FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDONIA
NUCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA in vitro DE EXTRATO Etanólico E FRAÇÃO CLOROFÓRMICA OBTIDOS DO BULBOS De *Euletherine bulbosa* (Mill.) Urb.

BETÂNIA GONÇALVES NUNES

PORTO VELHO 2021

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDONIA
NUCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA in vitro DE EXTRATO Etanólico E FRAÇÃO CLOROFÓRMICA OBTIDOS DO BULBOS De *Euletherine bulbosa* (Mill.) Urb.

BETÂNIA GONÇALVES NUNES

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, área de concentração: Produtos Naturais, para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Orientadora: Dra Mariangela Azevedo

PORTO VELHO 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

N972a Nunes, Betânia Gonçalves.

Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de extrato etanólico e fração clorofórmica obtidos do bulbos de euletherine bulbosa (Mill.) Urb. / Betânia Gonçalves Nunes. -- Porto Velho, RO, 2021.

53 f. : il.

Orientador(a): Prof. PhD Mariangela Soares de Azevedo

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Eleutherine bulbosa. 2.Citotoxicidade. 3.Produtos naturais. I. Azevedo, Mariangela Soares de. II. Título.

CDU 615

Bibliotecário(a) Renata Cortinhas Bulhões CRB 11/1010

BETÂNIA GONÇALVES NUNES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* DE EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÃO CLOROFÓRMICA OBTIDOS DOS BULBOS DE *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

Comissão Examinadora

Documento assinado eletronicamente por **MARIANGELA SOARES DE AZEVEDO**, **Presidente**, em 08/06/2021, às 20:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **MAURICIO REGINALDO ALVES DOS SANTOS**, **Examinador Externo**, em 11/06/2021, às 14:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, §1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **CANDIDA APARECIDA LEITE KASSUYA**, **Examinadora Externa**, em 25/07/2021, às 19:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **BETÂNIA GONÇALVES NUNES**, **Discente**, em 08/06/2021, às 23:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Porto Velho, 8 de junho de 2021.

Resultado: Aprovada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelas inúmeras coisas boas que possuo em minha vida e por sempre contar com sua força nas h dos mais diversos desafios.

Á minha família, em especial aos meus pais, Gézaro e Vilma, por me apoiar e incentivar a estar onde estou hoje e sempre torcer pelo meu sucesso. E aos meus irmãos, Suzanna e Jefersson pela confiança.

A Universidade Federal de Rondônia e ao Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente pela oportunidade de realização do mestrado.

À minha orientadora Dra. Mariangela Soares de Azevedo por ter acreditado em mim e ter me concebido a oportunidade de desenvolver este trabalho, por todos os ensinamentos, sua confiança e dedicação.

À Dra Caroline Bioni, por toda ajuda, por permitir a realização dos testes, pela orientação. Por todo carinho, paciência e dedicação ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose- FIOCRUZ, Aurileya, Amália, Guilherme, Leandro e todos os outros pelo grande apoio e ajuda ao desenvolvimento desse trabalho.

Ao George Azevedo, pela amizade, companheirismo e colaboração nas análises estatísticas.

À Laís Helena, pela amizade, companheirismo nos momentos mais difíceis.

À MSc Elenize Gemaque, por fornecer a amostra da espécie estudada.

A todos os amigos que contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

Os produtos naturais provenientes de plantas são importantes e promissoras fontes de compostos químicos, para que venham ser transformados em medicamentos. *Eleutherine bulbosa* é um membro da família Iridaceae, presente na América do Sul. Os bulbos da *E. bulbosa* são utilizados popularmente em distúrbios menstruais e intestinais, como agente abortivo e contraceptivo (adicionar a maneira que é utilizado). A partir dessas informações, surgiu o interesse em estudar a composição química e atividade biológica da planta que apresenta grande potencial fitoterápico. Este trabalho teve como objetivo avaliação do potencial leishmanicida do extrato etanólico dos bulbos e frações Clorofórmio, Acetato de etila e acetona. Foi realizado o teste para classe de substâncias no extrato etanólico dos bulbos de *E. bulbosa* que revelou a presença de flavonoides, alcaloides, terpenos e quinonas. Foi avaliado o efeito do extrato etanólico e das frações em relação as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum,* e citotoxicidade frente a células J774 e calculado o índice de seletividade. Para o extrato etanólico foi observado inibição de crescimento de formas promastigotas na maior concentração testada (200 $\mu g.ml^{-1}$), 28% para *L. amazonensis* e 70% para *L. infantum*. Para a fração $CHCl_3$, 99% de inibição para *L. amazonensis* e 100% para *L. infantum* na maior concentração testada (200 $\mu g.ml^{-1}$). Em relação as frações EtOAc e acetona, não foram observadas a inibição na maior concentração testada. O extrato etanólico apresentou ação para a espécie *L. infantum* (IC_{50} de 51,6 $\mu g.ml^{-1}$). Das três frações testadas, somente $CHCl_3$ apresentou ação para as duas espécies, apresentando valores de IC_{50} de 50,1 $\mu g.ml^{-1}$ para *L. amazonensis* e de 21,85 $\mu g.ml^{-1}$ para *L. infantum.* Em relação ao índice de seletividade, o extrato etanólico apresentou o valor 0,36 para *L infantum* e a fração $CHCl_3$, 0,62 e 1,44, para *L. amazonensis* e *L. infantum* respectivamente. Esses resultados demonstram que o extrato etanólico e a fração $CHCl_3$ obtidos de bulbos da *E. bulbosa* apresentam efeito sobre leishmanicida sobre *L. amazonensis* e *L. infantum in vitro,* de maneira concentração-dependente. Entretanto os efeitos citotóxicos desse extrato e frações foram detectados.

Palavras-Chave: *Eleutherine bulbosa*, citotoxicidade, produtos naturais.

ABSTRACT

Natural products from plants are important and promising sources of chemical compounds, so that they can be transformed into medicines. *Eleutherine bulbosa* is a member of the Iridaceae family, present in South America. *E. bulbosa* bulbs are popularly used in menstrual and intestinal disorders, as an abortion and contraceptive agent. From this information, there was an interest in studying the chemical composition and biological activity of the plant that has great herbal potential. This work aimed to evaluate the leishmanicidal potential of the ethanol extract of bulbs and fractions Chloroform, Ethyl acetate and acetone. The test for class of substances in the ethanol extract of *E. bulbosa* bulbs was carried out, which revealed the presence of flavonoids, alkaloids, terpenes and quinones. The effect of the ethanol extract and fractions in relation to the promastigote forms of Leishmania *amazonensis* and *L. infantum*, and cytotoxicity against J774 cells was evaluated and the selectivity index was calculated. For the ethanol extract, growth inhibition of promastigote forms was observed at the highest concentration tested (200 $\mu g.ml^{-1}$), 28% for *L. amazonensis* and 70% for L. infantum. For the $CHCl_3$ fraction, 99% inhibition for L. *amazonensis* and 100% for *L. infantum* at the highest concentration tested (200 $\mu g.ml^{-1}$). Regarding the EtOAc and acetone fractions, inhibition was not observed at the highest concentration tested. The ethanol extract showed action for the species *L. infantum* (IC_{50} of 51.6 $\mu g.ml^{-1}$). Of the three fractions tested, only $CHCl_3$ showed action for both species, with IC_{50} values of 50.1 $\mu g.ml^{-1}$ for *L. amazonensis* and 21.85 $\mu g.ml\text{-}^{1}$ for *L. infantum*. Regarding the selectivity index, the ethanol extract presented the value 0.36 for *L infantum* and the $CHCl_3$ fraction, 0.62 and 1.44, for *L. amazonensis* and *L. infantum*, respectively. These results demonstrate that the ethanol extract and $CHCl_3$ fraction obtained from *E. bulbosa* bulbs have an effect on leishmanicidal on *L. amazonensis* and *L. infantum in vitro*, in a concentration-dependent manner. However, the cytotoxic effects of this extract and fractions were detected.

Key words: *Bulbous Eleutherine*, cytotoxicity, natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação taxonômica do gênero Leishmania.....13
Figura 2: Leishmaniose visceral.....14
Figura 3: Leishmaniose cutânea.....15
Figura 4: Distribuição geográfica mundial de leishmanioses. 16
Figura 5: Formas promastigotas de Leishmania encontradas no intestino do vetor. 17
Figura 6: Flebotomíneo sobre a pele.....18
Figura 7: Formas amastigotas de Leishmania encontradas no organismo vertebrado. 18
Figura 8: Ciclo biológico da Leishmania 19
Figura 9: Estruturas dos compostos testados.....23
Figura 10: Estrutura do flavonoide braquidina. 23
Figura 11: Compostos obtidos a partir da casca em pó de *C. cajucara*. 24
Figura 12: Molécula DCPC isolada da *Piper carniconectivum*. 25
Figura 13: Estruturas de alcaloides importantes agentes terapêuticos. 25
Figura 14: Estruturas de alcaloides isolados das flores da espécie *Senna spectabilis*. 26
Figura 15: Estruturas naftoquinona lapachol. 26
Figura 16: Mapa de Registros de ocorrência da *Eleutherine bulbosa* no Brasil 28
Figura 17: Bulbos e flores *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. 29
Figura 18: Estruturas químicas isoladas da *Eleutherine bulbosa*.....29
Figura 19: Procedimentos realizados a partir do extrato etanólico e frações ($CHCl_3$, EtOAc e acetona) dos bulbos da *Eleutherine bulbosa*. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Moléculas isoladas da *E. plicata*. 30
Tabela 2: Massa obtidas a partir do extrato etanólico. 38
Tabela 3: Resultados obtidos para teste de classe de substâncias do extrato etanólico *Eleutherine bulbosa*.....38
Tabela 4: Atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico e frações da E. bulbosa frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.....41
Tabela 5: Atividade leishmanicida *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* *L. infantum* e análise de índice de seletividade frente à célula J774. 43

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de Etila

CC_{50}: Concentração citotóxica

$CHCl_3$: Clorofórmio

DMSO: Dimetilsulfóxido

EtOH: Etanol

FIOCRUZ-RO: Fundação Oswaldo Cruz- Rondônia

FDA: Food and Drug Administration

IC_{50}: Concentração que corresponde a inibição de crescimento de 50%

IS: Índice de Seletividade

LC: Leishmaniose cutânea

LD: Leishmaniose disseminada

LM: Leishmaniose mucosa

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LV: Leishmaniose visceral

LVA: Leishmaniose Visceral Americana

MeOH: Metanol

MS: Ministério da Saúde

PBS: phosphate buffered saline

PBML: Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose

SiBBr: Sistema de informação da biodiversidade brasileira

SFB: Soro fetal bovino

WHO: World Heath Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
2. REFERENCIAL TEÓRICO 12
2.1 Leishmaniose 12
2.2 O Parasito e o Vetor 16
2.3 Tratamento da Leishmaniose 19
2.4 Produtos Naturais 21
2.5 Metabólitos Secundários 22
2.6 Família Iradaceae e o gênero *Eleutherine.* 27
3. OBJETIVO 32
3.1 Objetivo geral 32
3.2 Objetivos específicos 32
4. MATERIAIS E MÉTODOS 33
4.1 Coleta e Obtenção do extrato bruto 33
4.2 Teste para classe de substância 34
4.2.1 Esteroides e Terpenos 34
4.2.2 Flavonoides 34
4.2.3 Alcaloides 35
4.2.4 Saponinas 35
4.2.5 Quinonas 35
4.3 Ensaio da atividade antipromastigota 35
4.4 Ensaio de citotoxicidade e determinação do Índice Seletividade 36
4.5 Análise Estatística 37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 38
5.1 Testes para classes de substâncias 38
5.2 Atividade leishmanicida 39
6. CONCLUSÃO 45
7. REFERÊNCIAS 46

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido usados para fins medicinais por comunidades e grupos étnicos, ainda que de modo empírico (Van den BERG, 1987). As populações tradicionais fazem uso das plantas como recurso terapêutico, para o controle de diversas doenças e pragas, detendo o conhecimento sobre as plantas por eles usadas para fins medicinais (MONTELES e PINHEIRO, 2007), ressaltando que este recurso usado por aquele grupo, muitas vezes é o único para cura de determinada doença.

