.50 ^a	5.25 ± 1.11 ^a
50 + H ₂ O ₂	2.68 ± 0.75 ^a	7.91 ± 0.75 ^{ab}	2.56 ± 0.57 ^a	2.34 ± 0.53 ^a	4.94 ± 0.83 ^a	3.94 ± 1.78 ^a
100 + H ₂ O ₂	2.75 ± 0.25 ^a	2.00 ± 0.41 ^a	2.75 ± 0.25 ^a	2.50 ± 0.50 ^a	1.75 ± 0.25 ^a	2.00 ± 0.00 ^a
200 + H ₂ O ₂	3.50 ± 0.29 ^a	2.00 ± 0.41 ^a	1.75 ± 0.25 ^a	1.75 ± 0.25 ^a	2.00 ± 0.58 ^a	1.75 ± 0.48 ^a
400 + H ₂ O ₂	0.87 ± 0.43 ^a	0.62 ± 0.24 ^a	0.87 ± 0.24 ^a	1.25 ± 0.48 ^a	0.87 ± 0.24 ^a	1.12 ± 0.43 ^a

a: diferença estatisticamente significativa ao agente estressor (H₂O₂); b: diferença estatisticamente significativa à SodWT.

Quadro 3. Efeito antioxidante do EHPI em linhagens de *S. cerevisiae* comparados ao H₂O₂ e a SodWT.

Co-tratamento						
Grupo	Linhagens					
	SodWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1Δ Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
H ₂ O ₂	28.5 ± 1.44	30.25 ± 0.85	32.00 ± 0.40	33.00 ± 1.22	30.50 ± 0.64	33.25 ± 0.63
Salina	1.50 ± 0.29	1.00 ± 0.82	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.28	1.50 ± 0.29
H ₂ O ₂ + 6,25	2.25 ± 1.11 ^a	4.00 ± 0.82 ^a	1.50 ± 0.87 ^a	3.00 ± 0.71 ^a	7.25 ± 0.63 ^{ab}	3.75 ± 0.75 ^a
H ₂ O ₂ + 12,5	5.00 ± 0.91 ^a	3.00 ± 0.70 ^a	2.75 ± 1.89 ^a	2.75 ± 1.55 ^a	7.50 ± 1.71 ^a	4.50 ± 1.32 ^a
H ₂ O ₂ + 25	5.00 ± 0.71 ^a	7.25 ± 1.93 ^a	7.50 ± 0.96 ^a	7.50 ± 1.85 ^a	11.00 ± 1.35 ^{ab}	6.00 ± 1.22 ^a
H ₂ O ₂ + 50	6.50 ± 1.85 ^a	9.00 ± 0.70 ^a	9.75 ± 1.80 ^a	8.25 ± 1.75 ^a	12.25 ± 2.29 ^a	7.50 ± 0.50 ^a
H ₂ O ₂ + 100	5.79 ± 1.67 ^a	4.40 ± 0.53 ^a	4.52 ± 0.42 ^a	3.14 ± 0.43 ^a	2.85 ± 0.61 ^a	3.35 ± 0.81 ^a
H ₂ O ₂ + 200	2.02 ± 0.14 ^a	2.85 ± 0.48 ^a	1.85 ± 0.61 ^a	2.80 ± 0.60 ^a	2.32 ± 0.76 ^a	2.27 ± 0.27 ^a
H ₂ O ₂ + 400	3.25 ± 0.84 ^a	2.17 ± 0.71 ^a	1.72 ± 0.41 ^a	3.02 ± 0.45 ^a	2.72 ± 0.62	2.37 ± 0.57 ^a

a: diferença estatisticamente significativa ao H₂O₂; b: diferença estatisticamente com SodWT.

Quadro 4. Avaliação da reparação do dano oxidativo do EHPi em linhagens de *S. cerevisiae* comparados ao H₂O₂ e a SodWT.

Grupo (µg/mL)	Pós-tratamento					
	Linhagens					
	SodWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1Δ Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
H ₂ O ₂	28.5 ± 1.44	30.25 ± 0.85	32.00 ± 0.40	33.00 ± 1.22	30.50 ± 0.64	33.25 ± 0.63
Salina	1.50 ± 0.29	1.00 ± 0.82	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.28	1.50 ± 0.29
H ₂ O ₂ + 6,25	2.25 ± 1.11 ^a	4.00 ± 0.82 ^a	2.00 ± 0.71 ^a	3.00 ± 0,71 ^a	7.25 ± 0.63 ^{ab}	2.25 ± 1.11 ^a
H ₂ O ₂ + 12,5	4.75 ± 0.85 ^a	3.00 ± 0.70 ^a	2.75 ± 1.03 ^a	2.75 ± 1.55 ^a	7.50 ± 1.70 ^a	5.50 ± 1.20 ^a
H ₂ O ₂ + 25	4.50 ± 0.29 ^a	5.00 ± 0.71 ^a	6.25 ± 1.65 ^a	7.50 ± 1.85 ^a	11.00 ± 1.35 ^{ab}	5.25 ± 0.95 ^a
H ₂ O ₂ + 50	5.50 ± 0.29 ^a	5.00 ± 1.96 ^a	7.12 ± 0.51 ^a	7.87 ± 1.12 ^a	13.25 ± 0.85 ^{ab}	6.50 ± 1.85 ^a
H ₂ O ₂ + 100	0.50 ± 0.29 ^a	0.12 ± 0.12 ^a	0.87 ± 0.24 ^a	1.00 ± 0.54 ^a	0.75 ± 0.25 ^a	1.00 ± 0.54 ^a
H ₂ O ₂ + 200	0.50 ± 0.20 ^a	0.50 ± 0.20 ^a	0.50 ± 1.12 ^a	0.87 ± 0.31 ^a	0.87 ± 0.37 ^a	0.87 ± 0.31 ^a
H ₂ O ₂ + 400	0.75 ± 0.14 ^a	0.50 ± 0.35 ^a	0.50 ± 0.62 ^a	1.00 ± 0.20 ^a	0.87 ± 0.12 ^a	1.00 ± 0.20 ^a

a: diferença estatisticamente significativa ao H₂O₂; b: diferença estatisticamente com SodWT.

Quadro 5. Efeito antioxidante da FAcOEt quando administrado duas horas antes do agente estressor em linhagens de *S. cerevisiae* comparados ao CN.

Grupo (µg/mL)	Pré-tratamento					
	Linhagens					
	SodWT	Sod1Δ	Sod2Δ	Sod1Δ Sod2Δ	Cat1Δ	Sod1ΔCat1Δ
H ₂ O ₂	28.50 ± 1.44	30.25 ± 0.85	32.00 ± 0.40	33.00 ± 1.22	30.50 ± 0.64	33.25 ± 0.63
Salina	1.50 ± 0.29	1.00 ± 0.82	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.29	1.50 ± 0.28	1.50 ± 0.29
6,25 + H ₂ O ₂	4.25 ± 1.11 ^a	2.50 ± 0.29 ^a	1.25 ± 0.48 ^a	1.25 ± 0.48 ^a	6.50 ± 1.55 ^a	4.50 ± 0.29 ^a
12,5 + H ₂ O ₂	4.25 ± 1.50 ^a	3.75 ± 1.31 ^a	1.75 ± 1.03 ^a	2.75 ± 0.85 ^a	6.00 ± 1.08 ^a	3.00 ± 1.22 ^a
25 + H ₂ O ₂	4.50 ± 1.32 ^a	4.25 ± 1.11 ^a	3.50 ± 1.32 ^a	2.75 ± 1.70 ^a	2.00 ± 1.68 ^a	4.50 ± 0.87 ^a
50 + H ₂ O ₂	2.75 ± 1.89 ^a	1.75 ± 1.18 ^a	1.25 ± 0.63 ^a	1.75 ± 0.75 ^a	3.75 ± 0.95 ^a	4.50 ± 0.29 ^a

a: diferença estatisticamente significativa ao H₂O₂; b: diferença estatisticamente com SodWT.

Quadro 6. Avaliação da ação antioxidante da FAcOEt quando administrado conjuntamente ao H₂O₂ em linhagens de *S. cerevisiae* frente ao H₂O₂ e a SodWT.

Co-tratamento						
Grupo ($\mu\text{g/mL}$)	Linhagens					
	SodWT	Sod1 Δ	Sod2 Δ	Sod1 Δ Sod2 Δ	Cat1 Δ	Sod1 Δ Cat1 Δ
H ₂ O ₂	28.5 \pm 1.44	30.25 \pm 0.85	32.00 \pm 0.40	33.00 \pm 1.22	30.50 \pm 0.64	33.25 \pm 0.63
H ₂ O ₂ + Salina	1.50 \pm 0.29	1.00 \pm 0.82	1.50 \pm 0.29	1.50 \pm 0.29	1.50 \pm 0.28	1.50 \pm 0.29
H ₂ O ₂ + 6,25	0.85 \pm 0.11 ^a	4.40 \pm 0.86 ^a	1.86 \pm 0.89 ^a	1.18 \pm 0.86 ^a	7.49 \pm 2.08 ^a	0.66 \pm 0.27 ^a
H ₂ O ₂ + 12,5	0.64 \pm 0.26 ^a	2.84 \pm 0.99 ^a	1.26 \pm 0.80 ^a	1.95 \pm 0.50 ^a	4.96 \pm 1.11 ^a	0.87 \pm 0.41 ^a
H ₂ O ₂ + 25	1.26 \pm 0.52 ^a	10.12 \pm 1.28 ^{ab}	2.02 \pm 0.50 ^a	1.26 \pm 0.30 ^a	10.46 \pm 0.78 ^{ab}	0.44 \pm 0.44 ^a
H ₂ O ₂ + 50	3.38 \pm 1.18 ^a	9.51 \pm 0.84 ^{ab}	3.61 \pm 1.19 ^a	3.27 \pm 1.16 ^a	11.17 \pm 1.35 ^{ab}	1.21 \pm 0.82 ^a

a: diferença estatisticamente significativa ao H₂O₂; b: diferença estatisticamente significativa à SodWT.

Quadro 7. Avaliação da ação da FAcOEt frente ao H₂O₂ em linhagens de *S. cerevisiae* comparados ao H₂O₂ e a SodWT.

Pós-tratamento						
Grupo ($\mu\text{g/mL}$)	Linhagens					
	SodWT	Sod1 Δ	Sod2 Δ	Sod1 Δ Sod2 Δ	Cat1 Δ	Sod1 Δ Cat1 Δ
H ₂ O ₂	28.5 \pm 1.44	30.25 \pm 0.85	32.00 \pm 0.40	33.00 \pm 1.22	30.50 \pm 0.64	33.25 \pm 0.63
H ₂ O ₂ + Salina	1.50 \pm 0.29	1.00 \pm 0.82	1.50 \pm 0.29	1.50 \pm 0.29	1.50 \pm 0.28	1.50 \pm 0.29
H ₂ O ₂ + 6,25	4.25 \pm 1.89 ^a	4.25 \pm 0.75 ^a	0.50 \pm 0.50 ^a	0.50 \pm 0.50 ^a	5.75 \pm 1.44 ^a	0.00 \pm 0.00 ^a
H ₂ O ₂ + 12,5	4.00 \pm 1.47 ^a	3.50 \pm 0.87 ^a	0.75 \pm 0.48 ^a	0.75 \pm 0.75 ^a	5.75 \pm 2.32 ^a	1.50 \pm 0.95 ^a
H ₂ O ₂ + 25	4.75 \pm 1.31 ^a	5.25 \pm 2.14 ^a	4.50 \pm 1.26 ^a	3.25 \pm 1.10 ^a	3.75 \pm 1.31 ^a	1.75 \pm 1.03 ^a
H ₂ O ₂ + 50	2.50 \pm 0.87 ^a	5.00 \pm 2.61 ^a	1.00 \pm 0.70 ^a	2.25 \pm 2.25 ^a	8.50 \pm 0.87 ^{ab}	4.50 \pm 2.63 ^a

a: diferença estatisticamente significativa ao H₂O₂; b: diferença estatisticamente com SodWT.

4 DISCUSSÃO

Os ensaios toxicológicos *in vitro*, como atividade hemolítica e MTT, são testes preliminares bastante úteis na avaliação da citotoxicidade de compostos e definição da concentração a ser usada em fases posteriores no desenvolvimento de drogas (LUSTOSA et al., 2016). Diante dos ensaios realizados, a GFC foi a substância que apresentou o maior potencial citotóxico sobre os macrófagos murinos, com CC_{50} de 45,199 $\mu\text{g/mL}$ e a FAcOEt o menor, com CC_{50} de 134,280 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a MB e o EHPi apresentaram valores de CC_{50} intermediários. Por sua vez, não foi possível determinar a CH_{50} para as amostras nas concentrações analisadas, estando, possivelmente, em concentrações bastante superiores a 800 $\mu\text{g/mL}$.

Ensaio de citotoxicidade com o extrato hexânico das sementes dos frutos do bacuri apresentaram resultados semelhantes, com CC_{50} de 90,03 $\mu\text{g/ml}$ para macrófagos murinos, com intervalo de confiança entre 70,72 e 114,6 $\mu\text{g/ml}$ e 3% de hemólise em eritrócitos humanos, na concentração de 400 $\mu\text{g/ml}$ (LUSTOSA et al., 2016). Segundo SILVA et al. (2015), o ensaio de MTT realizado com células Vero não demonstrou citotoxicidade para GFC nas concentrações testadas de 0,78 a 50 μM . Entretanto, PRADO et al. (2016) demonstrou que a GFC reduz a viabilidade das células HepG2 (linhagem celular de carcinoma hepático humano) abaixo de 20% quando utilizada em concentrações acima de 30 $\mu\text{g/ml}$ e COSTA-JÚNIOR et al. (2012), ao analisar a citotoxicidade da GFC na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ em duas linhagens de células tumorais, Hep-2 (linhagem celular de carcinoma da laringe humana), NCI-H-292 (linhagem celular de carcinoma mucoepidermóide humano), avaliou que houve redução da viabilidade celular em $77,8\pm 6,9\%$ e $88,2\pm 0,7\%$, respectivamente. Estes dados confirmam os resultados do presente estudo, demonstrando que, em determinadas concentrações, a GFC apresenta citotoxicidade para algumas linhagens celulares.

Trabalhos anteriores têm demonstrado que as benzofenonas poliisopreniladas e os biflavonóides, morelloflavona e volkensiflavona, isolados da Família Clusiaceae, apresentam elevado potencial farmacológico. Efeito citotóxico *in vitro* e *in vivo* para células cancerígenas humanas, como as células

leucêmicas (HL-60) e as células de carcinomas oral (KB), têm sido reportado às benzofenonas poli-isopreniladas (KUMAR et al., 2013 e PRADO et al., 2016).

A investigação do potencial antioxidante de compostos naturais é outro parâmetro importante a ser analisado. Por meio de estudos *in vivo*, como o modelo experimental de *S. cerevisiae*, pode-se avaliar o efeito antioxidante sobre a viabilidade celular. Os danos oxidativos às moléculas orgânicas são semelhantes em todos os níveis de organização celular. As leveduras de *S. cerevisiae* apresentam mecanismos de defesa antioxidantes análogos aos dos organismos superiores, além de constituírem modelo experimental rápido, sensível, econômico e reprodutível (OLIVEIRA, 2015; SOARES et al., 2004).

Compostos antioxidantes podem exercer sua ação por meio da eliminação direta de espécies reativas, por inibição da geração dessas espécies, como também por meio da ativação de mecanismos que regulam a expressão de genes codificadores, aumentando a expressão de enzimas, como a superóxido dismutase e catalase (COSTA; MORADAS-FERREIRA, 2001).

Em seres eucarióticos podem ser encontrados diversas enzimas antioxidantes. Dentre elas, dois tipos de Sod (superóxido dismutase), a CuZnSod (citoplasmática) e a MnSod (mitocondrial), que atuam na remoção do radical superóxido (O_2^-) e a Cat (catalase), que atua na desintoxicação, pela conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos no Reino Plantae. Dentre esses compostos, destacam-se os flavonoides com elevado potencial antioxidante em função da sua estrutura química, sequestrando radicais livres e prevenindo processos oxidativos (ROCHA et al., 2011, ALENCAR et al., 2014). No estudo realizado por PINHEIRO (2016), demonstrou-se que o EHPi e a FAcOEt são ricos em fenóis ($1511,20 \pm 13,41$ e $2650,10 \pm 13,41$ mg EAG g MVA⁻¹, respectivamente) e flavonoides totais ($157,70 \pm 0,29$ e $237,90 \pm 0,86$ mg EQ g MVA⁻¹) e apresentam uma mistura de biflavonas (morelloflavona e volkensiflavona) como constituintes majoritários (PINHEIRO, 2016).

O EHPi e a FAcOEt preveniram e reverteram o dano oxidativo causado às células pelo agente estressor e não apresentaram atividade oxidante em nenhuma das concentrações analisadas, demonstrando elevada capacidade antioxidante *in vivo*. Frações acetato de etila e diclorometano obtidas das sementes do bacuri também aumentaram a viabilidade das leveduras de *S. cerevisiae* quando realizado o co-tratamento com H₂O₂. A ação antioxidante se deu independente do aumento da concentração. A fração acetato de etila teve ação significativa para as linhagens Sod2Δ (50, 100, 250 e 500 µg/mL), Sod1ΔSod2Δ (100, 250 e 500 µg/mL), Cat1Δ (500 µg/mL) e Sod1ΔCat1Δ (50, 100, 250 e 500 µg/mL), apresentando-se mais eficaz que a fração diclorometano, com ação significativa para as linhagens Sod1ΔSod2Δ (500 µg/mL), Cat1Δ (100, 250 e 500 µg/mL) e Sod1ΔCat1Δ (500 µg/mL) (COSTA-JÚNIOR et al., 2013).

Estudo *in vivo* anteriormente realizado por COSTA-JÚNIOR et al., (2011), demonstrou aumento significativo de SOD no hipocampo de ratos pré-tratados com fração acetato de etila COSTA-JÚNIOR et al., (2012) como também demonstraram o possível mecanismo antioxidante da GFC, com a eliminação do radical O₂⁻, com subsequente decaimento dos níveis de H₂O₂ e aumento dos níveis de SOD no hipocampo.

Compostos naturais que atuem estimulando mecanismos que reduzem ou controlam os níveis de radicais livres são desejáveis como potenciais terapias preventivas de diversas doenças.

5 CONCLUSÃO

As amostras produzidas a partir das flores do bacuri apresentaram certo potencial citotóxico para os macrófagos, células que apresentam papel crucial no mecanismo de defesa da leishmaniose, e não foi observada citotoxicidade para as hemácias dentro a faixa de concentração testada. Além disso, o extrato e a fração demonstraram ações antioxidantes capazes de proteger a célula contra o dano oxidativo e reverter esse dano causado por um agente estressor.

O bacuri é uma planta que apresenta grande potencial químico-farmacológico. Estudos adicionais são necessários a fim de caracterizar e elucidar os mecanismos de ação envolvidos no combate aos radicais livres, garantindo a segurança do seu uso e visando também o desenvolvimento de um fármaco seguro e eficaz.

Capítulo II - Ensaio de atividade antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de *Platonia insignis* Mart.

BEZERRA, É. A.^{a*}; PINHEIRO, E. E. A.^b; ALVES, M. M. M.^c; AMORIM, L. V.^c; LIMA NETO, J. S.^b; CARVALHO, F. A. A.^{a,c}; CITÓ, A.M.G.L.^{a,b}; ARCANJO, D. D. R.^{a,c}
Ensaio de atividade antileishmania e imunomoduladora do extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila e compostos isolados das flores de *Platonia insignis* Mart.

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, CEP 64049-550, Teresina, PI, Brasil. *erikka.ab@gmail.com

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Piauí, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil

^cNúcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, CEP 64049-550 Teresina, PI, Brasil

RESUMO

As plantas são fontes promissoras para a síntese de uma grande variedade de novos fármacos, em virtude da magnitude da biodiversidade e da quantidade de compostos químicos biologicamente ativos que apresentam. Nesse contexto, grupos de pesquisa da Universidade Federal do Piauí tem direcionado estudos para a *Platonia insignis* Mart., rica em compostos químicos, como a garcinielliptona FC (GFC) e as biflavonas volkensiflavona e morelloflavona, que apresentam propriedades farmacológicas descritas. Portanto, este estudo teve o objetivo de avaliar as propriedades antileishmania e imunomoduladora do EHPi, FAcOEt, MB e GFC produzidos a partir das flores de *P. insignis*. A GFC apresentou o maior poder de redução da viabilidade de formas promastigotas (IC₅₀ de 8,48 µg/mL) e amastigotas (IC₅₀ de 1,15 µg/mL) de *L. amazonensis*. Para formas promastigotas a FAcOEt, o EHPi e MB apresentaram IC₅₀ de 23,05, 30,80 e 45,71 µg/mL, respectivamente. O EHPi (30 µg/mL) e a FAcOEt (60 µg/mL) reduziram a infecção de macrófagos, porém não foram capazes de reduzir a infectividade de maneira expressiva. Na avaliação dos mecanismos de imunomodulação de macrófagos, o EHPi promoveu aumento da atividade lisossomal, enquanto a FAcOEt e a MB foram capazes de promover aumento da atividade lisossomal, da capacidade fagocítica e da produção de nitrito. A GFC promoveu ativação de macrófagos por meio do aumento da capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico. Portanto, conclui-se que a GFC apresenta significativo potencial antileishmania, demonstrado pela maior seletividade para o parasito, indicando uma menor citotoxicidade para macrófagos e eritrócitos. O EHPi, a FAcOEt e a MB podem ser utilizados como uma terapia de suporte à quimioterapia convencional antileishmania, pois demonstraram ser proponentes imunostimuladores que auxiliariam no combate ao hospedeiro. Portanto, a *Platonia insignis* é uma espécie cujos produtos são fontes promissoras para o desenvolvimento de formulações a serem testadas em modelos experimentais de infecção *in vivo* para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: *Platonia insignis*, extrato hidroalcoólico, fração acetato de etila, GFC, mistura de biflavonas, atividade antileishmania, imunomodulação.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais apresentam uma grande variedade de compostos químicos oriundos do metabolismo secundário com atividades farmacológicas importantes. Nesse contexto, a busca por compostos antileishmania tem demonstrado que produtos derivados de plantas medicinais têm sido promissoras fontes na atividade antileishmania (CARVALHO et al., 2017).

O parasita da leishmaniose tem a capacidade de invadir os macrófagos e utilizá-lo como lugar de replicação e disseminação. É importante que esses compostos bioativos apresentem maior seletividade, com potencial citotóxico sobre o parasita, que sejam capazes de ativar macrófagos, induzindo aumento da síntese de óxido nítrico, da capacidade fagocítica e do volume lisossomal, além de sinalizar as citocinas a conduzir o linfócito precursor Th0 a polarizar para a via de diferenciação Th1, e inibir a via Th2. Como resposta, haverá maior produção de IL-12, IFN- γ , que apresentam papel importante na ativação de macrófagos infectados intracelularmente e retroalimentação positiva sobre outros LTh0 a direcionar a resposta para Th1 (MESQUITA-JÚNIOR et al., 2010; ISLAMIDDIN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015).

Nesse contexto, é interessante que as novas alternativas terapêuticas apresentem além do efeito citotóxico, a capacidade de modular sinergicamente a resposta imune dos macrófagos para combater o parasita.

Platonia insignis Mart., amplamente utilizada em nossa região, é rica em compostos bioativos que apresentam ações farmacológicas diversas, como antileishmania, antioxidante e imunomoduladora (COSTA-JÚNIOR et al., 2011; COSTA-JÚNIOR et al., 2012; LUSTOSA et al., 2016). Diversos estudos têm sido direcionados a essa espécie, entretanto, as pesquisas com a flor ainda são escassas e ela representa um potencial a ser explorado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Substâncias utilizadas

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas as seguintes substâncias: o meio de cultura Schneider's, obtido da Sigma, EUA, o meio RPMI, o Soro fetal bovino (SFB), o dimetilsulfóxido, (DMSO a 99%), obtido da Merck Chemical Company, Alemanha, o MTT, (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio bromo, o Azul Alamar (Resazurina®), os antibióticos Penicilina e Estreptomicina, adquiridos da Sigma Chemical (Sigma Aldrich Brasil). O extrato hidroalcoólico (EHPi), a garcinielliptona FC (GFC), a fração acetato de etila (FAcOEt), e, a partir dela, a mistura de dois biflavonóides (MB), morelloflavona e volkensiflavona, foram obtidos conforme descrito no Capítulo I, seção 2.3 deste trabalho. As amostras obtidas da *Platonia insignis* foram diluídas em DMSO, atingindo uma concentração final de 80 mg/mL para execução dos testes.

2.2 Equipamentos e materiais utilizados

Para realização dos ensaios, foram utilizados os seguintes equipamentos: estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.), agitador de placas (CERTOMAT® MO II), leitor de placas Biotek (ELx800), capela de fluxo laminar, microscópio óptico, microscópio óptico invertido. Bem como, os seguintes materiais: placas de 96 poços, placas de 24 poços, lamínulas de 13 mm, tubos Falcon, Câmara de Neubauer, pipeta volumétrica multicanal, pipeta volumétrica, eppendorf, ponteiros, placa de Petri, seringa, agulha, garrafas de cultivo celular, criotubo.