O resgate dos valores culturais, quanto ao uso das plantas medicinais tem sido de primordial importância, pois os saberes tradicionais, como uso das plantas para cura de doenças tem sido agregado ao uso de medicamentos alopáticos (LOPES, BARBIERI, CAMPOS, 2021), sendo este um possível fator para que uma população venha deixar de usar as plantas como forma terapêutica. Com essa realidade a comunidade ou grupo étnico pode deixar suas tradições do uso de plantas como medicamentos, em detrimento ao remédio alopático.

O uso popular e tradicional das plantas medicinais, não são suficientes para regularizá-las como medicamento seguro e eficaz. Os efeitos medicinais de um fitoterápico devem ser baseados em indícios experimentais e os benefícios devem ser maiores do que os riscos expostos na utilização (DASSOLER et al, 2004).

A grande quantidade de informações sobre o uso de várias plantas como fitoterápicos em todo o mundo, leva a necessidade de se avaliar cientificamente o valor terapêutico dessas espécies vegetais. Por outro lado, a perda da biodiversidade, principalmente por interferências antrópicas e o acelerado processo de mudança cultural, vem demonstrar urgência em garantir o registro dessas informações, inclusive para uso científico.

A Leishmaniose, uma doença tropical negligenciada, sendo endêmica países da Índia e África (MSF, 2018), apresenta-se como uma das mais graves doenças, incapacitando o indivíduo por ela acometido, podendo levar o hospedeiro a óbito. Os medicamentos usados para cura da leishmania provocam efeitos colaterais, sendo a probabilidade de resistência crescente (MS, 2017).

A busca de compostos para serem usados na cura da leishmaniose, são de primordial importância, especialmente se estes apresentem baixos efeitos colaterais e não apresentem citotoxicidade. A flora brasileira é muito rica em espécies com propriedades terapêuticas, nos permitindo voltar esforços para tal, levando a descobertas de princípios ativos que venham apresentar essas características.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* pertencente à família *Trypanosomatidae* (BASANO; CAMARGO, 2004; MS, 2017) que ocorrem de forma predominante em regiões tropicais e subtropicais (MOURA et al., 2005; STEVERDING, 2017). Doenças causadas por parasitos protozoários são responsáveis por inúmeros casos de morbidade e mortalidade em vários países, o que retrata um sério problema de saúde pública (MS, 2017; TIUMAN et al., 2005).

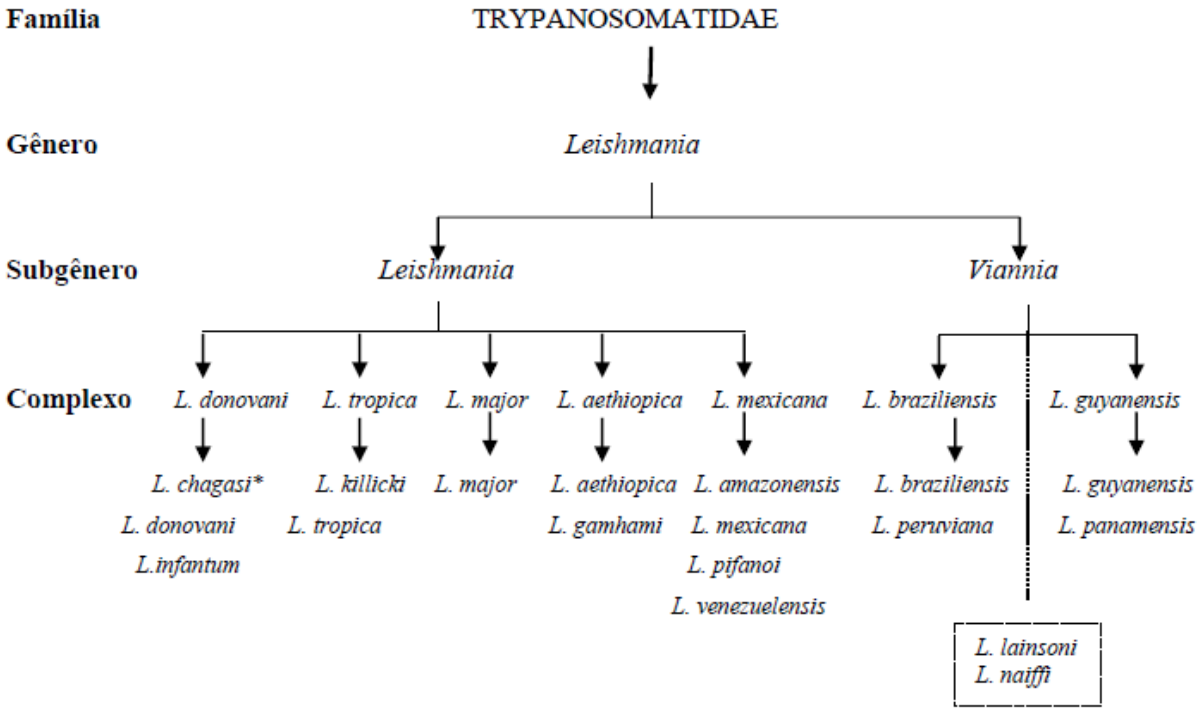
Em muitos territórios endêmicos, a leishmaniose é uma doença epidemiologicamente instável que mostra uma tendência a alterações imprevisíveis no número de casos. As causas podem ser diversas, mas fatores culturais, ambientais e socioeconômicos são fatores significativos (STEVERDING, 2017).

A literatura relata três doenças humanas causadas por tripanossomatídeos, a leishmaniose, doença do sono e doença de Chagas; causadas por *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma bruci*, respectivamente. Essas doenças estão entre as doenças tropicais negligenciadas mais graves (VALVERDE, 2013; NEVADO, 2016).

As doenças negligenciadas são causadas por agentes infecciosos ou parasitas e são consideradas endêmicas em populações de baixa renda, sendo conhecidas como negligenciadas pois geram incapacidade, podendo também, matar milhões de pessoas. Ressalta-se que essas enfermidades podem apresentar indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas para produção de medicamentos e em seu controle (VALVERDE, 2013).

As espécies de *Leishmania* são classificadas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, estes parasitas possuem características morfológicas muito similares o que dificulta sua identificação por morfologia celular. Entretanto, estudos publicados Akhoundi et al. (2016) trazem esquematicamente a classificação taxonômica destas espécies, conforme apresentado na figura 01 (LAINSON e SHAW, 1987; WHO, 2010; NEVADO 2016).

Figura 1: Classificação taxonômica do gênero Leishmania



Fonte: Adaptado de Akhoundi et al., 2016.

De acordo com as manifestações clínicas, a leishmaniose pode ser classificada de duas formas distintas: a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) ou Calazar que é uma doença sistêmica muito grave, com migração dos parasitos para o fígado, baço e a medula óssea, podendo levar o hospedeiro a morte, e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que pode ser classificada como leishmaniose cutânea, caracterizada por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto e que podem levar meses para cicatrizar (LUNA e SILVA Jr., 2013).

A leishmaniose visceral (LV), é causada principalmente por *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* e ocasionalmente *L. tropica* se multiplicando no sistema retículo endotelial. A doença varia de uma infeção assintomática a uma condição fatal (WHO, 2010). É caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e fígado e anemia (MS, 2020) (Figura 2).

A maioria dos casos ocorre no Brasil, na África Oriental e na Índia. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram em todo o mundo anualmente, com apenas 25 a 45% relatados à OMS. Continua sendo uma das principais doenças parasitárias com surto e potencial de mortalidade (MS, 2017).

Em 2018, mais de 95% dos novos casos relatados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2020). A organização Médicos Sem Fronteira (MSF) tem realizado campanhas para pesquisas referentes a diagnósticos e medicamento para o tratamento adequados para essa doença negligenciada (MSF, 2018).

Figura 2: Leishmaniose visceral.

Fonte: Adaptado de MS 2017.

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões de pele, principalmente úlceras, nas partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e incapacidade ou estigma graves (Figura 3). É causada por muitas espécies de *Leishmania*, como *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no mundo antigo e *L. mexicana L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* no novo mundo (ORYAN et al., 2008; WHO, 2010).

A LTA (leishmaniose tegumentar cutânea) ainda pode ser subdividida em formas leishmaniose mucosas (LM), leishmaniose disseminadas (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A LM pode ocorrer com uma complicação de LC causada por espécie de Leishmania pertencente ao subgênero *Viannia*. As lesões metastáticas aparecem nas superfícies mucosas dos tratos respiratórios superior e digestivo. A LD é caracterizada por alto número de lesões pleomórficas, potencialmente na casa das centenas, em duas ou mais regiões anatômicas não contíguas. A metástase do parasita do local da infecção original de LD é rápido, geralmente ocorre dentro semanas ou até dias após a formação inicial da lesão. A LCD é uma forma rara, mas grave de LC, caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplas lesões satélites que podem

se aglutinar em placas que cobrem grandes áreas da pele (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, no Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. (MS, 2017). Em 2018, mais de 85% dos novos casos de leishmaniose cutânea ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica), Iraque, Paquistão, República Árabe da Síria e Tunísia. Estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram no mundo anualmente (WHO, 2020).

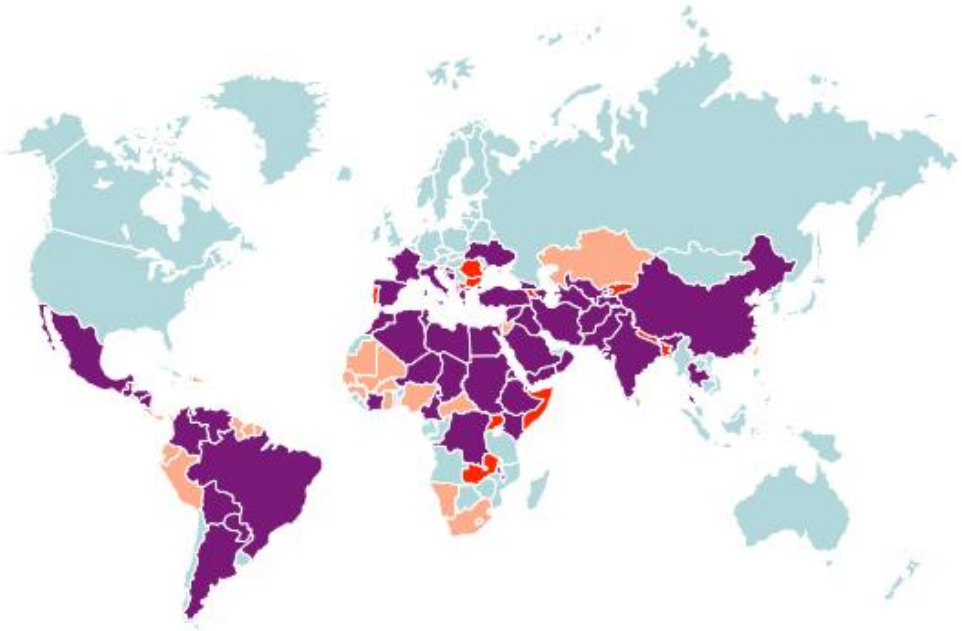
Figura 3: Leishmaniose cutânea.

Fonte: Adaptado de MS 2017.