2.3 Parasitas e células

Foram utilizadas as cepas da espécie *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8), pertencentes ao Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA) do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais da Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI), e mantidas em passagens sucessivas em camundongos BALB/c para realização dos ensaios de atividade antileishmania. O cultivo das

formas promastigotas se deu em meio Schneider's suplementado (10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) incubado em estufa B.O.D a 26 °C. Enquanto que o cultivo das formas amastigotas se deu em meio Schneider's suplementado (20% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) incubado em estufa B.O.D a 34 °C, obtidos após transformação *in vitro* das formas promastigotas (CARNEIRO et al., 2012). Macrófagos murinos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c machos e fêmeas, com 4 a 5 semanas de vida, provenientes do biotério setorial do NPPM/UFPI.

2.4 Atividade antileishmania do EHPi, FAcOEt, MB e GFC sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*

Para determinação da atividade antileishmania, o ensaio foi realizado com as formas promastigotas na fase logarítmica de crescimento. Para tal, 1×10^6 parasitos foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo 100 µL de meio Schneider's suplementado por poço. Posteriormente, as amostras foram adicionadas aos poços em triplicata, e realizadas diluições seriadas (800 a 6,25 µg/mL). Logo após, as placas foram incubadas em estufa B. O. D., a 26 °C por 48 h. Faltando 6 h para o término das 48 h, 20 µL de resazurina 1×10^{-3} mol/L foram adicionados aos poços. Ao controle positivo, foram adicionados, a cada poço, 2 µg/mL de anfotericina B diluído em meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas. Ao controle negativo, apenas 1×10^6 promastigotas (100% de viabilidade). Passadas as 48 h, a placa foi lida em leitor de placa Biotek (ELx800), a 550 nm. Os resultados foram expressos em termos de inibição de crescimento (IC_{50}). Foi realizada a leitura do branco, contendo apenas o meio Schneider's, para descartar possíveis interferências da sua absorbância (CARNEIRO et al., 2012).

2.5 Atividade antileishmania do EHPi, FAcOEt, MB e GFC sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis*

Para a realização do ensaio, os macrófagos foram plaqueados na concentração de 2×10^5 células/poço em meio RPMI suplementado (10 % SFB, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$) em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas estéreis de 13 mm e incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 por 3 h, para adesão celular. Os macrófagos aderidos foram incubados a 5% de CO_2 e 37 °C, em novo meio contendo as formas promastigotas (2×10^6) em fase de crescimento estacionária, na razão de 10 promastigotas para 1 macrófago, por 4 horas. Posteriormente, o meio foi aspirado para a remoção dos parasitas não internalizados. Após infecção, os poços foram lavados com PBS. As placas foram então incubadas com as amostras EHPi (7,5, 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$), FAcOET (15, 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$), MB (15, 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$) e GFC (1,5, 3 e 6 $\mu\text{g/mL}$) e Anfotericina B a 0,2 $\mu\text{g/mL}$ por 48 horas. Essas concentrações utilizadas não apresentam relevante toxicidade para as células e foram baseadas nos valores de IC_{50} . Posteriormente, as lamínulas foram removidas e coradas com Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). O número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos foram determinadas pela leitura do número de parasitas em 100 macrófagos utilizando microscopia óptica. Depois, o índice de seletividade foi determinado pela razão entre a CC_{50} para macrófagos pela EC_{50} para amastigotas internalizadas em macrófagos (OLIVEIRA et al., 2017). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

2.6 Avaliação de mecanismos de ativação de macrófagos

2.6.1. Preparo de soluções

A solução corante de vermelho neutro (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), utilizada para realização dos ensaios dos itens 2.6.2, 2.6.3 e 2.6.4, foi preparada a partir da solubilização de 0,002 g do corante com 1 mL de DMSO. A solução de extração, utilizada para a realização dos ensaios dos itens 2.6.2 e 2.6.3, é produzida a partir de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etano P.A (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA),

utilizado no ensaio do teste do item 2.6.3, foi produzido a partir da diluição de 0,3 mL da solução corante de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS. O fixador Baker formol-cálcio, é formado de formaldeído a 4% (p/v) e acetato de cálcio a 1% (p/v) em água destilada (GRANDO et al., 2009).

2.6.2 Avaliação da atividade lisossomal

Para avaliação da atividade lisossomal, 2×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, foram plaqueados em uma placa contendo 96 poços e incubados por 4 h a 37 °C e a 5% de CO₂, para os macrófagos aderirem a placa. Decorrido esse tempo, retirou-se o sobrenadante, para eliminação dos macrófagos não aderidos, e adicionou-se, em diluições seriadas, EHPI, FAcOEt e MB atingindo concentrações finais de 90 a 5,625 µg/mL e concentrações de 45 a 2,812 µg/mL para GFC. As placas foram, então, incubadas por 48 h a 37 °C e a 5% de CO₂. Posteriormente, adicionou-se 10 µL de solução vermelho neutro a 2% de DMSO e foram incubadas por mais 30 min. Logo após, descartou-se o sobrenadante e os poços foram lavados com solução salina a 0,9% a 37 °C e adicionou-se 100 µL de solução de extração, para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas lisossomais. As placas foram colocadas no agitador de Kleine, por 30 min, e, posteriormente, lidas no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm. Foi utilizado como controle 0,5% de DMSO em meio RPMI (GRANDO et al., 2009).

2.6.3 Determinação da capacidade fagocítica

Para a determinação da capacidade fagocítica dos macrófagos, 2×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, por poço, foram plaqueados em placa de 96 poços e incubados por 4 h a 37 °C e 5% de CO₂, para adesão celular. Logo após, retirou-se o sobrenadante, para eliminação dos macrófagos não aderidos, e adicionou-se, em diluições seriadas, EHPI, FAcOEt e MB

atingindo concentrações finais de 90 a 5,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e concentrações de 45 a 2,812 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para GFC. As placas foram, então, incubadas por 48 h a 37 °C e a 5% de CO_2 . Posteriormente, adicionou-se 10 μL de zimosan corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 min. Transcorrido esse tempo, adicionou-se 100 μL de fixador de Baker, para interromper o processo de fagocitose e, 30 min após, retirou-se o sobrenadante e os poços foram lavados com solução salina 0,9%, para remoção do zimosan e o vermelho neutro que não foram fagocitados pelos macrófagos. O sobrenadante foi, novamente, removido e adicionou-se 100 μL de solução de extração. As placas foram colocadas em agitador Kline, por 30 min, para solubilização, e lidas em leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm. 0,5% de DMSO em meio RPMI foi utilizado como controle (BONATTO et al, 2004).

2.6.4 Avaliação da produção de nitrito

Para avaliação da produção de nitrito pelos macrófagos, 2×10^5 macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, foram plaqueados em uma placa contendo 96 poços e incubados por 4 h a 37 °C e a 5% de CO_2 , para os macrófagos aderirem a placa. Decorrido esse tempo, retirou-se o sobrenadante, para eliminação dos macrófagos que não aderiram, e adicionou-se, em diluições seriadas, EHPI, FAcOEt, MB atingindo as concentrações finais de 5,625 a 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de 2,812 a 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para GFC, na presença e na ausência de formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 1×10^6 por poço. As placas foram, então, incubadas por 24 h a 37 °C e a 5% de CO_2 . Posteriormente, os sobrenadantes foram transferidos para outra placa de 96 poços para a dosagem do nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em meio RPMI em faixa de concentração variando entre 1,1 a 600 μM diluídos em meio RPMI. As amostras (sobrenadantes) ou as soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% de Sulfanilamida em H_3PO_4 10% v/v em água ultrafiltrada e deionizada[®]) foram misturados, na proporção de 1:1, com 0,1% de naftilenodiamino em água ultrafiltrada e deionizada e fez-se a leitura das absorbâncias em leitor de placas Biotek

(ELx800) a 550 nm. 0,5% de DMSO em meio RPMI foi utilizado como controle (SOARES et al., 2007).

2.7 Análise estatística

A concentração inibitória média (CI_{50}) foi calculada utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0. O índice de seletividade foi calculado dividindo a CI_{50} pela CC_{50} . As análises de variância foram realizadas pela ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, por meio do programa *GraphPad Prism* versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como parâmetro de significância estatística.

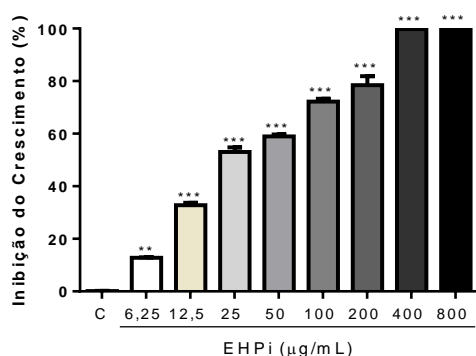
3 RESULTADOS

3.1 Atividade antileishmania do EHPi, FAcOEt, MB e GFC sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*

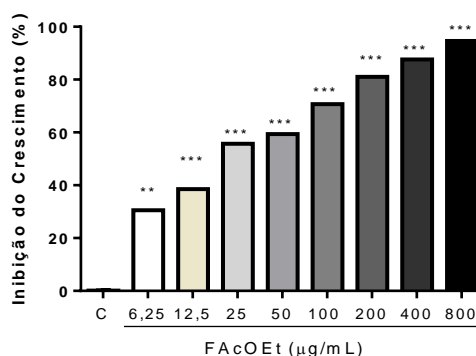
No ensaio da atividade antileishmania das amostras teste sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, observou-se, em todas, inibição do crescimento do parasita dependente da concentração da amostra, com resultado significativo na menor concentração testada, 6,25 µg/mL. A GFC apresentou o maior poder de inibição de crescimento, com IC₅₀ de 8,48 µg/mL, seguido da FAcOEt, com IC₅₀ de 23,05 µg/mL, do EHPi com IC₅₀ de 30,80 µg/mL e da MB, com IC₅₀ de 45,71 µg/mL (Figura 9).

Figura 9: Gráficos representando a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* induzido por EHPi (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D).

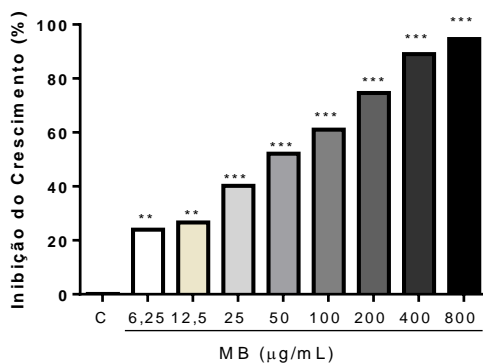
A)



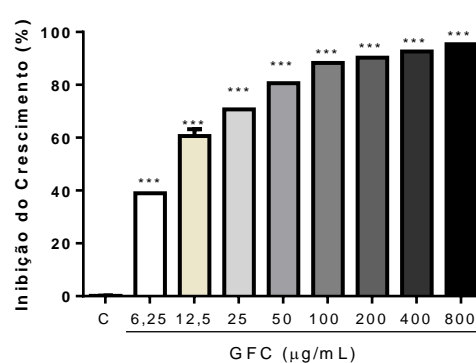
B)



C)



D)



3.2 Atividade antileishmania do EHPI, FAcOEt, MB e GFC sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis*

Foi observado que o EHPI (30 µg/mL), a FAcOEt (60 µg/mL) e a GFC (3,0 e 6,0 µg/mL) reduziram o número de macrófagos infectados quando comparados ao controle e a Anf B. O EHPI (15 µg/mL), a FAcOEt (30 µg/mL) e a MB (30 e 60 µg/mL) reduziram a infecção em relação ao controle. O EHPI (7,5 µg/mL), a FAcOEt (15 µg/mL), a MB (15 µg/mL) e a GFC (1,5 µg/mL) não demonstraram ação sobre a redução da infecção. Os melhores resultados foram observados para a GFC que, nas concentrações de 1,5, 3,0 e 6,0 µg/mL, reduziu o percentual de células infectadas para aproximadamente 84,33, 39 e 6,66%, respectivamente.

Todas as amostras foram capazes de reduzir a infectividade nas concentrações analisadas, quando comparadas ao controle, exceto a MB (15 µg/mL). Os melhores resultados foram obtidos com a GFC, que reduziu o número de amastigotas por macrófagos infectados para 2,89, 0,64 e 0,04 nas concentrações de 1,5, 3,0 e 6,0 µg/mL, respectivamente.

Figura 10: Efeitos do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) em macrófagos murinos infectados por amastigotas de *Leishmania amazonensis*. A para estatisticamente significativo com o controle (C) e a para quando diferir do C. B para estatisticamente significativo com Anfotericina B (Anf B) e b para quando diferir da Anf B.

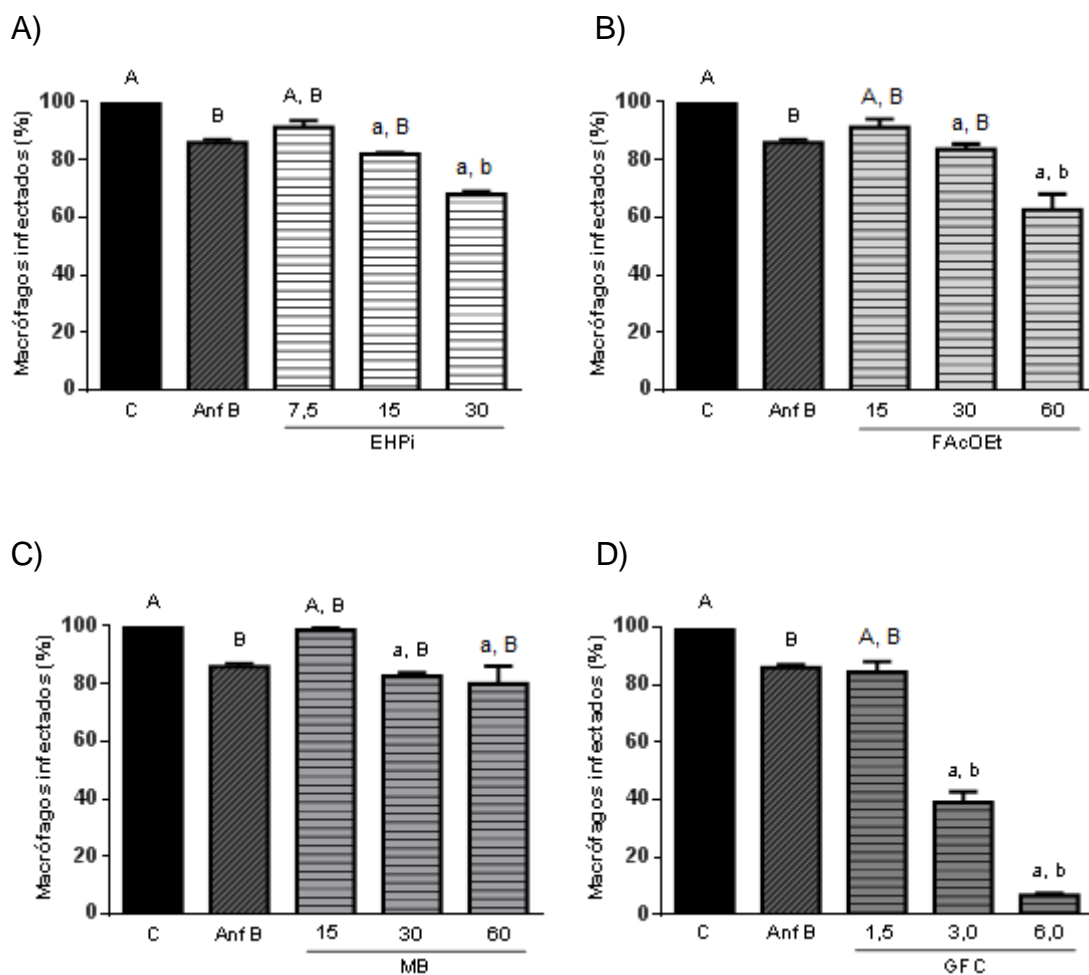
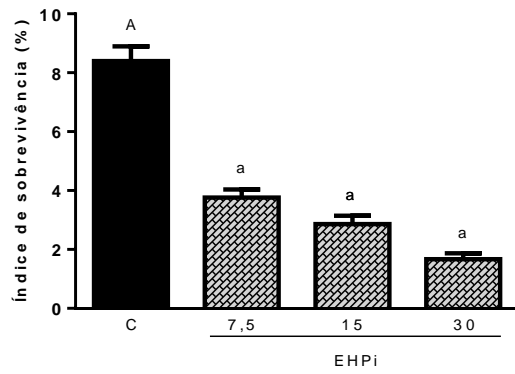
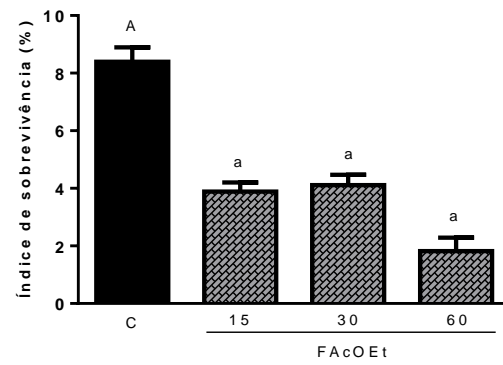


Figura 11: Avaliação dos efeitos das amostras EHPi (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D) na infectividade de macrófagos murinos infectados por amastigotas de *Leishmania amazonensis*. A para controle ou estatisticamente significativo com o controle (C) e a para quando diferir do C.

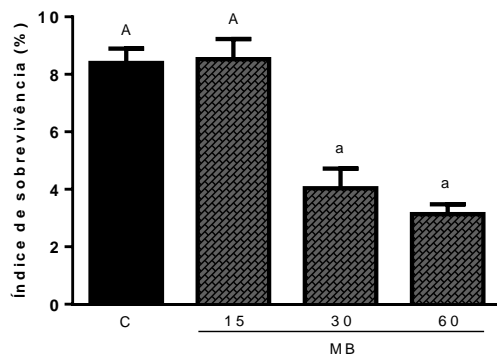
A)



B)



C)



D)

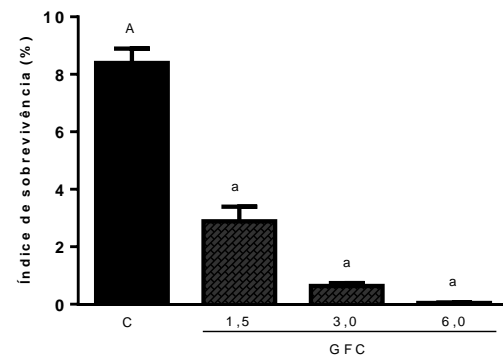


Figura 12: Macrófagos infectados com *Leishmaniose amazonensis* (A), tratados com Anf B 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B), EHPi 7,5 (C.1), 15 (C.2) e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C.3) e FAcOEt 15 (D.1). Aumento de 1000x.

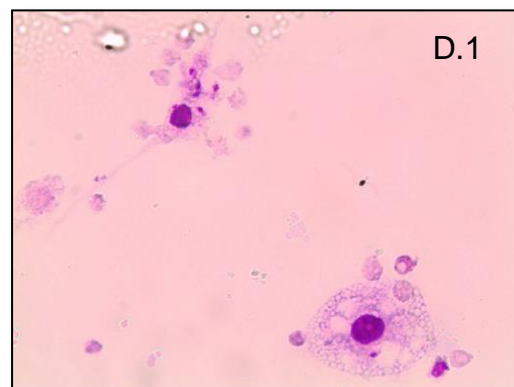
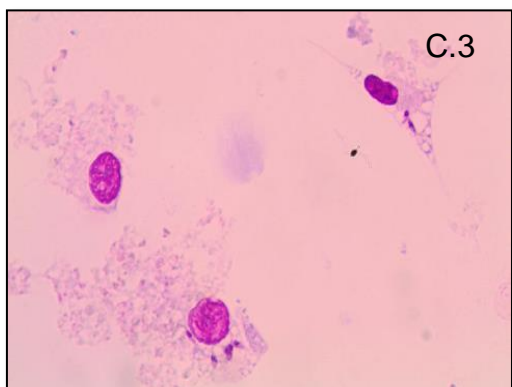
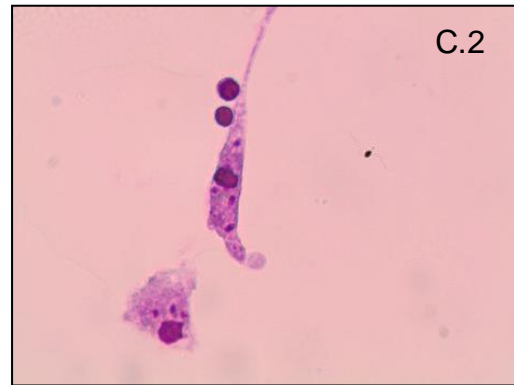
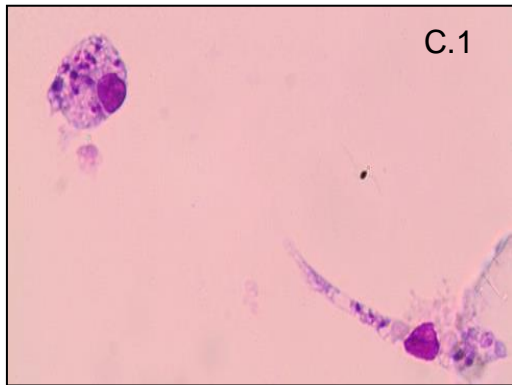
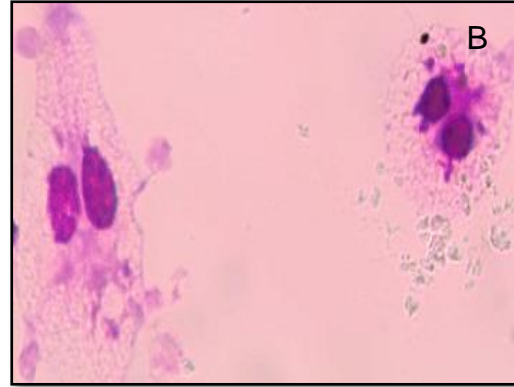
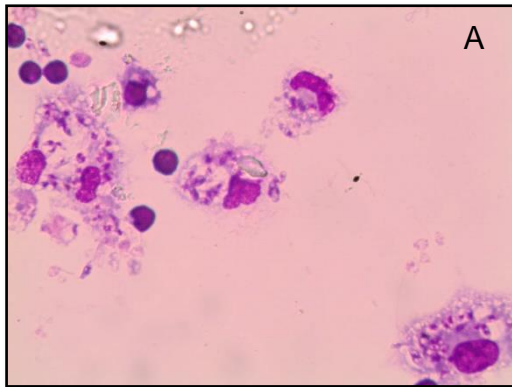


Figura 13: Macrófagos infectados com *Leishmaniose amazonensis*, tratados com FAcOEt 30 (D.2) e 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D.3), MB 15 (E.1), 30 (E.2) e 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E.3) e GFC 1,5 (F.1). Aumento de 1000x.