Estima-se que 2 milhões de novas infecções por *Leishmania* ocorrem a cada ano, e que a leishmaniose esteja presente em cerca de aproximadamente 98 países (Figura 4). Ressalta-se que em meados da década de 80, a leishmaniose para a ter um caráter de doença reemergente, o que significou um aumento na incidência e ampliação da área de transmissão para regiões que não eram afetadas (LUNA e SILVA, 2013).

A leishmaniose foi denominada pela OMS como uma doença emergente e não controlada e que é foco de prevenção no controle de vetores, controle de reservatórios animais e pesquisa de vacinas (NEVADO, 2016).

Figura 4: Distribuição geográfica mundial de leishmanioses.



Legenda: Leishmaniose visceral (países representados na cor vermelha), leishmaniose cutânea (países representados na cor salmão) ambas (países representados na cor roxa)
Fonte: (NEVADO, 2016).

No passado, a leishmaniose era considerada uma zoonose restrita a áreas rurais, no entanto, com a devastação da fauna e da flora, associadas aos movimentos migratórios, processos de urbanização, habitação de regiões periurbanas, facilidade dos meios de transporte e desenvolvimento turístico a infecção passou a ser endêmica em várias regiões do mundo passando a ocorrer com maior frequência em humanos e animais domésticos, o que torna a transmissão independente do ciclo silvestre (DESJEUX, 1996; LUNA e SILVA, 2013; AKHOUNDI et al., 2016).

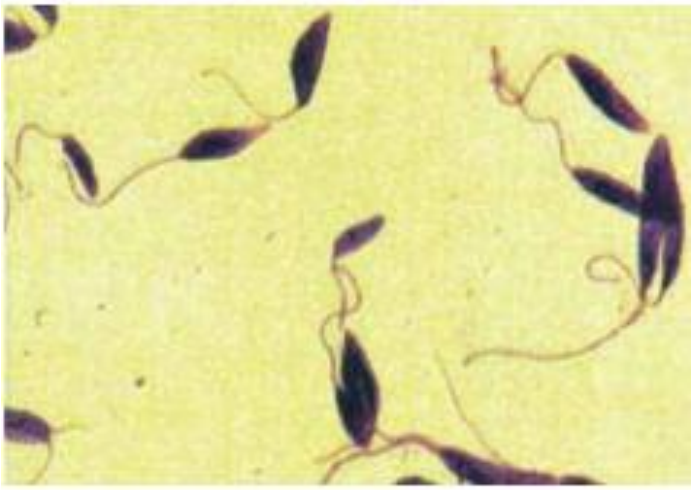
2.2 O Parasito e o Vetor

O gênero *Leishmania* agrupa um considerável número de espécies de protozoários unicelulares e flagelados que são caracterizados principalmente pela presença de uma única mitocôndria e uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida, conferindo a estes protozoários formas celulares bem definidas durante seu ciclo evolutivo (SHAW, 1994).

No ciclo de vida do parasito existem duas formas morfológicas principais, as promastigotas e as amastigotas. As promastigota são encontradas no trato digestório do inseto vetor (Família – Phlebotominae) e amastigota, parasito intracelular obrigatório encontrado em

hospedeiros vertebrados (SILVA et al, 2014). As promastigotas são alongadas com flagelo na região anterior, medindo 16,0 a 40,0 µm de comprimento e 1,5 a 3,0 µm de largura, incluindo o flagelo, que geralmente é maior do que o corpo (ALBUQUERQUE, 2006), sendo o núcleo arredondado ou oval localizado na região mediana da célula (Figura 5) (SILVA et al, 2014).

Figura 5: Formas promastigotas de Leishmania encontradas no intestino do vetor.



Fonte: Adaptado MS 2017.

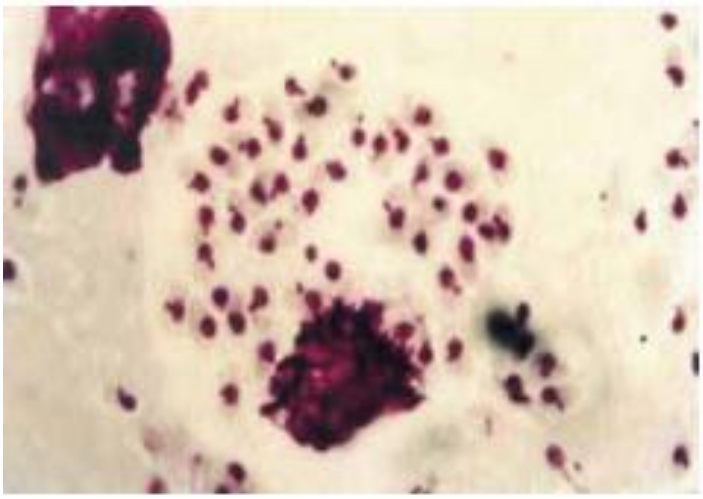
A transmissão dos protozoários dos vetores para os hospedeiros ocorre a partir da picada da fêmea do flebotomíneo infectada, que busca alimento – repasto sanguíneo para a maturação dos ovos. No Brasil, espécies do gênero *Lutzomyia* estão presentes em todas as regiões do país, onde recebem nomes populares, tais como, “cangalha”, “mosquito-palha”, “birigui” e “tatuíra” (POZZO, 2006). Estes insetos são morfologicamente menores do que os mosquitos comuns apresentam-se muito pilosos e têm coloração clara (Figura 6). Ao picar o vertebrado, o vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas infectantes do parasito, juntamente com a saliva – esta última com comprovado papel modulador de resposta imunológica do hospedeiro o que facilita o sucesso da infecção e a sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (THEODOS; TITUS, 1993).

Figura 6: Flebotomíneo sobre a pele.

Fonte: Adaptado STEBUT, 2015.

Os parasitos assumem a forma amastigota (Figura 7) no interior das células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos dos hospedeiros mamíferos. Os amastigotas são ovoides ou esféricos, com flagelo curto, variando seu tamanho de acordo com a espécie do parasito, medindo entre 1,5-3 µm x 3-6,5 µm de diâmetro. Seu núcleo é arredondado e ocupam cerca de um terço do corpo do parasito (SILVA et al, 2014).

Figura 7: Formas amastigotas de *Leishmania* encontradas no organismo vertebrado.

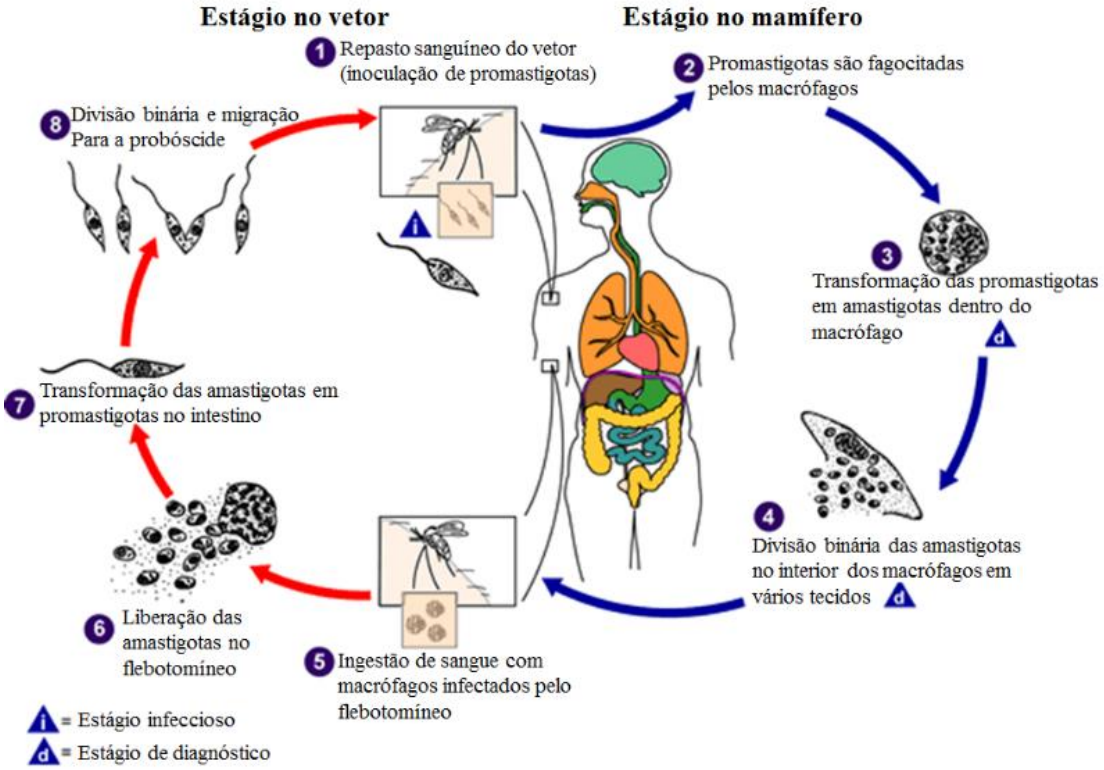


Fonte: Adaptado MS, 2017.

As amastigotas reproduzem-se por divisão celular binária, dentro dos macrófagos, causam lise celular, e infectam outros macrófagos. Durante o repasto sanguíneo do inseto vetor em um vertebrado infectado, ocorre a ingestão das formas amastigotas e em seu intestino ocorre

a diferenciação em formas promastigotas, fechando o ciclo de vida do parasito (HANDMAN, 2001; HEPBURN, 2000) (Figura 8).

Figura 8: Ciclo biológico da Leishmania



Fonte: Adaptado STEBUT, 2015.

Na LC, os parasitos infectam macrófagos residentes na pele. Quando a célula hospedeira está cheia de parasitos, a célula se rompe e as amastigotas liberadas infectarão células vizinhas. Na LV, no entanto, as amastigotas liberadas são espalhadas pela circulação sanguínea e infectam células do sistema de fagocitose mononucleares, baço, medula óssea, linfonodos e intestino (STEVERDING, 2017).

2.3 Tratamento da Leishmaniose

O tratamento de diversos tipos de leishmaniose no mundo é feito administrando duas formulações de antimoniais pentavalentes: o antimoniato de meglumine (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostan), sendo o segundo não comercializado no Brasil, que

formam a primeira linha de fármacos utilizados para o tratamento dessas doenças (MS,2017; WHO, 2010). Seus efeitos colaterais mais frequentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaleia, febre, vômitos, tontura e edema na região de aplicação. Cardio, hepato e nefrotoxicidade também são observadas, limitando o uso dessas drogas, especialmente em pacientes idosos e por ser abortiva, a droga também é vetada para gestantes. Geralmente, esses efeitos colaterais são discretos e não exigem a suspensão do tratamento, esta droga é utilizada por ser economicamente mais viável (SANTOS et al., 2008, ALMEIDA e SANTOS, 2011).

O antibiótico, anfotericina B, de reconhecida ação leishmanicida, é normalmente a opção quando o antimonial se torna proibitivo ou inoperante. Este fármaco é considerado de "segunda linha", pois apesar de eficaz para lesões cutâneas, apresenta sérios efeitos colaterais como náuseas, vômitos, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. O uso endovenoso do medicamento e os quadros de cardio e nefrotoxicidade impedem o seu uso fora de ambiente hospitalar (HEPBURN, 2000; MS, 2017).

A anfotericina B, atravessa a barreira placentária, porém em estudos de reprodução animal, foi observado que o feto não sofreu danos relacionado ao uso do medicamento para a leishmania. Assim, pelo fato de não terem sido realizados estudos controlados com mulheres grávidas, este medicamento tem sido empregado durante a gravides, observando-se os cuidados e se os benefícios obtidos prevalecerem sobre os riscos ao feto (MS, 2017).