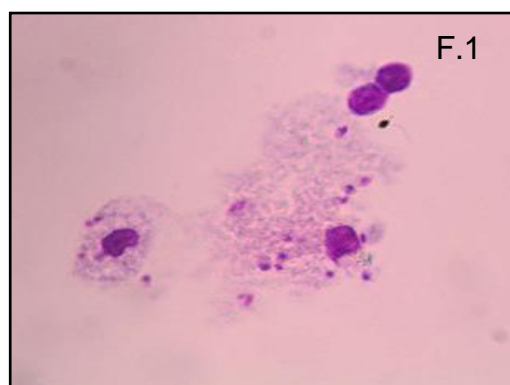
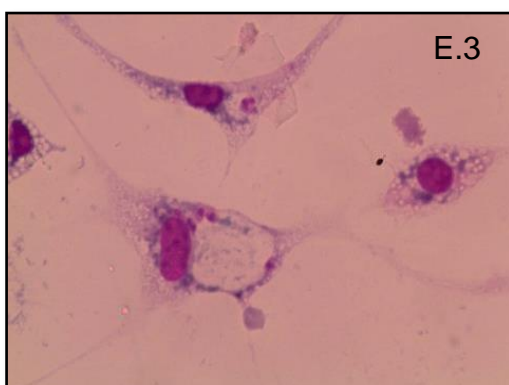
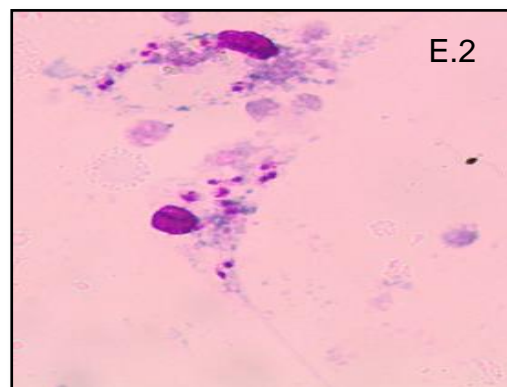
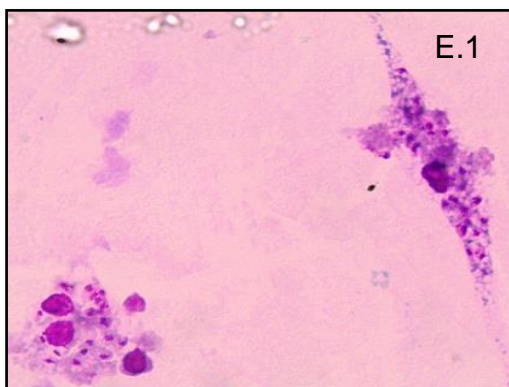
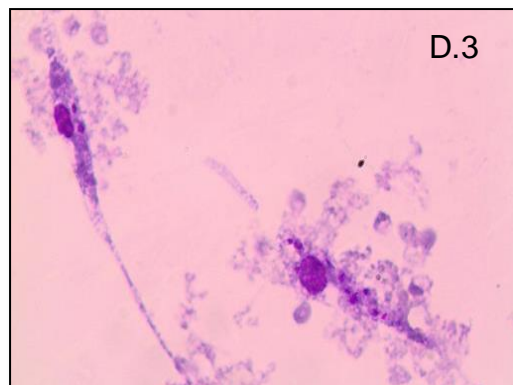
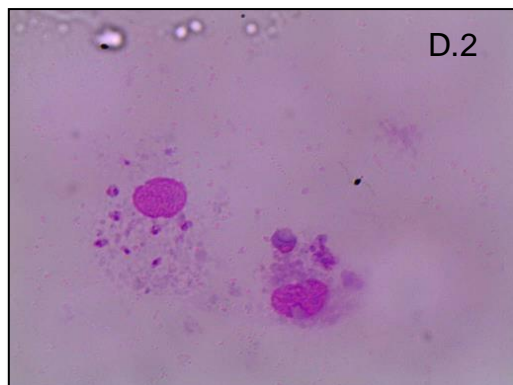
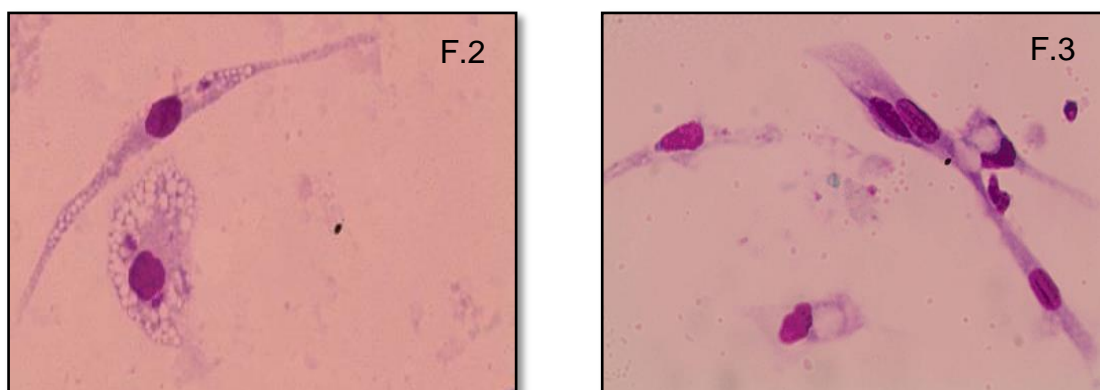


Figura 14: Macrófagos infectados com *Leishmaniose amazonensis* GFC 3,0 (F.2) e 6,0 µg/mL (F.3). Aumento de 1000x.



Quadro 8: Atividade antileishmania, efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos e índice de seletividade calculados para EHPi, FAcOEt, MB e GFC.

Substâncias	Macrófagos	Eritrócitos	Promastigotas	Amastigotas internalizadas		
	CC ₅₀ µg/mL	CH ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µg/mL	IS _m	IS _e
EHPi	81,77	NT	30,08	6,08	13,44	ND
FAcOEt	159,68	NT	23,05	16,28	9,81	ND
MB	134,28	NT	45,71	38,47	3,49	ND
GFC	45,19	NT	8,48	1,15	39,01	ND

IS_m (índice de seletividade) CC₅₀/CI₅₀, IS_e (índice de seletividade) CH₅₀/CI₅₀, NT (não-tóxico) e ND (não-determinado).

3.2 Avaliação de mecanismos de ativação de macrófagos

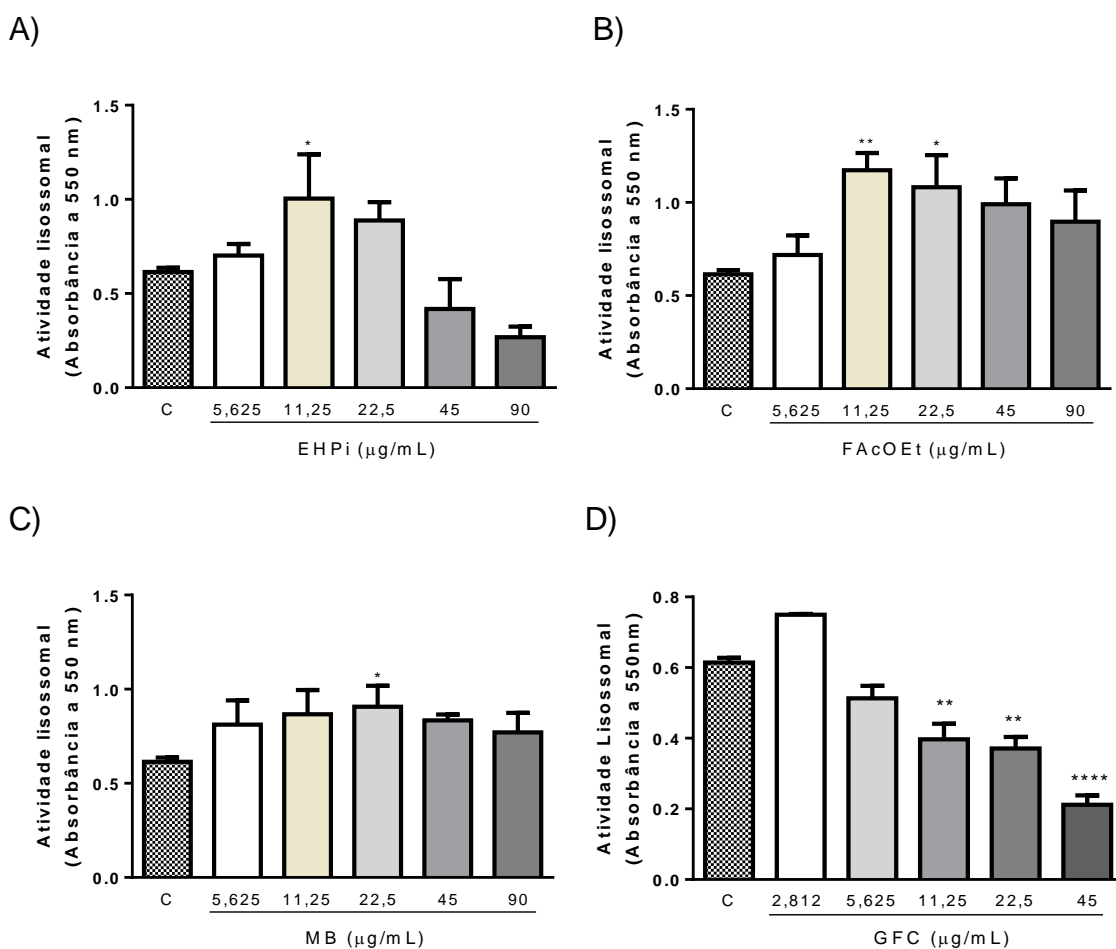
3.2.1 Avaliação da atividade lisossomal

A avaliação da atividade lisossomal é realizada por meio de um ensaio colorimétrico baseado na capacidade que o macrófago, após sua ativação, tem em fagocitar as partículas de vermelho neutro e aumentar o seu volume lisossomal.

Como apresentado na Figura 14 abaixo, todas as amostras foram capazes de reter essas partículas, com exceção da GFC. O EHPi promoveu aumento, significativo do volume lisossomal na concentração de 11,25 µg/mL e, em concentrações maiores, começa a haver uma redução da ativação, dependente da concentração. A FAcOEt promoveu aumento do volume

lisossomal nas concentrações de 11,25 e 22,5 $\mu\text{g/mL}$, e, embora nas concentrações de 45 e 90 $\mu\text{g/mL}$ tenha havido redução da ativação, o seu volume permaneceu maior que o do controle. A MB induziu aumento do volume lisossomal na concentração de 22,5 $\mu\text{g/mL}$. Já a GFC não induziu aumento significativo em nenhuma das concentrações testadas (2,812 a 45 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 15: Gráficos referentes à análise da atividade lisossomal dos macrófagos frente a ação do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D).

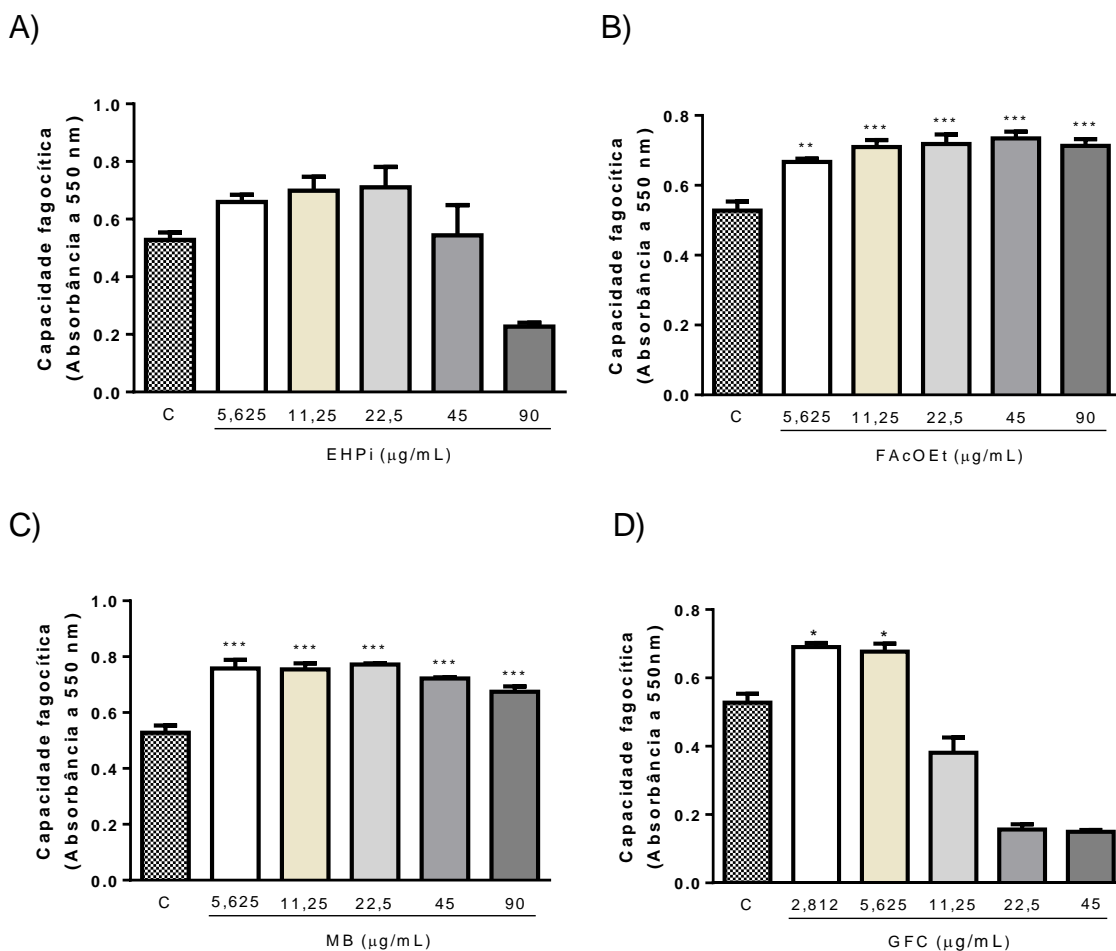


3.2.2 Determinação da capacidade fagocítica

A determinação da capacidade fagocítica é outro parâmetro utilizado na avaliação da ativação de macrófagos e da imunomodulação. De acordo com dados apresentados na Figura 3 abaixo, o EHPI não induziu aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos para nenhuma das concentrações testadas (5,625 a 90 $\mu\text{g/mL}$), enquanto que a FAcOEt e o MB induziram aumento

significativo, da capacidade fagocítica dos macrófagos em todas as concentrações analisadas (5,625 a 90 $\mu\text{g/mL}$). A GFC induziu aumento da capacidade fagocítica nas concentrações de 2,812 e 5,625 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 16: Gráficos referentes à capacidade fagocítica dos macrófagos frente a ação do EHPI (A), FAcOEt (B), MB (C) e GFC (D).

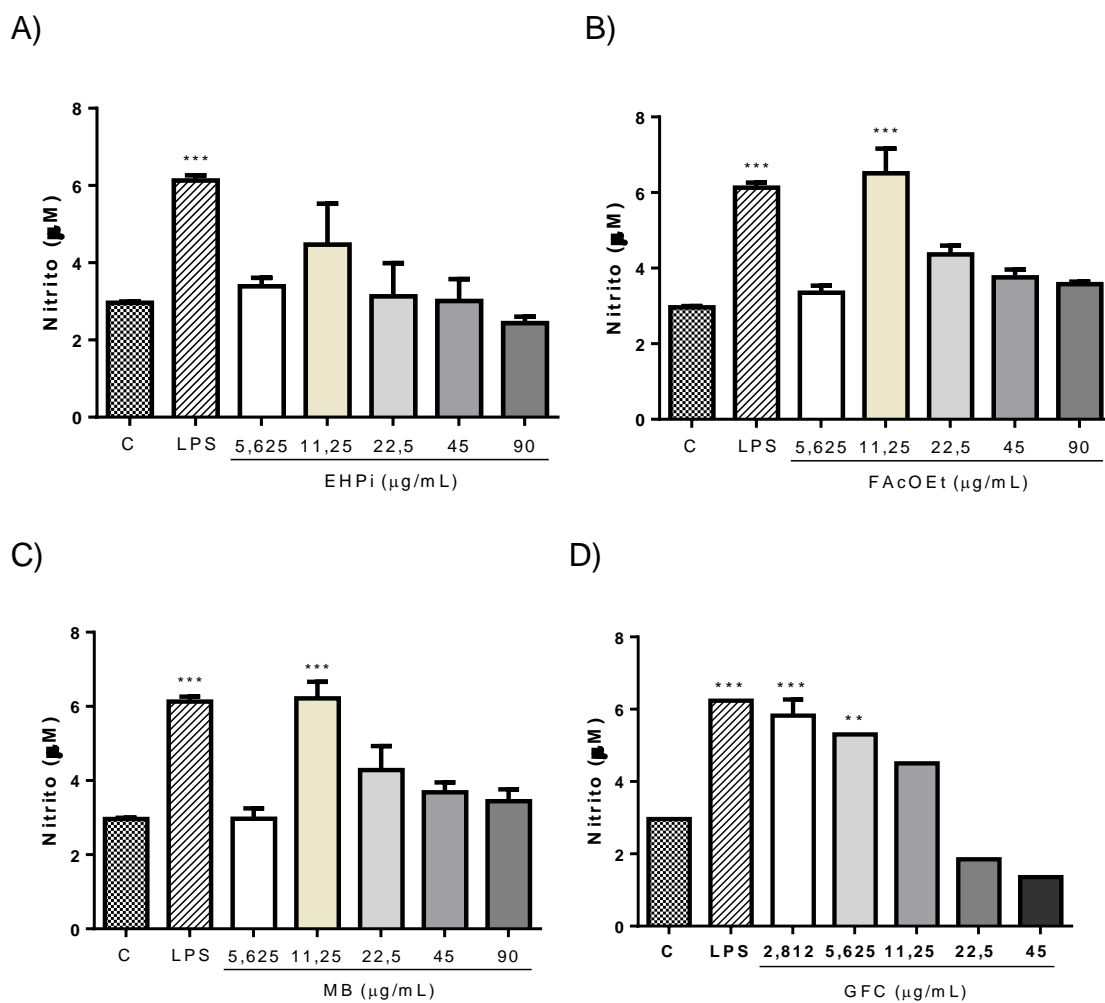


3.2.3 Avaliação da produção de nitrito

A avaliação da indução de óxido nítrico pelos macrófagos é dada pela quantificação da concentração de nitrito presente no meio. O EHPI não induziu a produção de NO em nenhuma das concentrações analisadas (5,625 a 90 $\mu\text{g/mL}$). A FAcOEt e o MB aumentam significativamente a produção de NO na concentração de 11,25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a GFC aumentou

significativamente a produção de NO nas concentrações de 2,812 e 5,625 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 17: Gráficos referentes à avaliação da indução da produção de óxido nítrico pelos macrófagos pela ação do EHPI (A), FAcOEt (B), IF (C) e GFC (D).



4 DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm demonstrado ser uma alternativa promissora para o tratamento de diversas patologias, dentre elas a leishmaniose (CARVALHO et al., 2017). Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento dessa patologia são limitados e apresentam elevados riscos de toxicidade para os pacientes (SILVA et al., 2016). Dentre a grande diversidade da flora brasileira, a *Platonia insignis*, pertencente à família a Clusiaceae merece destaque.

Todas as amostras analisadas apresentaram significativa atividade sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo a GFC a que apresentou o maior poder de redução da viabilidade dos parasitas, seguido da FAcOEt, EHPi e MB. Benzofenonas poliisopreniladas têm demonstrado ação antileishmania potente sobre *L. donovani* (ACUÑA et al., 2009): Garcinol (IC_{50} 0.82 μ M), camboginol (0.33 μ M), guttiferone A (0.16 μ M), F (0,20 μ M). Pesquisa anteriormente realizada por COSTA-JUNIOR et al., 2012, demonstrou que a GFC apresentou IC_{50} de 25,78 μ g/mL, enquanto que no presente estudo, a IC_{50} da GFC foi de 8,481 μ g/mL, demonstrando maior poder inibitório sobre as formas promastigotas. As diferenças encontradas podem ser justificadas pelas metodologias empregadas na contagem das células: manualmente em Câmara de Neubauer em microscópio e ensaio colorimétrico, pela adição de agente cromóforo ao meio e leitura da placa em leitor de placas Biotek. Estudos com o extrato etanólico, a fukugetina e a morelloflavona obtidos dos frutos da *Garcinia brasiliensis*, também pertencente à família Clusiaceae, apresentaram ação antileishmania sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com IC_{50} de 15, 3,2 μ g/mL e 0,1390 μ M, respectivamente. A morelloflavona apresentou IC_{50} 0,2900 sobre formas amastigotas (GONTIJO et al., 2012).

Macrófagos peritoneais murinos BALB/c foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* e incubados com EHPi, FAcOEt, MB e GFC, para avaliação do percentual de células infectadas e do índice de sobrevivência dos parasitas no interior dessas células e comparados com o controle. Este modelo experimental *in vitro* é o que melhor se adequa à infecção por *Leishmania spp.* em humanos (CARNEIRO et al., 2012), pois os macrófagos

desempenham papel central na modulação da resposta imune e são os principais alvos desse parasita (TRINCHIERI, 1997; GORDON, 2003).

A análise microscópica do grupo controle demonstrou a presença de vacúolos parasitóforos (VP) grandes e grande quantidade de amastigotas internalizadas. A alta capacidade de fusão dos VP favorece a captação de metabólitos pelo parasita, característicos de infecção por *L. amazonensis* (REAL, 2011). Nas células tratadas com Anfotericina B, observa-se a presença de muitos vacúolos parasitóforos pequenos e redução significativa da infecção. Não foram observadas alterações celulares, pois a Anfotericina B inibe a síntese de ergosterol da membrana do parasita (MACEDO-SILVA et al., 2009).

O EHPi (7,5, 15 e 30 µg/mL), a FAcOEt (30 e 60 µg/mL) e a MB (30 e 60 µg/mL) reduziram estatisticamente a infecção de macrófagos, bem como a infectividade EHPi (7,5, 15 e 30 µg/mL), a FAcOEt (15, 30 e 60 µg/mL) e a MB (30 e 60 µg/mL). Entretanto, o melhor resultado foi obtido com as células tratadas com a GFC, onde se observou redução acentuada de macrófagos infectados e do número de leishmanias por macrófagos dependentes da concentração. As células apresentam aspecto esfumado, espraído e presença de VP, característicos da ativação celular. O composto solucionou a infecção, provavelmente, por atuar não só apenas por mecanismos que afetam diretamente o parasita, como também por alterar características intracelulares essenciais ao seu desenvolvimento. Podem ser observados na Figura 11, o aspecto “esfumado” em C.1, C.2 e C.3 (EHPi a 7,5, 15 e 30 µg/mL, respectivamente), D.3 (FAcOEt a 60 µg/mL), E.1 e E.3 (MB a 15 e 60 µg/mL), F.2 e F.3 (GFC a 3,0 e 6,0 µg/mL) e “espraído” dos macrófagos em C.1 (EHPi a 7,5 µg/mL), D.1 (FAcOEt a 15 µg/mL) e F.2 (GFC a 3,0 µg/mL), que são característicos de ativação. O aspecto esfumado, aumento da fagocitose e a liberação de mediadores inflamatórios sugerem aumento dos níveis de Ca^{+2} intracelular, pois esta molécula é necessária para promover a movimentação e alteração do citoesqueleto do macrófago quando ativado (ALVES, et al., 2017).

Por meio da determinação do índice de seletividade podemos analisar a citotoxicidade de um determinado composto em relação a célula e ao parasita. Esses dados são de suma importância, uma vez que o parasita é intracelular obrigatório (ISLAMUDDIN et al., 2015). Os resultados demonstraram citotoxicidade da GFC seletiva para a forma amastigota internalizada, com IS de

39,01, valor este superior a 20, como preconizado pela literatura (OSORIO et al., 2007).

A imunestimulação é essencial e bastante eficaz na prevenção e tratamento de doenças que comprometem o sistema imunológico. As plantas medicinais têm se tornado uma alternativa promissora no desenvolvimento de fármacos com tal finalidade, demonstrando serem adequadas na prevenção e tratamento de infecções (WAGNER et al., 1999). Elas promovem a estimulação dos macrófagos pela ativação da atividade lisossomal, capacidade fagocítica, produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio, ativam os mecanismos de defesa do hospedeiro na presença de um patógeno e de uma resposta imune deficitária (SHAH E JUVEKAR, 2010).

Os macrófagos ativados induzem respostas imunológicas de proteção para eliminação dos parasitas. Enquanto que as formas amastigotas se utilizam de artifícios de silenciamento para sobrevivência no interior celular. Logo, é importante que as substâncias em estudo induzam atividade imunomoduladora, pois a dicotomia existente entre as respostas imune celular Th1/Th2 no hospedeiro podem levar a proteção, cura ou a parasitemia (ISLAMUDDIN et al., 2015). Sendo assim, no presente estudo, foram avaliados a capacidade das amostras-teste em ativar macrófagos por meio do aumento da atividade lisossomal, da capacidade fagocítica e da produção de NO.

O EHPi (11,25 µg/mL), a FAcOEt (11,25 e 22,5 µg/mL) e a MB (22,5 µg/mL) retiveram partículas de vermelho neutro, caracterizando aumento da atividade lisossomal. Sugerindo, assim, um possível efeito modulador sobre as atividades lisossomal e aumento de defesa dessas células. Esses dados vão de encontro ao estudo realizado por LUSTOSA et al. (2016), em que o extrato hexânico (EHSB), produzido a partir das sementes dos frutos, promoveram um aumento do volume lisossomal nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µg/mL.

O zymosan estimula as células de defesa a induzirem resposta, levando a um aumento na produção de IFN e da capacidade fagocítica (WEI et al., 2011). Embora o extrato não tenha ativado esse mecanismo, a FAcOEt, a MB (5,625 a 90 µg/mL) e a GFC (2,812 e 5,625 µg/mL) ativaram. LUSTOSA et al. (2016) demonstrou que o EHSB induziu aumento da capacidade fagocítica dos

macrófagos em 42,9, 49,8, 53,7 e 71,2% nas concentrações de 25, 12,5, 6,25 e 3,12, respectivamente.

O efeito citotóxico contra microrganismos patogênicos é indiretamente realizado pelo NO, produzido pelos macrófagos nos processos da inflamação, angiogênese e mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos (KRISHNATRY et al., 2010, MACMICKING et al., 1997). No interior do fagolisossomo, NO reage com O_2^{-2} , produzindo uma espécie reativa de oxigênio, o peroxinitrito. Como produto final, forma-se nitrato e nitrito, que atua como agente microbicida (BOGDAN E ROLLINGHOFF 1998; UEDA-NAKAMURA ET AL. 2006).

A síntese de NO é considerada como um dos mecanismos de defesa mais importantes, pois o parasita é capaz de inibir a expressão ou atividade da enzima iNOS para sobreviver no interior dos macrófagos (MELO-NETO et al., 2016). A GFC (2,812 e 5,625 $\mu\text{g/mL}$), a FAcOEt (11,25 $\mu\text{g/mL}$) e a MB (11,25 $\mu\text{g/mL}$) promoveram aumento na produção de NO, sendo observado redução na ativação desses mecanismos em concentrações maiores. Possivelmente, as concentrações mais altas testadas estão levando à redução da viabilidade celular. No estudo realizado por LUSTOSA et al., 2016, o extrato hexânico induziu a produção de NO em todas as concentrações analisadas (3,12 a 100 $\mu\text{g/mL}$). Observando-se, também, uma redução na ativação desse mecanismo nas concentrações mais altas testadas.