Assim como a glucantime, a anfotericina B também atravessa a barreira placentária, porém estudos em reprodução animal não apresentaram danos ao feto (ALMEIDA e SANTOS, 2011)

A pentamidina é indicada como alternativa nos casos de leishmaniose cutânea. A eficácia nos casos com acometimento mucoso é questionável. A hipoglicemia é um efeito adverso imediato comum, sendo necessária realização de glicemia capilar antes da administração da droga. Os efeitos colaterais tardios são alterações da função renal e do eletrocardiograma, elevação das enzimas hepáticas e abscesso glúteo, no local de aplicação (BERMAN, 2003; WHO, 2010; MS, 2017).

As características indesejáveis como os severos efeitos colaterais, aliadas ao aparecimento de formas resistentes de Leishmania, (IWU et al, 1994; SILVA et al., 1995; BLANCO e NASCIMENTO Jr, 2017) têm aumentado a necessidade de novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos.

No Brasil o tratamento para a leishmaniose é gratuito, diferentemente dos demais países endêmicos que o tratamento é relativamente caro para a população acometida (MS, 2017).

A leishmaniose é uma doença de grande impacto, pois causa sérias complicações, podendo levar até a morte. O tratamento é difícil, pois os medicamentos disponíveis apresentam efeitos colaterais, toxicidade, altas taxas de intolerância pelos usuários, além de existirem poucas opções terapêuticas (MS, 2017).

Apesar do progresso significativo obtido durante os últimos anos em quimioterapias para leishmaniose, todos os medicamentos têm alguma limitação, como: preço, viabilidade, segurança, eficácia, toxicidade, efeitos colaterais e probabilidade de resistência crescente. Ensaios clínicos com terapias combinadas estão apresentando resultados positivos, a combinação de dois ou mais medicamentos pode reduzir a duração do tratamento e quantidade de doses e, consequentemente a toxicidade, mas ainda existe a probabilidade de desenvolvimento de resistência ao medicamento (SINGH, KUMAR, SINGH, 2012).

Relacionado a vacina, o progresso recente na pesquisa leishmanicida não garante sobre a disponibilidade de possíveis candidatos a antígenos leishmania. Assim, a identificação de novos alvos de drogas e desenvolvimento de agentes leishmanicida efetivo deve ser a área prioritária de pesquisa, tornando-se relevante a busca por novas drogas com atividade leishmanicida. Nessa perspectiva, as plantas medicinais podem ser fonte de substâncias, pois apresentam uma infinidade de substâncias bioativas (SINGH, KUMAR, SINGH, 2012; MS, 2017).

2.4 Produtos Naturais

Devido ao avanço sucessivo do uso de medicamentos fitoterápicos, as plantas de importância medicinal têm sido largamente investigadas devido a existência de moléculas bioativas (DINIZ; ASTARITA; SANTARÉM, 2007). As plantas medicinais tradicionais formaram a base da maioria dos primeiros medicamentos, seguidos por estudos clínicos, farmacológicos e químicos (TIUMAN, 2005).

Os constituintes químicos das plantas e de animais são biossintetizados mediante a reações enzimáticas. Essas reações são classificadas bioquimicamente em dois grupos: dos metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários são constituídos de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e os biopolímeros, como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (MANN, 1994; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Os metabólitos secundários geralmente, não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento ou reprodução de um organismo, sendo produzidos como resultado da adaptação do organismo ao seu ambiente. Exercem função de defesa contra predadores e

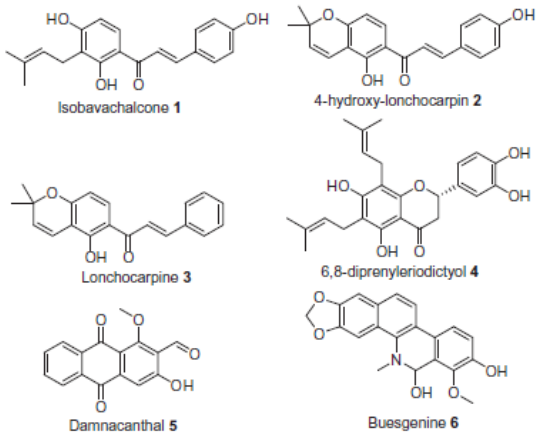
patógenos atuando como agentes alelopáticos, onde são liberados para exercer efeitos sobre outras plantas, de atrair polinizadores ou agirem como dispersores de sementes (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; PRATA; MOGOLLÓN; AUGUSTO, 2016). Outra característica dos vegetais, em relação ao metabolismo secundário é a elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (DEWICK, 2002).

Mesmo que os metabólitos primários apresentem relevância em determinados setores, o alto número e vasta diversidade dos metabólitos secundários vegetais têm incentivado pesquisadores em diversos ramos da ciência, já que estes apresentam uma fonte favorável e promissora de novas moléculas essenciais ao homem (SIMÕES et al., 2002)

2.5 Metabólitos Secundários com atividades leishmanicida

Sandjo et al., (2016), avaliaram chalconas (1-3), flavona (4), antraquinona (5) e alcaloide (6), contra amastigotas de *L. amazonensis* e *T. cruzi*. Os compostos 2–4 e 6 exibiram atividade antileishmania, enquanto 3 e 5 demonstraram efeito tripanocida. O alcaloide benzofenantridina (6) apresentou efeito contra amastigotas de *L. amazonensis*, com IC_{50}=5,70 $\mu g.ml^{-1}$, tendo o maior índice de seletividade (IS>7,69), sugerindo ser mais seletivo ao parasito do que a célula THP-1. Os compostos 4-hidroxiloncocarpina (2) e lonchocarpina (3) também apresentaram efeitos para o mesmo patógeno, com IC_{50}=7,41 $\mu g.ml^{-1}$ e 6,66 $\mu g.ml^{-1}$, respectivamente, ambos com índice de seletividade cerca de 3 (Figura 9).

Figura 9: Estruturas das substâncias.

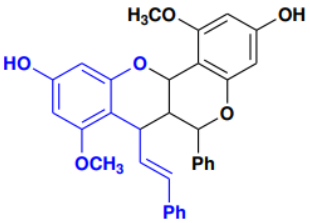


Fonte: SANDJO, 2016.

Segundo Machado et al., (2008), os flavonoides representam um dos grupos mais importantes entre os produtos de origem vegetal, sendo amplamente distribuídas neste reino.

Nascimento (2019), avaliou o potencial *in vitro* e *in vivo* de flavonoides isolados da fase dicloroetânica das raízes da *Fridericia platyphylla*, denominados de braquidinas-1, 2 e 3. As braquidinas 2 e 3 mostraram potente atividade contra a *L. amazonensis*, nas formas promastigotas e amastigotas. Observou-se que a braquidina-2 apresentou-se mais ativa contra amastigotas, que é a forma mais severa do parasita (Figura 10).

Figura 10: Estrutura do flavonoide braquidina.



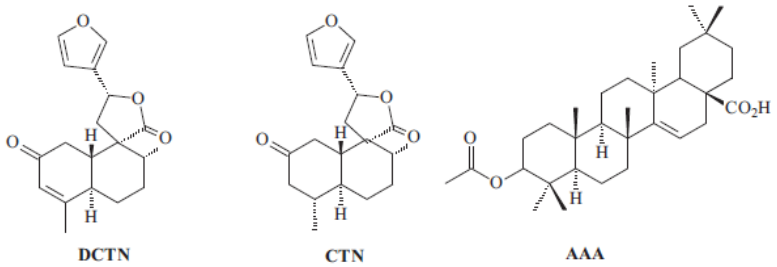
Fonte: Adaptado de NASCIMENTO 2019.

Na busca por compostos leishmanicidas naturais, Beer et al. (2016) avaliaram a atividade leishmanicida dos flavonoides eupatorina e 5-desmetilsinensetina isolados das partes aéreas da *Stevia satureiifolia* var. *satureiifolia* contra *L braziliensis*, sendo ativos para a espécie testada.

Os terpenos, outra classe de especial importância, corresponde a um grupo extenso de substâncias com relevante prática, são formados pela união de unidades de isopreno (C_5H_8) que se unem, formando cadeias maiores (DEWICK, 2002).

Lima et al., (2015), investigaram os efeitos dos diterpenos clerodano, *trans*-desidrocrotonina (DCTN), *trans*-crotonina (CTN) e ácido acetilaleuritólico (AAA) obtidos a partir da casca em pó de *Croton cajucara* (Figura 11), contra promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis.* As formas promastigotas apresentaram maior sensibilidade ao diterpeno clerodano DCTN, com IC_{50} = 12,07±0,06 µg.mL^{-1} em 24 h de cultura. Os três terpenos foram testados contra forma amastigotas axênicas, onde o diterpeno DCTN apresentou melhor atividade, com IC_{50}=19,98±0,05µg.mL^{-1}, resultados semelhantes foram encontrados para as formas promastigotas. Os diterpenos clerodanos mostraram-se promissores em efeitos leishmanicida *in vitro* contra *L. amazonensis.*

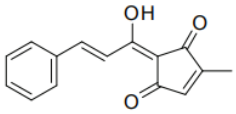
Figura 11: Substâncias obtidas a partir da casca em pó de *C. cajucara*.



Fonte: Adaptado de LIMA 2015.

O gênero *Piper*, rico em flavonoides, alcaloides e terpenos foi investigado quanto a atividade Leishmanicida. Gonçalves et al (2012) realizou o estudo químico das raízes da *Piper carneconectivum*, resultando no isolamento do terpeno 2-[1-hidroxi-3-fenil-(Z,2E)-2-propenilideno]-4-metil-4-ciclopentano-1,3-diona (DCPC) (Figura 12). A substância isolada inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* com IC_{50} de 4,4 µg.mL^{-1}, não afetando a viabilidade dos macrófagos. Esse resultado demonstra que a DCPC é uma molécula promissora contra Leishmaniose.

Figura 12: Molécula DCPC isolada da *Piper carniconectivum*.



Fonte: Gonçalves et al 2012.

De acordo com ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, (1997), muitos medicamentos de origem natural surgiram a partir de alcaloides, sendo eles uma fonte significativa. Dentre eles recebem maior importância: quinina, empregada no tratamento de malária, a vincristina, empregada em alguns tipos de câncer, a morfina empregada para o alívio da dor em pacientes terminais (Figura 13).

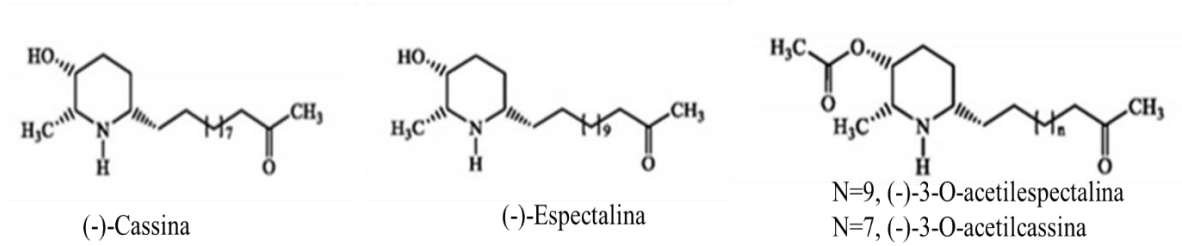
Figura 13: Estruturas de alcaloides importantes agentes terapêuticos.

Fonte: Adaptado de LACERDA, 2017.

Melo et al., (2014), avaliaram a atividade leishmanicida do extrato etanólico e frações das flores de *Senna spectabilis*, e verificaram que a mistura de alcaloides (-)-cassina e (-)-espectalina, que apresentaram atividade significativa contra parasitas *L. major* (IC_{50} 24,9±1,4 $\mu g.ml^{-1}$).