Quando os macrófagos são ativados há aumento dos níveis de enzimas lisossomais, de NO e EROS, aumentando a capacidade microbicida e tumoricida, melhoramento da locomoção e fagocitose, em virtude do aumento dos rufles de membrana, alteração da secreção de citocinas, aumento de cálcio intracelular, estimulação da síntese de DNA, aumento das capacidades de adesão e espraiamento (CLEARY; KELLY; HUSBAND, 1999).

Os mecanismos de ação antiparasitários dos flavonoides ainda não estão evidenciados, mas sabe-se que exercem efeito sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (KAYSER et al., 2003) e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ (SEN; CHATTERJEE, 2011). As atividades imunomoduladora, antimicrobiana e antioxidante para as benzofenonas poliisopreniladas já haviam sido relatadas em estudos prévios (TRUSHEVA et

al., 2004). Bem como as propriedades analgésica, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante, antiparasitária, antiviral e antitumoral para a morelloflavona e analgésica, antibacteriana e antitumoral para a volkensiflavona (FERREIRA et al., 2014).

5 CONCLUSÃO

Todas as amostras reduziram a viabilidade celular das formas promastigotas, bem como a infecção e a infectividade de macrófagos. Entretanto, a GFC apresentou o maior potencial antileishmania sobre as formas promastigotas e amastigotas com redução significativa do número de macrófagos infectados e do índice de sobrevivência de *L. amazonensis*. Bem como alto poder imunogênico, uma vez que foi capaz de ativar macrófagos por meio do aumento da atividade lisossomal, capacidade fagocítica e síntese de NO. Somado a isto, a GFC demonstrou ser seletiva para os parasitas e apresentou índice de seletividade superior a 20. Portanto, a GFC é um composto químico promissor no desenvolvimento de estudos para avaliação do seu potencial terapêutico em modelos experimentais *in vivo* de leishmaniose.

No entanto, o EHPi, a FAcOEt e a MB apresentaram índices de seletividade inferiores a 20. Porém, demonstraram ser proponentes imunoestimuladores que auxiliariam no combate ao hospedeiro, uma vez que o EHPi promoveu aumento do volume lisossomal, e a FAcOEt e a MB foram capazes de ativar as três vias de ativação de macrófagos analisadas, aumento do volume lisossomal, aumento da capacidade fagocítica e aumento da produção de óxido nítrico. Estes achados sugerem que as amostras podem ser utilizadas como uma terapia de suporte à quimioterapia convencional antileishmania, fazendo-se necessário o desenvolvimento de estudos mais aprofundados para elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos nesses efeitos.

Portanto, a *Platonia insignis* é uma espécie cujos produtos são fontes promissoras para o desenvolvimento de formulações a serem testadas em modelos experimentais de infecção *in vivo* para o tratamento da leishmaniose.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados, foi possível concluir que:

- A citotoxicidade das amostras-teste (EHPI, FAcOEt, MB e GFC) sobre macrófagos murinos é dependente da concentração, sendo a GFC a substância que apresentou maior poder de redução da viabilidade celular;
- EHPI, FAcOEt, MB e GFC não apresentaram citotoxicidade para hemácia de carneiro nas concentrações analisadas, no período de 1 h de incubação, estando a CH_{50} bem acima de 800 $\mu\text{g/mL}$;
- O EHPI e a FAcOEt apresentam atividade antioxidante *in vivo*;
- A GFC foi a substância que apresentou o maior poder de inibição de crescimento sobre as formas promastigotas;
- A GFC reduziu estatisticamente a infecção e infectividade dos macrófagos e apresentou IS superior a 20;
- A ação do EHPI, possivelmente, está relacionada a ativação de macrófagos por meio do aumento da atividade lisossomal;
- FAcOEt, MB e GFC foram capazes de promover aumento da atividade lisossomal, capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar estudos pré-clínicos de toxicidade com a amostra teste que apresentar melhor índice de seletividade sobre as formas amastigotas, para avaliação do seu perfil de segurança em roedores;
- Produzir formulação de uso tópico com a amostra teste que apresentar melhor índice de seletividade sobre as formas amastigotas para realização de ensaios pré-clínicos em roedores;

Referências

ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**. V. 28, p. 691-703, 2014.

ACUÑA, U. M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E. J. Polyisoprenylated Benzophenones from Clusiaceae: Potential Drugs and Lead Compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1560-1580, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=991282015&pIdAnexo=2435258>. Acessado no dia 19 de julho de 2017, às 17:53.

AJITH, Y.; DIMRI, U.; DIXIT., S. K.; SINGH, S. K.; GOPALAKRISHNAN, A.; MADHESH, E.; RAJESH, J. B.; SANGEETHA, S. G. Immunomodulatory basis of antioxidant therapy and its future prospects: an appraisal. **Inflammopharmacol** DOI 10.1007/s10787-017-0393-5, 2017.

ALMEIDA, L.; ALVES, K. F.; REZENDE, C. M. M.; JESUS, L. O. P.; PIRES, F. R.; JUNIOR, C. V.; IZIDORO, M. A.; JUDICE, W. A. S.; SANTOS, M. H.; MARQUES, M. J. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 75, p. 93–99, 2015.

ALENCAR, D. B.; SILVA, S. R.; CAVALCANTE, K. M. S. P.; LIMA, R. L.; PEREIRA JÚNIOR, F. N.; SOUSA, M. B.; VIANA, F. A.; NAGANO, C. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, S. S. Antioxidant potential and cytotoxic activity tow red seaweed species, *Amansia multiflora* and *Meristiella echinocarpa*, from the coast of Northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n.1, p. 251-263, 2014.

AL-NASIRY, S.; HANSSENS, M; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, vol. 22, no. 5, pp. 1304–1309, 2007.

ALVES, M. M. M. et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1387-y>, 2017.

AMBRÓSIO, R. P. Avaliação do efeito do lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania amazonensis* e de *Leishmania braziliensis* na infecção por *Leishmania*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.

ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=991282015&pIdAnexo=2435258>.

cao=9032052015&pIdAnexo=2892182>. Acessado no dia 19 de julho de 2017, às 18:38.

BARDARÓ, R.; SCHOOLEY, T. T. Environmental and human leishmaniasis risk factors. Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Control and Research: final report, Pan American Health Organization/ World Health Organization (PAHO/WHO). Sociedade Pediatra do Rio de Janeiro (SOPERJ), p. 111-169, 2008.

BASANTA, M. F.; MARIN, A.; LEO, S. A.; GERSCHENSON, L. N.; ERLEJMAN, A. G.; BARBERAN, F. A. T.; ROJAS, A. M. Antioxidant Japanese plum (*Prunus salicina*) microparticles with potential for food preservation. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 287-296, June 2016.

BECKER, K.; SCHROECKSNADEL, S.; GOSTNER, J.; ZAKNUNA, C.; SCHENNACH, H.; ÜBERALL, F.; FUCHS, D. Comparison of in vitro tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. **Phytomedicine**, v. 21, p. 164–171, 2014.

BEERHUES, L. Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaurium erythraea*. **FEBS Lett**, n. 383, p. 264-266, 1996.

BHATTACHARYA, S. K. SINHA, P. K. & SUNDAR, S. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. In: **J. Infect Dis.**, v. 196, n. 4, p. 591-598, 2007.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol**, v. 28, p.121– 134, 1998.

BONATTO, S. J. R., FOLADOR, A., AIKAWA, J., YAMAZAKI, R. K., PIZATTO, N., OLIVEIRA, H. H. P., VECCHI, R., CALDER, P. C., FERNANDES, L. C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cell. Immunol.** 231, p. 56–62, 2004.

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

CARNEIRO, S. M. P., CARVALHO, F. A. A., SANTANA, L. C. L. R., SOUSA, A. P. L., MOITA-NETO, J. M., CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biol. Res.** 45, p. 111-116, 2012.

CARVALHO, C. E. S., SOBRINHO-JUNIOR, E. P.C., BRITO, L. M., NICOLAU, L. A. D., CARVALHO, T. P., MOURA, A. K. S., RODRIGUES, K. A. F., CARNEIRO, S. M. P., ARCANJO, D. D. R., CITO, A. M. G. L., CARVALHO, F. A. A. Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental Parasitology**, 175, p. 59 - 67, 2017.

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

CLEARY, J. A.; KELLY, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan. **Immunol Cell Biol**, v. 77, n. 5, p. 395-403, Oct 1999.

COELHO, E. A. F. Avaliação dos níveis de proteção e da resposta imune induzida pela imunização com os antígenos A2 e LACK na infecção experimental com *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Doctoral Thesis. Department of Biochemistry and Immunology. Institute of Biological Sciences (ICB), UFMG. 2004.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITO, A. M. G. L.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; FREITAS, R.; SPEROTTO, A. R. M.; PERES, V. F.; MOURA, D. J.; SAFFI, J. Investigation of biological activities of dichloromethane and ethyl acetate fractions of *Platonia insignis* Mart. **Seed. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, p. 34-41, 2013.

COSTA JUNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATTO, R. R.; SILVA, T. G.; SILVA, P. B. N.; MILITÃO, G. C. G.; CITÓ, A. M. G. L.; SANTANA, L. C. L. R.; CARVALHO, F. A. A.; FREITAS, R. M.; Citotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Nat. Prod. Res**, 27, 470, 2013.

COSTA JÚNIOR, J. S.; ALMEIDA, A. A. C.; FERRAZ, A. B. F.; ROSSATTO, R. R.; SILVA, T. G.; SILVA, P. B. N.; MILITAO, G. C. G.; CITO, A. M. G. L.; SANTANA, L. C. L. R.; CARVALHO, F. A. A.; FREITA, R. M. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, p.1–5, iFirst, 2012.

COSTA-JÚNIOR, J. S; FERRAZ, A. B. F, FILHO, B. A. B; FEITOSA, C. M; CITÓ, A. M. G. L; FREITAS, R. M; SAFFI, J. 2011. Evaluation of antioxidant effects in vitro of Garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **J Med Plants Res**, 52, p. 293-299, 2011.

Costa V, Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Mol Aspects Med**, v. 22, n. 4–5, p. 217-46, 2001.

CROFT, S.L; SEIFERT, K. & YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **In: Ind. J. Med. Res.**, v. 123, p. 399-410, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; CAVALCANTI, M. P.; OTRANTO, D. Canine leishmaniasis in the Old and New 33 Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology, Oxford**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DIAS, B. R. S. VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR *Leishmania amazonensis* E *Leishmania major* INTERAGEM DE FORMA DISTINTA COM A VIA AUTOFÁGICA. Dissertação de Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa da Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

DICSON, S. M.; SAMUTHIRAPANDI, M.; GOVINDARAJU, A.; KASI, P. D. Evaluation of in vitro and in vivo safety profile of the Indian traditional medicinal

plant *Grewia tiliaefolia*. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 241-247, 2015.

Dorta, E.J. Introdução. In: Escala Rural: especial de plantas medicinais. São Paulo: **Escala Ltda**. v. 1, n. 4, p.1-62, 1998.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A FITOTERAPIA NO MUNDO ATUAL. **Quim. Nova**, v. 33, N. 9, 1829, 2010.

FERREIRA, R. O., CARVALHO, M. G., SILVA, T. M. S. Ocorrência de biflavonoides em Clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos. **Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2271-2277, 2012.

FONTAINE, A.; DIOUF, I.; BAKKALI, N.; MISSE, D.; PAGES, F.; FUSAI, T. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. **Parasites & vectors**. v. 4, p. 187, 2011.

FREIRE, C. J.; BARBOSA, L. R. S.; COSTA, J. G.; SANTOS, R. G. A., SANTOS, A. F. Fitoterapia em pediatria: a produção de saberes e práticas na Atenção Básica. **Rev. Bras. Enferm.** v.71, supl.1, 2018.

Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32>>. Acessado em 18 de agosto de 2017, às 20:33.

GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.3, p. 223-230, 2008.

GRANDO, F.C.C., FELICIO, C.A., TWARDOWSCHY, A., PAULA, F.M., BATIST, V.G., FERNANDES, L.C., CURI, R., NISHIYAMA, A. Modulation of peritoneal macrophages activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidyl choline. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 42, p. 599-605, 2009.