Lacerda (2018), realizou estudo químico do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*. Neste trabalho foram isolados os compostos (-)-cassina, (-)-espectalina, (-)-3-O-acetilcassinabem, (-)-3-O-acetilespectalina (Figura 14), onde os resultados demonstraram atividade frente a *L. amazonensis*, com IC_{50}=25,18 $\mu g.mL^{-1}$; 15,81 $\mu g.mL^{-1}$; 30,25 $\mu g.mL^{-1}$; 25,95 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente. Ao avaliar o índice de seletividade foi possível observar a atividade leishmanicida em concentrações não citotóxicas, demonstrando que os compostos têm caráter promissor para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes, que não apresentem efeitos colaterais no tratamento da leishmaniose.

Figura 14: Estruturas de alcaloides isolados das flores da espécie *Senna spectabilis*.



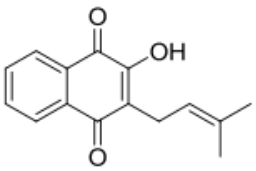
Fonte: Adaptado de MELO et al, 2014

Uma outra classe de grande importância são as quinonas, que são representadas por moléculas de origem natural, que apresentam primordial importância como microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, atuando de diferentes formas.

O estudo de um importante componente extraído do cerne da *Tecoma* e *Tabebuia*, o lapachol (Figura 14), uma naftoquinona, foi avaliado quanto a ação contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, demonstrando eficácia, com o IC_{50} de 5,2 $\mu g.mL^{-1}$ e 11,9 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente (LIMA et al, 2004).

Araújo et al., (2014) também avaliou a atividade leishmanicida *in vitro* para formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, em relação ao lapachol, molécula abundante, que ocorre naturalmente nas espécies *Handroanthu*. O lapachol demonstrou uma importante atividade leishmanicida, com IC_{50} = 79,84 ± 9,10 e 135,79 ± 33,04µM e índice de seletividade 42,65 e 25,08 µM respectivamente, para *L. amazonensis* e *L. infantum*, além de baixa citotoxicidade. Os resultados de atividade leishmanicida realizados em amastigotas também mostraram atividade nos testes *in vitro*.

Figura 15: Estruturas naftoquinona lapachol.



Fonte: Adaptado ARAÚJO et al., 2014.

A avaliação científica de plantas medicinais populares, fornecem substâncias eficazes para o tratamento de doenças causadas por parasitos protozoários, incluindo as classes das

quinonas, alcaloides, terpenos, entre outros (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; LIMA et al., 2004).

As espécies vegetais têm trazido respostas positivas para utilização como alternativa para tratamento de doenças. Assim, estudos com extratos e substâncias isoladas de plantas tem sido amplamente avaliado por grupos de pesquisa em produtos naturais, além de atribuir possíveis novos usos terapêuticos, e por fim, contribuir para o registro da atividade químico-biológica de espécies vegetais (FERREIRA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2018).

2.6 Família Iradaceae e o gênero *Eleutherine.*

Iridaceae é uma família de monocotiledôneas, composta por 1.900 espécies distribuídas em 65 gêneros, com uma distribuição praticamente em todo o mundo, com uma concentração maior na África, onde existem cerca de 1.190 espécies distribuídas em 37 gêneros (GOLDBLATT, MANNING 2006). No Brasil, essa família de monocotiledôneas é representada por 23 gêneros e 190 espécies (GIULIETTI et al, 2005; ZAPPI et al., 2015).

A família é conhecida pela variedade de suas flores, especialmente entre os gêneros presentes na África meridional. Na África, a diversidade de espécies está concentrada especialmente no Sul, onde foram registradas mais de 1.050 espécies, cerca dos quais 720 estão restritas ao extremo sudoeste do continente (GOLDBLATT; MANNING, 2006).

E. bulbosa (Mill.) Urb. é também conhecida como *E. americana* (Aubl) Merr e *E. plicata* (Sw.) Herb. apresentam as mesmas propriedades, sendo consideradas como a mesma espécie (LORENZI; MATOS, 2002; INSANU; KUSMARDIYANIA; HARTATI, 2014; COUTO et al., 2016), fato que se confirma segundo dados do SiBBr (2021), além de apresentar outros sinônimos. Segundo o Ministério da Ciência e Tecnologia (2021), *E. bulbosa* é conhecida como tiriricão e marupá, estes dados foram encontrados no Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil, 2021. Segundo o a *E. bulbosa*, conhecida comumente como marupá e tiricão. Estima-se que o Brasil possui 188 registros desta planta no país (Figura 16).

Figura 16: Mapa de Registros de ocorrência da *E. bulbosa* no Brasil.

Fonte: SiBBr, 2021.

E. bulbosa (Mill.) é uma planta medicinal pertencente à família Iridaceae e distribuída na região amazônica. Herbácea bulbosa e rizomatosa, acaule, entouceirada, de 20 a 30 cm de altura, nativa da América tropical, incluindo os campos secos da Amazônia brasileira. Os bulbos possuem escamas semelhantes à cebola, cor de vinho externamente, exsudando látex branco quando cortados. Suas folhas são simples, inteiras, plissadas longitudinalmente, de cerca de 25 cm de comprimento. As flores são brancas ou rosadas, dispostas numa panícula ampla no ápice de um longo escapo rígido da folhagem, que se abrem ao pôr do sol (LORENZI; MATOS, 2002) (Figura 17).

Na América do Sul, conhecida popularmente por: coquinho, lírio-folha-de-palmeira, marupa, marupai, marupa-piranga, marupari, marupazinho, palmeirinha, é utilizada conforme a tradição popular, onde os rizomas são empregados, como medicação caseira no tratamento de diarreia, amebíase, gastralgia, histeria, além da reputação existente de ter ação anti-fertilidade, sendo empregada como contraceptivo (LORENZI; MATOS, 2002).

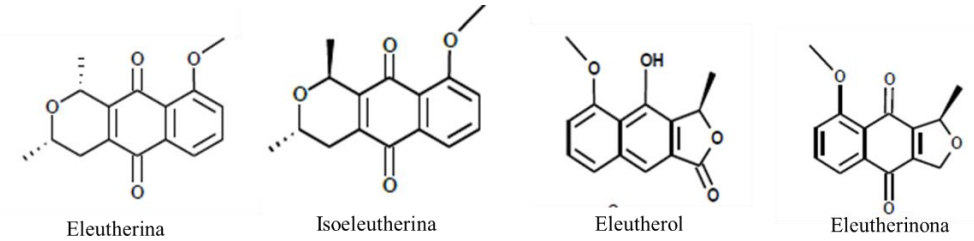
Figura 17: Bulbos e flores *E. bulbosa* (Mill.) Urb.

Fonte: Autora

O gênero Eleutherine, rica em compostos das quinonas, apresentam diversas atividades biológicas, tanto relacionado aos extratos brutos, como aos compostos isolados de seus bulbos.

Os bulbos da *E. bulbosa* foram submetidos a avaliação fungicida contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*, utilizando neste teste o extrato diclorometano e substâncias que foram isoladas deste extrato, eleuterinona, eleuterina, isoeleuterina e eleuterol (Figura 18), ressaltando que tanto o extrato diclorometano, quanto as frações demonstraram atividade fungicida relevante para o fungo (ALVES; KLOOS; ZANI, 2003).

Figura 18: Estruturas químicas isoladas da *Eleutherine bulbosa.*



Fonte: Adaptado de COUTO et al., 2016

Brasileiro et al., (2006), estudaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico dos bulbos da *E. bulbosa*, ao qual mostrou-se ativa frente à cepa *Staphylococcus aureus.* Ribeiro (2009), também realizou estudo sobre a atividade antimicrobiana do extrato etanólico dos bulbos, frente às cepas *S. aureus e Candida albicans*, obtendo resultado significantes, com melhor ação para *S. aureus*.

Novaryatiin e Ardhany (2019), investigaram a atividade antibacteriana, pelo método de difusão em disco, do extrato etanólico da *E. bulbosa*, frente as cepas de *Propionibacteruim*

acnes, *S. epidermidis*, *S. aureus*, sendo ativo para todas as bactérias testadas. Neste trabalho, foram identificados no extrato etanólico a presença de flavonoides, alcaloides, saponinas e taninos, classe de compostos que foram atribuídos a propriedade antibcteriana observada.

LESTARI, KARTIKA, MARLIANA, (2019), avaliaram a atividade antioxidante, frente ao radical livre DPPH, e atividade anticancerígena para células de leucemia $L_{1210,}$ em relação aos extratos das frações etanólica, n-hexano, $CHCl_3$ e água. A fração $CHCl_3$ demonstrou maior atividade para ambos os casos, apresentando alto potencial para as avaliações antioxidante e anticancerígenas.

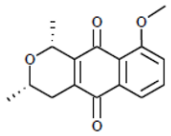
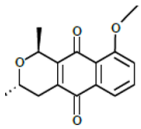
Outra importante avaliação está relacionada a atividade antioxidante da *E. bulbosa*, que segundo a pesquisa de Shi et al (2019), testaram a capacidade oxidante *in vitro* das folhas, flores e bulbos da *E. bulbosa*, e foi positivamente correlacionada com o conteúdo de flavonoides ou fenóis totais. Os resultados mostraram que a ordem decrescente da atividade antioxidante dos extratos foram respectivamente, bulbos, folhas e flores.

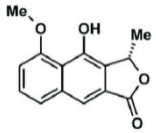
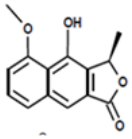
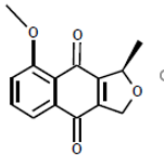
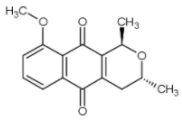
Martão (2013), também avaliou a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações $CHCl_3$, EtOAc e MeOH dos bulbos da *E. bulbosa*, onde o extrato etanólico apresentou resultados significativos, quando comparados às frações.

É importante relatar que quanto maior o teor de flavonoides e fenóis totais, maior a capacidade antioxidante (SALGUEIRO; CASTRO, 2016), corroborando assim com os resultados de atividade antioxidante observados por Shi et al (2019).

Segundo INSANU; KUSMARDIYANI; HARTATI, (2014), o gênero *Eleutherine* se destaca pelos três grupos principais de compostos, naftaleno, naftoquinona e antraquinona, e por suas propriedades farmacológicas. Neste trabalho o autor cita diversas moléculas isoladas da *E. american*a, bem como as atividades biológicas atribuídas a estas moléculas (Tabela 1).

Tabela 1: Moléculas isoladas da *E. plicata.*

Substância	Estrutura	Atividade biológica
Eleuterina		Anti-inflamatório Antinociceptivo Anti-hipertensivo
Isoeleuterina		Anti-inflamatório Antinociceptivo Anti-hipertensivo Inibidor da replicação do HIV

Isoeleuterol		Inibidor da replicação do HIV
Eleuterol		Anti-hipertensivo Inibidor da replicação do HIV
Eleuterinona		Inibidor da replicação do HIV
Isoeleuterina		Antidiabético

Fonte: Adaptado de INSANU; KUSMARDIYANI; HARTATI, (2014).

Couto et al., (2016), realizaram estudo de revisão bibliográfica sobre *E. bulbosa* (Mill.), relatando estudos relacionados às atividades farmacológicas e ao isolamento de constituintes químicos, tais como, eleuterina, eleuterol, eleuterinona, elecanacina, isoeleuterol, isoeleuterina, hongconina, eleutherinoside A, eleutosideo B, beta-sitosterol, eleutheriona.

Ainda neste estudo Couto et al., (2016), relata que processos de obtenção de extratos vegetais, composição farmacêutica foram patenteados para *E. plicata*, para o tratamento da malária, diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol no sangue, cura de doenças artrite reumatoide, artralgia e mialgia; e para a *E. bulbosa* no tratamento de doenças neuro-degenerativas, doenças cardíacas e diabetes, sendo o uso das folhas usados como giardicida.

As plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais podem constituir modelo para obtenção de novos fármacos com atividade frente a várias doenças negligenciadas.

Conforme evidenciado, *E. bulbosa* apresenta potencial terapêutico. Desta forma, identificar classe de substâncias, bem como garantir a segurança na utilização destes na medicina tradicional, ou até mesmo para indústria farmacêutica tem sido de primordial importância as pesquisas na área proposta.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico e frações: $CHCl_3$, EtOAc e acetona obtidas a partir dos bulbos da *E. bulbosa* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum. (reescrever de maneira detalhada)*

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as classes de substâncias presentes no extrato etanólico.
- Avaliar a atividade antipromastigota do extrato etanólico e frações $CHCl_3$, EtOAc e acetona frente a *L. amazonensis* e *L. infantum*.
- Determinar a inibição de crescimento de 50% (IC_{50}) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis e L. infantum.*
- Determinar a concentração citotóxica de 50% da população de células (CC_{50}) frente ao extrato etanólico e as frações de $CHCl_3$, EtOAc e acetona da *E. bulbosa.*
- Determinar o Índice de Seletividade (IS) das substâncias testados através da razão do CC_{50} e IC_{50} de *L. amazonensis* e *L. infantum.*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e Obtenção do extrato bruto

O material vegetal, bulbos de *E bulbosa*, foi coletado em junho de 2019 no centro comunitário da FIMCA (Centro Universitário Aparício Carvalho) localizado na rua dos Andrades número 2300, no bairro Mariana, zona Leste, cidade de Porto Velho.

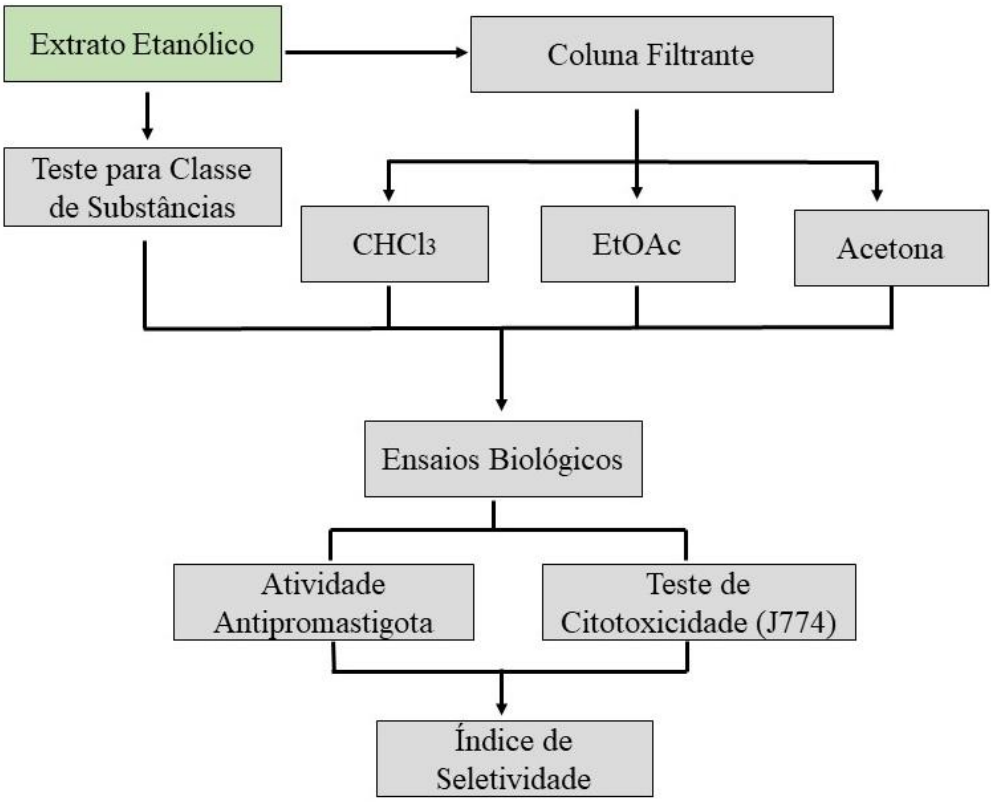
O material botânico coletado foi lavado em água corrente, permaneceu em solução de hipoclorito de sódio 5% por 10 min e foi lavado com água destilada até que ficasse livre da presença do hipoclorito de sódio. Posteriormente o material foi cortado e pesado (372,02 g), em seguida, foi condicionado à estufa para secagem, 40 °C por 72 h, após este procedimento o material vegetal seco foi pesado (155,92 g).

O material seco foi extraído com EtOH 95% por contato, por um período de 7 dias. Após esse tempo o material foi filtrado e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (FISATOM mod. 802A), obtendo-se o extrato EtOH. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. conforme método descrito por Di Stasi (1996). O extrato etanólico pesou 6,892 g.

O extrato etanólico foi submetido a cromatografia em coluna, usando sílica gel 60, 230-400 mesh (VETEC Química), com eluição do sistema de solventes em gradiente de polaridade, hexano, $CHCl_3$; EtOAc; acetona (Figura 19).

O extrato etanólico foi submetido a testes para classes de substâncias, relacionado aos metabólitos secundários, conforme descrito por Merck (1972).

Figura 19: Procedimentos realizados a partir do extrato etanólico e frações ($CHCl_3$, EtOAc e acetona) dos bulbos da *E. bulbosa.*



4.2 Teste para classe de substância

4.2.1 Esteroides e Terpenos

Dissolveu-se 1,0 mg do extrato etanólico em 1,0 mL de clorofórmio ($CHCl_3$), na capela, adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético $(CH_3CO)_2O$ e 4 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4). A coloração verde indica teste positivo para esteroides e a coloração vermelha positivo para terpenos (MERCK, 1972).

4.2.2 Flavonoides

Foi utilizado 1,0 mL de EtOH para dissolver 1,0 mg do extrato etanólico dos bulbos da *Eleutherine bulbosa*, onde foi adicionado 1,0 mg de magnésio em fitas e posteriormente 0,5mL

de HCl concentrado. A coloração avermelhada indica teste positivo para flavonoides (MERCK,1972).

4.2.3 Alcaloides

1,0 mg da amostra foi solubilizada em 1,0 mL de HCl, posteriormente adicionou-se 5 gotas de solução de Dragendorff (solução de iodeto de potássio e subnitrato de bismuto). A formação de um precipitado semelhante à flocagem, de coloração laranja indica teste positivo (MERCK,1972).

4.2.4 Saponinas

1,0 mg do material em estudo foi solubilizado em 5,0 mL de água destilada, agitou-se o recipiente a fim de visualizar a formação de espuma. A formação de espuma na solução indica teste positivo (MERCK,1972).

4.2.5 Quinonas

1,0 mg do extrato foi colocada em placa cromatográfica e sua coloração foi observada à luz ultravioleta (UV). Em seguida, a placa foi borrifada com solução de amônia. Se a coloração da amostra quando submetida a luz ultravioleta indicar coloração azul-violeta ou vermelha, indica teste positivo para quinonas (MERCK,1972).

4.3 Ensaio da atividade antipromastigota

As análises foram realizadas no laboratório da Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose, PBML-FIOCRUZ-RO, sob responsabilidade da Dra. Carolina Bioni G. Teles.

Para o ensaio de atividade antipromastigota de *L. amazonensis* e *L. infantum* as culturas foram centrifugadas em meio RPMI completo por 15 min a 1500 rpm para posteriormente serem quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 1 x 10^6 parasitas/poço. Foram adicionados 180 µL de meio RPMI com as formas promastigotas de *L. amazonensis* (1x10^6/mL) e 20 µL da amostra testada em cada poço. Essa concentração foi aplicada em placas de cultura de células com 96 cavidades de fundo chato, em diluição seriada do extrato etanólico e frações $CHCl_3$ EtOAc e acetona com concentrações de 200µg/mL a 6,25

µg/mL, diluição com DMSO a 0,5%, logo após foram incubadas a 24°C por 72 h em estufa BOD. Como controle positivo foi utilizado pentamidina na concentração de 3 µg/poço e o controle negativo foi utilizado leishmania na concentração de $1x10^6$ em cada poço da placa.

Para a revelação do experimento após o tratamento foram adicionados 20 µL de resazurina (Alamar Blue®) a uma concentração inicial de 2 mM diluído em PBS 1X. A resazurina é empregada em ensaios de citotoxicidade, proliferação, viabilidade celular e determinação da função mitocondrial (ROLÓN et al, 2006). A fluorescência foi determinada em espectrofotômetro Synergy HT (BioTek) excitação de 530/25 e emissão de 590/35 após 5 h de incubação a 24 °C, com revelador colorimétrico. A unidade apresentada é a Unidade Relativa de Luz (URL), que é convertida para a porcentagem de inibição de crescimento, valores processados pelo programa Gen5® 5.11.

Os dados obtidos serão utilizados para encontrar a concentração capaz de inibir o crescimento no mínimo de 50% das promastigotas (IC_{50}) por meio da análise de regressão linear, utilizando o programa Origin® 9.1.

4.4 Ensaio de citotoxicidade e determinação do Índice Seletividade

A linhagem de célula J774 (macrófago) foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado a 10% de soro fetal bovino (SFB), mantida em estufa com 5% de CO_2, 95% de umidade e 37 °C, sendo feitas trocas de meio e repiques sempre que necessário. O crescimento e viabilidade foram observados diariamente em microscópio invertido até que a cultura atingisse 90% de confluência para montagem dos experimentos de citotoxicidade (CALVO-CALLE et al. (1994).

A viabilidade de células J774 foi avaliada através do método colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) (MOSMANN, 1983). As células foram ajustadas para $1x10^4$ células/poço e tratadas por 72 h em diluição seriada do extrato etanólico e fração $CHCl_3$ com concentrações entre 500 µg a 7,8 µg, em estufa de CO_2 a 37 °C por 72 h. (concentrações iguais).

Posteriormente foi adicionado 20 µL de MTT, a uma concentração de 5 $mg.mL^{-1}$ diluído em solução tampão fosfato salino (PBS) 1x, sendo incubadas por mais 4h nas mesmas condições de cultivo. Em seguida o sobrenadante foi retirado e adicionado 100 µL de DMSO por poço para a solubilização dos cristais resultantes da redução do MTT, realizando a leitura em seguida. A obtenção dos valores de absorbância resultante da solubilização dos cristais de

formazan foi obtida utilizando o leitor de ELISA Asys Expert Plus (Biochrom, Hollister, MA, EUA) com comprimento de onda de 570 nm.

Os dados obtidos serão utilizados para encontrar a concentração capaz de provocar a perda de viabilidade de 50% (Concentração Citotóxica, CC_{50}) por meio da análise de regressão linear, utilizando o programa Origin® 9.1, obtendo-se assim, a porcentagem de células viáveis em relação às células controles. Foram considerados como controle de viabilidade as células não tratadas, controle de morte as células tratadas com tampão de lise e branco o mesmo meio RPMI utilizado no restante da placa. Os testes de CC_{50} foram realizados em triplicata por duas vezes sob as mesmas condições acima citadas para melhor garantia dos resultados (MADUREIRA et al., 2002).

A viabilidade foi determinada com base na seguinte equação:

$$\textbf{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{Absorbância teste} - \text{Absorbância Branco}) \times 100}{(\text{Absorbância controle} - \text{Absorbância Branco})}$$

Com os valores de IC_{50} e CC_{50} foi possível obter o índice de seletividade (IS), sendo calculado utilizando a fórmula:

$$\textbf{Índice de Seletividade} = \frac{CC_{50}\ \text{células}}{IC_{50}\ \text{promastigotas}}$$

O valor do índice de seletividade mostra quantas vezes o extrato ou fração testada é mais seletivo ao parasito em relação às células. Sendo que quanto maior o valor do IS, maior é toxidade para o parasito em relação a célula (BÉZIVIN et al., 2003).