GONTIJO, V. S.; DE SOUZA, T. C.; ROSA, I. A.; SOARES, M. G.; DA SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VIEGAS JÚNIOR, C.; DOS SANTOS, M. H. **Food Chem**, 132, 1230, 2012.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol** 2003; 3:23–35.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, n. 27, p. 1-93, 2006.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Clarendon Press**, 1989, 543 p.

ISLAMUDIN, M. et al. Th 1 -biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 1, p. 22–116, 2009.

ISLAMUDDIN, M.; CHOUHAN, G.; FAROOQUE, A.; DWARAKANATH, B. S.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential

of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop**, doi:10.1371/journal.pntd.0003321, 2015.

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARDLEY, V.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **Int J Pharm**, p. 254:73, 2003.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections A Practical Review. **Dermatol Clin**, v. 33, p. 579–593, 2015.

KRISHNATRY, A.S., BRAZEAU, D.A., FUNG, H. Broad regulation of matrix and adhesion molecules in THP-1 human macrophages by nitroglycerin. **Nitric Oxide**, v. 22, p. 11–17, 2010.

KUMAR, S., SHARMA, S., CHATTOPADHYAY, S. K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, v. 89, p. 86–125, 2013.

LENTA, B. N.; VONTHRON-SENECHEAU, C.; WENIGER, B.; DEVKOTA, K. P.; NGOUPAYO, J.; KAISER, M.; NAZ, Q.; CHOUDHARY, M. I.; TSAMO, E.; SEWALD, N. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds from *Allanblackia monticola* and *Symphonia globulifera*. **Molecules**, v. 12, p. 1548-1557, 2007.

LIEVIN-LE, M. V.; LOISEAU, P. M. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. **The FEBS journal**, v. 283, n. 4, p. 598-607, 2016.

LIN, Y. M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y. H.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGSUPARP, T.; PEZZUTO, J. M.; SCHINAZI, R. F.; HUGHES, S. H.; CHEN, F. C.; *J. Nat. Prod*, v. 60, p. 884, 1997.

LOPES-NETO, B. E. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará, 68p, 2012.

LOVKOVA, M. Y.; BUZUK, G. N.; SOKOLOVA, S. M.; KLIMENT'EVA, N. I. Chemical features of medicinal plants (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 229-237, 2001.

LUSTOSA, A. K. M. F. Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí, 26p, 2012.

LUSTOSA, A. K. M. F.; ARCANJO, D. D. R.; RIBEIRO, R. G.; RODRIGUES, K. A. F.; PASSOS, F. F. B.; PIAUILINO, C. A.; FILHO, J. C. S.; ARAÚJO, B. Q.; NETO, J. S. L.; JÚNIOR, J. S. C.; CARVALHO, F. A.; CITÓ, A.M.G. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonia insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 77–82, 2016.

MACEDO-SILVA ST, DE OLIVEIRA SILVA TL, URBINA JA, DE SOUZA W, RODRIGUES JC. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of

amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Mol Biol Int** 2011:876021. doi:10. 4061/2011/876021, 2011.

MACMICKING, J., QIAO-WEN, X., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.** 15, 323–350, 1997.

MANSUR, M. C. P. P. R.; LEITÃO, S. G.; COUTINHOA, C. C.; VERMELHO, A. B.; SILVA, R. S.; PRESGRAVEC, O. A. F.; LEITÃO, A. A. C.; LEITÃO, G. G.; RICCI-JÚNIOR, E.; SANTOS, E. P. In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 26, p. 251–258, 2016.

MEDEIROS, M. G. F., DA SILVA, A. C., CITO, A. M. G. L., BORGES, A. R., LIMA, S. G., LOPES, J. A. D., FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol. Int.** 60, 237e241, 2011.

MELO-NETO, B.; LEITÃO, J. M. S. R.; OLIVEIRA, L. G. C.; SANTOS, S. E. M.; CARNEIRO, S. M. P.; RODRIGUES, K. A. F.; CHAVES, M. H.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A. Inhibitory effects of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) against the infection and infectivity of macrophages by *Leishmania amazonensis*. **An Acad Bras Cienc**, 2016.

MESQUITA-JÚNIO, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M (2010) New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J am Acad Dermatol**, 63, p. 309–322. doi:10.1016/j.jaad. 2009.06.088

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; MONZOTE, C. L.; GARCIA, G.; FONSECA, L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v.64, n. 2, 2012.

MORATO, C. I. Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* por leucotrienos. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. p. 115, 2013.

MOSSER, D. M; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews. Immunology** 8: 958–969, 2008.

NASCIMENTO, W. M. O.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO BACURIZEIRO. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 657-660, Dezembro 2007.

NAN, A.; CROFT, S. L; YARDLEY, V.; GHANDEHARI, H. Targetable water-soluble polymer-drug conjugates for the treatment of visceral leishmaniasis. **J Control Release**; v. 94, n. 1, p. 115-127, 2004.

OLIVEIRA, C. C. ESTUDOS TOXICOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS E ANTITUMORAIS DO EXTRATO ACETÔNICO DAS FOLHAS DE *Annona muricata* L. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, p. 174, 2012.

OLIVEIRA, G. L. S. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 36, n.3, p. 461-466 ISSN 1808-4532, 2015.

OLIVEIRA, L. G. C.; BRITO, L. M.; ALVES, M. M. A.; AMORIM, L. V.; JUNIOR, E. P. C. S.; CARVALHO, C. E. S.; RODRIGUES, K. A. F.; ARCANJO, D. D. R.; CITO, A. M. G. L.; CARVALHO, F. A. A. In Vitro Effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran Against *Leishmania Amazonensis*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 120, p. 52–58, 2017.

Organização mundial de Saúde (OMS) – Report of the Fifth Consultative Meeting On *Leishmania/HIV* Coinfection-Addis Ababa, Ethiopia: p. 20-22, 2007.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 3, p. 630-5, May 2007.

OTUKI, M. F.; BERNARDI, C. A.; PRUDENTE, A. S.; LASKOSKI, K.; GOMIG, F.; HORINOUCI, C. D. S.; GUIMARÃES, C. L.; FERREIRA, J.; DELLEMONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V.; CABRINI, D. A. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 109, 56, 2011.

PETERS, N. C.; EGEN, J.G; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**. v. 321, n. 5891, p.970-4, 2008.

PINHEIRO, E. E. A. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL BIOLÓGICO DAS FLORES DE *Platonia insignis* Mart. Dissertação de Mestrado. Piauí. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, 131p, 2016.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**. v. 10, n. 1, p.111-29, 2015.

PRADO, L. S., SILVA, P., GARCIA, A. L. H., BOARETTO, F. B. M., GRIVICICH, I., CONTER, L. U., SALVI, A. O., REGINATTO, F. H., VENCATO, S. B., FERRAZ, A. B. F., PICADA, J. N. Evaluation of DNA Damage in HepG2 Cells and Mutagenicity of Garcinielliptone FC, A Bioactive Benzophenone. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

RATH, S.; TRIVELIN L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, 550-555, 2003.

REAL, F. R. O. Fusão homotípica e heterotípica entre vacúolos parasitóforos de *Leishmania spp.* Tese de doutorado. Doutorado em Ciências. Universidade Federal de São Paulo. 90 p., 2011.

REIS, A. C. S. M; BORGES, D. P. L.; D'AVILA, V. G. F. C.; BARBOSA, M. S.; TERNES, Y. M. F.; SANTIAGO, S. B.; SANTOS, R. S. O CENÁRIO DE

POLÍTICAS PÚBLICAS DO BRASIL DIANTE DO QUADRO DAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS. SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO – **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**. v.3, n. 01, ISSN: 2447 9330, 2016.

REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, 49, 1603–1616., 2010.

ROATT, B. M.; SOARES, R. D. O. A.; VITAL, W. C.; KER, H. G.; MOREIRA, N. D.; SOUZA, J. V.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 272, 1-12, 2014.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; COSTA, T. S. A. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011

RODRIGUES, K. A. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **J Ethnopharmacol**, v. 160, p. 32-40, Feb 3 2015.

RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E. A., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., CALIXTO-SAURA, F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem**. 121, p. 996–1002, 2010.

SANTOS, C. S.; GOMES, A. M. T.; SOUZA, F. S.; MARQUES, S. C.; LOBO, M. P.; OLIVEIRA, D. C. Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. *Escola Anna Nery*, v. 21, n. 1, Fev 2017.

SCHWARTZ, C., (Master's dissertation) 2007. A lecitina vegetal KM+ induz a ativação de neutrófilos humanos com consequente aumento na capacidade fagocítica e microbicida. Curitiba. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 85 pp, 2007.

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

SHAH, A. S., JUVEKAR, A. R. In vitro and in vivo immunostimulatory activity of Woodfordia fruticosa flowers on non-specific immunity. **Pharm. Biol**. 48, p. 1066–1072, 2010.

SHANLEY, P., MEDINA, G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. CIFOR, Imazon, Belém, 2005.

SILVA, E. A. M. Utilização de DNA p36 (lack) na indução de resposta imune e na proteção contra infecção por Leishmania chagasi em camundongos BALB/c. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2004.

SILVA, S. S; MIRANDA, M. M.; COSTA, I. N.; WATANABE, M. A. E.; PAVANELLI, W. R.; FELIPE, I.; SFORCIN, J. M.; CONCHON-COSTA, I. Leishmanicidal activity of brazilian propolis hydroalcoholic extract in Leishmania

amazonensis. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 36, n. 2, p. 25-34, jul./dez. 2015.

SILVA, A. P., SILVA, M. P., OLIVEIRA, C. G., MONTEIRO, D. C., PINTO, P. L., MENDONÇA, R. Z., JUNIOR, J. S.C., FREITAS, R. M., MORAES, J. Garcinielliptone FC: Antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells. ***Toxicology in Vitro***, 29, p. 681–687, 2015.

SILVA, T. F.; OLIVEIRA, A. B. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão. *Revista Fitos.* v. 10, n. 3, Doi: 10.5935/2446-4775.20160026, 2016.

SILVEIRA, F. T.; LIMA, I. v. r.; SANTOS, T. V.;¹, RAMOS, P. K. S.; CAMPOS, M. B. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. ***Rev Pan-Amaz Saude*** v.7 n.esp Ananindeua dez. 2016.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. ***Parasitol Int***, v. 56, n. 2, p. 135-9, Jun 2007.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. ***Rev. Bras. Farm.***, v. 85, n. 2, p. 45-47, 2004.

SOUZA, A. W. S.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, L. N. Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. ***Revista Brasileira de Reumatologia***, v. 50, n. 6, 665-94, 2010.

SUNDAR, S. CHAKRAVARTY, J. AGARWAL, D. RAI, M. & MURRAY, H.W.M.D. Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. In: ***N. Engl. J. Med.***, v.362, n. 6, 2010.

SUNDAR, S. JHA, T.K. & THAKUR, C.P. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. In: *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 100, n.1, p. 26-33, 2006.

Trinchieri G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). ***Curr Opin Immunol***, 9, p.17–23, 1997.

TRUSHEVA B, POPOVA M, NAYDENSKI H, TSVETKOVA I, RODRIGUEZ JG, BANKOVA V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. ***Fitoterapia***; 75, p. 683–9, 2004.

TOMÉ AR, FENG D, FREITAS RM. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. ***Neurochem Res***, 35, p. 580–587, 2010.

TUANSULONG, K.-A.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; MAHABUSARAKAM, W.; PINKAEW, D.; FUJISE, K. ***Phytother. Res.***, 25, 424, 2011.

Ueda-Nakamura T et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. ***Parasitol Int***, 55, p. 99–105. doi:10.1016/j.parint.2005.10.006, 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONTANHER, A. B. P.; BRIGHENTE, I. M. C.; JÚNIOR, A. S.; SMÂNIA, E. DE F. A.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F.; **Fitoterapia**, 75, 360, 2004.

WAGNER, H., KRAUS, S., JURCIC, K. Search for potent immunostimulating agents from plants and other natural sources. In: Wagner, H. (Ed.), *Immunomodulatory Agents of Plants*. Birkhäuser, Berlin, pp. 1–39, 1999.

WEI, W.C., SU, Y.H., CHEN, S.S., SHEU, J.H., YANG, N.S., 2011. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. **Cytokine**; 55, p. 79–89, 2011.

WERNECK, G. L. ; FARIAS, T. J. C. ; FARIAS, G. C. ; SILVA, F. O. ; CHAVES, F. C. ; GOUVEA, M. V. ; COSTA, C. H. N. ; CARVALHO, F. A. A. . Avaliação da efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral na cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil: resultados do inquérito inicial - 2004. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, p. 87-96, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acessado no dia 02 de julho de 2017, 'as 10:12.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado no dia 02 de junho de 2017 às 16:42.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, C. V. L.; LIMA, E. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 2, p. 39-46, 2014.