4.5 Análise Estatística

A análise estatística dos IC_{50} e CC_{50} foi realizado com auxílio do programa estatístico Origin® 9.1 em uma regressão linear, com determinação do nível de significância para $p<0,05$. Os dados foram expressos em média±desvio padrão. Os valores encontrados forma comparados utilizando o Teste de Tukey ao nível de confiança de 95%. O teste foi realizado utilizando o software Sisvar 5.6 (Build 86).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A literatura apresenta estudos que foram desenvolvidos a partir do conhecimento popular na utilização de produtos naturais (COUTO et al., 2016; CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2011). Os metabólitos secundários, derivados de plantas de diversas famílias, tem sido avaliado quanto a sua atividade biológica, com finalidade de atuarem como possíveis agentes terapêuticos.

Neste trabalho as frações $CHCl_3$, EtOAc e acetona e hexano provenientes do extrato etanólico, dos bulbos da *E. bulbosa*, apresentaram as massas que estão descritas na tabela 2. As frações $CHCl_3$, EtOAc e acetona foram testados quanto a atividade promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, já a fração hexânica, devido à baixa quantidade obtida, não foi testada para os patógenos.

Tabela 2: Massa das frações obtidos a partir do extrato etanólico.

Fração	Massa (g)
Hexano	0,167
$CHCl_3$	1,824
EtOac	2,783
Acetona	3,416

5.1 Testes para classes de substâncias

Os testes para classe de substâncias realizado com extrato etanólico apresentaram resultado positivo para terpenos, flavonoides, alcaloides e quinonas, conforme apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados obtidos para teste de classe de substâncias do extrato etanólico *E. bulbosa.*

Classe de substância	Extrato etanólico
Esteroides	Negativo
Terpenos	Positivo
Flavonoides	Positivo
Alcaloides	Positivo
Saponinas	Negativo
Quinonas	Positivo

A análise da classe de substâncias é de primordial importância no delineamento experimental, relacionado a avaliação de determinadas patologias. Os flavonoides, alcaloides, terpenos e quinonas têm recebido bastante atenção nos últimos anos, devido a diversas

propriedades farmacológicas apresentadas por estas classes de substâncias (SIMÕES et al., 2002).

LESTARI, KARTIKA, MARLIANA, 2019, realizaram estudo fitoquímico do extrato etanólico da *E. bulbosa*, e quanto a análise das classes de substâncias, obtiveram resultados positivo para alcaloides, flavonoides, taninos e quinonas. Novaryatiin e Ardhany (2019) também realizaram estudo fitoquímico da *E bulbosa* e tiveram resultado positivo para flavonoides, alcaloides, saponinas e taninos. Os resultados encontrados nas pesquisas citadas, corroboram os resultados obtidos nessa pesquisa.

A atividade leishmanicida de alguns extratos tem sido atribuída aos flavonoides. Em uma pesquisa realizada por Manjolin et al., (2013) foi constatado que flavonoides dietéticos como fisetina (o alcaloide mais potente), quercetina, luteolina e 7,8-hidroxiflavona com características de baixa citotoxicidade são capazes de inibir a enzima arginase de *L. amazonensis.*

As quinonas são conhecidas por apresentarem alta citotocixidade, e com isso serem responsáveis por intensa atividade antitumoral, devido a suas estruturas químicas apresentarem unidade quinonoídica capaz de gerar intermediários alquilantes, conhecidos por serem agentes antineoplásicos biorredutores, através da ativação por redução de suas carbonilas quinonoídicas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; LIN et al., 1984).

Quanto aos terpenos, resultados promissores foram encontrados por Santana et al., (2020), que avaliaram a óleo-resina das espécies *Protium altsonnii* e *Protium hebetatum*. Nos dois casos foram obtidos o α-pineno, *para*-cimeno e 1,8-cineol, demonstrando efeitos tóxicos para promastigotas e amastigotas em relação aos dois gêneros de Leishmania, apresentando uma baixa dose dependente.

5.2 Atividade leishmanicida

Para a utilização de novos quimioterápicos em humanos, faz-se necessária prévia avaliação desses compostos *in vitro* e *in vivo*. Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos leishmanicida, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita (BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004; GARCIA et al., 2012). Infelizmente, a eficácia da maioria desses compostos foi determinada apenas em estudos *in vitro* e, portanto, eles ainda estão em estágios iniciais de ensaios pré-clínicos para serem aplicáveis na prática clínica e a tradução de seus resultados na prática clínica em um campo negligenciado (COLARES et al., 2013).

A busca por novos fármacos com ação leishmanicida é constante, principalmente pela alta toxicidade dos fármacos de primeira escolha, como o glucantime e pentamidina (WHO, 2010). A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de extratos de plantas baseados na experiência popular é uma prática comum, contudo, apenas uma pequena porcentagem desses extratos realmente apresenta atividade antiparasitária (MOREIRA et al., 2007).

A avaliação da atividade antipromastigota tem sido realizada em diversos trabalhos como ensaio de triagem para atividade leishmanicida, o rastreamento feito em formas promastigotas é fácil, reproduzível e rápido, no entanto, não são a forma infectante do parasita em hospedeiros vertebrados, portanto essa avaliação deve ser complementada usando amastigotas intracelulares em macrófagos (SOUZA et al., 2020; GARCIA et al., 2012). Para avaliar a atividade leishmanicida de um composto, alguns critérios são considerados, dentre eles: IC_{50}, CC_{50} e índice de seletividade (MAHMOUDVANT et al., 2014). Um composto natural é seguro quando apresenta o índice de seletividade maior que 10 (MANJOLIN et al., 2013; MAHMOUDVANT et al., 2014).

Nesta pesquisa, para o extrato etanólico de *E. bulbosa*, na maior concentração testada (200 $\mu g.ml^{-1}$) foi possível observar a inibição do crescimento de formas promastigotas, 28% para *L. amazonensis* e 70% para *L. infantum*. Para a *L. amazonensis* a concentração de 50 $\mu g.ml^{-1}$ inibiu apenas 3% das formas promastigotas e não houve inibição para as demais concentrações. Para *L. infantum* a concentração de 50 $\mu g.ml^{-1}$ houve 47% de inibição e na concentração de 25 $\mu g.ml^{-1}$, 1% de inibição. Quanto as demais concentrações não houve inibição no crescimento de formas promastigotas.

Para a fração $CHCl_3$ de *E. bulbosa* foi possível observar a inibição de formas promastigotas na maior concentração testada (200 $\mu g.mL^{-1}$) de 99% para L. *amazonensis* e 100% para *L. infantum*. Para *L. amazonensis* a concentração 50 $\mu g.mL^{-1}$ inibiu 47% do crescimento e para demais concentrações não apresentou inibição. Para *L. infantum* a concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$ houve inibição de 96%, e em 25 $\mu g.mL^{-1}$, 84% de inibição. Para as demais concentrações testadas não houve inibição no crescimento de formas promastigotas.

A tabela 03 apresenta os resultados de atividade leishmanicida para o extrato EtOH e frações ($CHCl_3$, EtOAc e Acetona), podendo-se observar que para o extrato EtOH e fração $CHCl_3$ foi possível calcular o IC_{50}, para *L. infantum*, enquanto para a *L. amazonensis* foi possível calcular IC_{50} apenas para a fração $CHCl_3$. Em relação as frações EtOAc e Acetona não foi possível determinar o $IC_{50,}$ pois para a maior concentração testada, 200 $\mu g.mL^{-1}$, não houve inibição de crescimento de formas promastigotas para as espécies testadas.

Tabela 4: Atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico e frações da *E. bulbosa* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum.*

	IC_{50} (µg. mL^{-1}) (média±DP)	
	L. amazonensis	***L. infantum***
Extrato EtOH	>200	51,6 ± 0,71
Fração $CHCl_3$	50,1 ± 0,0	21,85 ± 3,32
Fração EtOAc	>200	>200
Fração Acetona	>200	>200
Pentamidina	1,0 ± 0,0	1,32 ± 0,22

IC_{50}= Inibição de crescimento de 50% das promastigotas, ±DP= resultados correspondem à média de três experimentos para cada amostra e desvio padrão.

(explicar na forma de texto)

A *L. amazonensis* apresentou o IC_{50} para a fração $CHCl_3$, com valor de 50,1 µg.mL^{-1}. Para *L. infantum* o valor de IC_{50}, para o extrato etanólico foi de 51,6 µg.mL^{-1} e para a fração $CHCl_3$ 21,85 µg.$mL^{-1,}$ conforme apresentado na tabela.

O mesmo pode ser observado por Sousa et al., (2019), na atividade leishmanicida da *Tocoyena hispidula* (Rubiaceae) do extrato etanólico e frações. As frações $CHCl_3$ (IC_{50}=26,25 µg.mL^{-1}) e AcOEt (IC_{50}=29,77 µg.mL^{-1}) mostraram-se mais ativas que a fração MeOH (IC_{50}=247,34 µg mL^{-1}) e o extrato EtOH (IC_{50}=105,19 µg mL^{-1}), demonstrando que o fracionamento concentrou os princípios ativos na fração $CHCl_3$ e que a espécie possui compostos ativos com polaridades diferentes.

Na busca de novos agentes leishmanicidas, Bezerra et al., (2006) também avaliou o efeito de extratos de diversas plantas no crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os extratos que apresentaram maior eficácia em induzir a morte das promastigotas foram de *Julocroton triqueter* (Euphorbiaceae), *Dichorisandra* (Commelinaceae) e *Tephrosia cinérea* (Fabaceae), com IC_{50} 29,540 µg.mL^{-1}, 32,9 µg. mL^{-1} e 43,6 µg. $mL^{-1,}$ respectivamente. Ao observar os valores obtidos nesse estudo, a fração $CHCl_3$ para *L infantum* apresentou melhor atividade mais efetiva do que os extratos testados por Bezerra et al., (2006), enquanto a fração $CHCl_3$ para *L amazonensis* apresentou atividade menos efetiva.

A inibição no crescimento de formas promastigotas apresentadas pelo extrato etanólico de *E. bulbosa*, pode ser atribuída a mistura de possíveis compostos identificados através do teste para classe de substâncias. Muitos compostos das classes dos alcaloides, terpenos, flavonoides são descritos na literatura como eficientes agentes leishmanicidas (ARRUDA et al., 2009; SEN; CHATTERJEE, 2011).

Como observado nos resultados da presente pesquisa, a fração $CHCl_3$ que se apresentou efetiva para ambas as espécies de *Leshmania*, pode estar relacionado a presença de quinonas nesta fração. Ressaltando que Alves et al., (2003) isolou da fração diclorometano da *E bulbosa*, as quinonas eleutherine, eleutherol e isoeletherine, sendo estas moléculas provenientes de uma fração organoclorada,

A literatura relata que as quinonas apresentam atividade leishmanicida, como é caso do lapchol (SILVA et al, 2003) e da bis-2-hidróxi-1,4-naftoquinona (ALVES et al, 2014).

A avaliação *in vitro* de quinonas isoladas da *Auxemma oncocalyx* Taub. foram avaliadas em relação a promastigotas de *L. brasiliensis*, demonstrando 81-94%. No entanto, no teste *in vivo* não demostrou ser efetiva contra a progressão da infecção. Provavelmente por serem altamente oxi-redutoras, as quinonas podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio, na cascata oxidativa e as promastigotas podem apresentar um efeito letal *in vitro*, quando em contato com H_20_2 (VIANA et al, 2015).

Sousa et al., (2021) realizaram avaliação de duas quinonas semisintéticas, em sigilo de patente, e estes compostos demostraram com potencial no teste *in* vitro, para promastigotas da *L. major*, com IC_{50} de 0,44 e 0,03 $\mu g.mL^{-1}$, com ação dose dependente. Os autores relatam, que esses resultados são promissores, porém há necessidade de avaliação citotóxica, bem como do mecanismo de ação.

5.3 Citotoxicidade

Diante dos resultados apresentados, fez-se necessário uma análise citotóxica do extrato etanólico e fração $CHCl_3$ frente ao macrófago, a fim de verificar algum possível efeito tóxico frente as células saudáveis.

Os resultados da atividade antipromastigota (IC_{50}), frente a *L. amazonensis* e *L. infantum* e citotoxicidade (CC_{50}) frente a células J774, com extrato etanólico e fração $CHCl_3$ dos bulbos da *E. bulbosa* estão descritos na tabela 04.

Segundo Braga et al., (2007), a *L. amazonensis* está associada com todas as formas clínicas de leishmaniose e *L. infantum* é geralmente presente na forma visceral da doença, com isso é esperado uma sensibilidade diferente desses parasitas em relação as amostras testadas. De um ponto de vista geral, foi observado que as amostras testadas foram mais eficazes contra as formas promastigotas de *L. infantum* quando comparada com as formas promastigotas de *L. amazonensis.*

Tabela 5: Atividade leishmanicida *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* *L. infantum* e análise de índice de seletividade frente à célula J774.

	IC_{50} (µg. mL^{-1}) (média ±DP)		CC_{50} (µg. mL^{-1}) (média±DP)	IS	
	L. amazonensis	***L. infantum***	**J774**	**IS $^{L.a.}$**	**IS $^{l..i.}$**
Extrato EtOH	>200 ^{d}	51,6 ± 0,71 ^{c}	18,9 ± 1,06	NR	0,36
Fração $CHCl_3$	50,1 ± 0 ^{c}	21,8 ± 3,32 ^{b}	31,3 ± 3,75	0,62	1,44
Pentamidina	1 ± 0 ^{a}	1,32 ± 0,22 ^{a}	6,62 ± 3,75	6,62	5,01

IC_{50}= Inibição de crescimento de 50% das promastigotas, ±DP= resultados correspondem à média de três experimentos para cada amostra e desvio padrão, IS=Índice de seletividade: resultados foram expressos calculando-se a razão entre o valor da concentração citotóxica para a célula (CC_{50}) e o valor de inibição de crescimento 50% dos parasitos (IC_{50}). NR=não realizado. *Valores seguidos por letras diferentes dentro de uma coluna são significativamente diferentes em $p < 0,05$. Fração acetona e EtOaC não apresentaram inibição no crescimento de formas promastigotas.

Os resultados obtidos neste trabalho correspondem ao recomendado para extratos promissores, sugerido por Cos et al., (2006), que utiliza como critério para associar relevante e seletiva a atividade de extratos brutos de plantas, valores de IC_{50} abaixo de 100 µg.mL^{-1}. A fração $CHCl_3$ para *L amazonensis* apresentou IC_{50} de 50,1 µg.mL^{-1}, que é duas vezes menor do que o recomendado pelos autores e para *L infantum* apresentou IC_{50} de 21,8 µg.mL^{-1} quatro vezes menor.

Amaral et al., (2006), sugeriram uma classificação da ação de extratos vegetais sobre parasitos flagelados, com base em valores de IC_{50}, sendo: altamente ativo ($IC_{50} \leq 100$ µg.mL^{-1}), ativo ($100 < IC_{50} \leq 250$ µg.mL^{-1}), moderadamente ativo ($250 < IC_{50} \leq 500$ µg.mL^{-1}) e inativo ($IC_{50} \geq 500$ µg.mL^{-1}). De acordo com essa classificação a fração $CHCl_3$ foi altamente ativa tanto para *L amazonensis* (50,1 µg.mL^{-1}) quanto para *L infantum* (21,85 µg.mL^{-1}), pois apresentaram valores menores que 100 µg.mL^{-1}. Para *L infantum* o extrato etanólico (51,6 µg.mL^{-1}) também pode ser considerado altamente ativo.

Garcia et al., (2012), testaram 48 extratos de 46 plantas cubanas de diversas famílias para validar a propriedade antiprotozoária. 20 extratos apresentaram $IC_{50} \leq 100$ µg.mL^{-1}, dos quais apenas 4 extratos (*Bambusa vulgaris* , *Hura crepitans* , *Mangifera indica* e *Simarouba glauca)* exibiram atividade seletiva contra o parasita e foram avaliados contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Destes, três apresentaram inibição do crescimento com valor de $IC_{50} \leq 50$ µg.mL^{-1}, que foram *B. vulgaris*, *S. glauca* e *H.*

crepitans com valores 41,5 µg.mL^{-1}, 45,5 µg.mL^{-1}, e 27,7 µg.mL^{-1}, respectivamente. Dentre as espécies avaliadas, *H. crepitans* causou maior inibição de formas promastigotas (IC_{50} = 16,4 µg.mL^{-1}) e menor toxicidade contra a célula hospedeira (CC_{50} = 390,5 µg.mL^{-1}) e IS (índice de seletividade) = 24. *H. crepitans* é uma planta nativa da América tropical e é utilizada para tratamentos de amebíase e contra outros protozoários como o *Plasmodium falciparum*. De modo geral, os extratos preparados de *H. crepitans*, *B. vulgaris* e *S. glauca* apresentaram atividade leishmanicida promissora contra os dois estágios do parasita, tanto a forma promastigota quanto à forma amastigota. Com isso, os autores sugeriram identificar e purificar os compostos ativos dessas plantas.

A partir dos valores de citotoxicidade (CC_{50}) e inibição de crescimento (IC_{50}) de formas promastigotas foi possível calcular o índice de seletividade (IS). Conhecer o IS é fundamental para garantir que, de fato, a inibição de um extrato é sobre o vírus e não decorrente de uma toxicidade sobre as células (Cos et al., 2006).

Mahmoudvant et al., (2014), consideram seguro um medicamento ou composto natural seguro quando o índice de seletividade é maior que 10. O fármaco de referência utilizado como controle positivo, a pentamidina, apresentou índice de seletividade de 6,62 e 5,01 para *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente, confirmando a necessidade de estudos de compostos promissores. Os resultados obtidos indicam que o extrato etanólico e fração $CHCl_3$ apresentam baixo índice de seletividade, porém as amostras são biologicamente ativas contra as espécies de *Leishmania* testadas. São possíveis fontes de protótipos leishmanicida, podendo ser utilizadas em estudos posteriores para isolamento, identificação e confirmação das atividades avaliadas e se necessário, alteração nas estruturas químicas para melhor ação biológica e reduzir a citotoxicidade.

De acordo com o Teste de Tuckey realizado, comparando os resultados de atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* e *L. infantum*, pode-se observar que *L infantum* apresentou valores mais significativos tanto para o extrato EtOH quanto para fração $CHCl_3$, quando comparados aos valores de *L. amazonensis*, apresentando também melhor índice de seletividade.

6. CONCLUSÃO

A *E. bulbosa* apresenta uma fonte promissora de substâncias que possuem atividades biológicas importantes. Em relação aos constituintes químicos, foi identificado a presença de terpenos, flavonoides, alcaloides e quinonas.

Os dados obtidos experimentalmente favorecem o aprofundamento dos estudos utilizando o extrato EtOH e a fração $CHCl_3$ pois apresentam valores abaixo do que o recomendado podendo fornecer uma fonte potencial de compostos ativos.

O extrato etanólico foi ativo somente para a espécie de *L. infantum* (IC_{50} de 51,6 µg/mL). Das 03 frações testadas somente a $CHCl_3$ foi ativa para as duas espécies, apresentando valores de IC_{50} de 50,1 para *L. amazonensis* e de 21,85 ug/mL para *L. infantum.*

Os resultados obtidos indicam que o extrato etanólico e fração $CHCl_3$ apresentam baixo índice de seletividade, porém as amostras são biologicamente ativas contra as espécies de *Leishmania* testadas.

A *E. bulbosa* pode ser uma fonte promissora de moléculas ativas, especialmente compostos provenientes da fração $CHCl_3$. Para tal, estudos futuros são necessários quanto ao isolamento, identificação de compostos, possíveis modificações estruturais e realização de experimentos que possam confirmar a atividade leishmanicida e citotóxica das moléculas isoladas e seus derivados, ressaltando que uma molécula de escolha precisa apresentar uma boa atividade e baixa citotoxicidade.

7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.E.L. **Infecção de macrófagos originados de monócitos primários humanos com o parasito *L. amazonensis* em microambientes normóxico e hipóxico.** [Mestrado] Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2006.

ALMEIDA, O.L.S.; SANTOS, A.J.B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86 n. 3, p. 497-506, 2011.

ALMEIDA, E.F.; LIMA. T.R.N.; CASSIANO, T.T.M.; APOLINÁRIO, N.M.; MONTENEGRO, C.A.; LIMA, M.A.; FECHINE. I.M. Atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto (eeb) do caule de Calotropis procera (Apocynaceae). **Journal of Biology e Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14, n. 1 p. 43-52, 2018.

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D.A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **Neglected Tropical Diseases**, v. 10. n. 3, p. 1-40, 2016.

ALVES, T.M.A.; KLOOS, H.; ZANI, C.L. Eleutherinone, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz,** 2003, vol.98, n.5, p.709-712. 2006.

AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; REIS, A.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; MACEDO, R.O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 696-720, 2006.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of Austroplenckia populnea. **Journal of Ethnopharmacoly**, v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ANDRAE-MAROBELA K.; GHISLAIN, F.W.; OKATCH. H.; MAJINDA, R.R.T. Polyphenols: a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 392-413, 2012.

ARAÚJO, M.V.; SOUZA, P.S.O.; QUIROZ, A.C.; MATTA, C.B.B.; LEITE, A.B.; SILVA, A.E.; FRANÇA, J.A.A.; SILVA, T.M. S.; CÂMARA, C.A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. Synthesis, Leishmanicidal Activity and Theoretical Evaluations of a Series of Substituted bis-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones. **Molecules**, v. 19, p. 15180-15195, 2014.

ARRUDA, D.C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U.; KATZIN, A.M.; ULIANA, S.R.B. Inhibitory activity of limonene against Leishmania parasites in vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v. 63 p. 643-649, 2009.

BALAÑA-FOUCE, R; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. Review: The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v.30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia,** v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BEER, M.F; FRANK, F.M.; ELSO. O.G.; BIVONA, A.E.; CERNY. N.; GIBERTI, G.; MALCHIODI, E.L.; MARTINO, V.S.; ALONSO, M.R.; SULSEN, V.P.; CAZORLA, S.I. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from Stevia satureiifolia var. satureiifolia. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 10, p. 1-8, 2016.

BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases,** v.16, p. 397-401, 2003.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBÊLO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16:631 - 637, 2006.

BEZERRA, R.J.S.; LEON, L.; GENESTRA, M.. Recentes Avanços da Quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical,** v.40, n.2, 2004.

BÉZIVIN, C.; TOMASI, S.; DÉVÉHAT, F.L.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, p. 499–503, 2003.

BLANCO, V.R.; NASCIMENTO Jr., N.M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. Revista Virtual Química, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, . v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZIOLO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006.

CALVO-CALLE, J.; MORENO, A.; ELING, W.; NARDIN, E. In vitro development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. **Experimental Parasitology,** v. 79, n. 3, p. 362-373, 1994.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 674-688, 2001.

COLARES, A.V.; ALMEIDA-SOUZA, F.; TANIWAKI, N.N.; SOUZA, C.S.; COSTA, J.G.; CALABRESE, K.S.; ABREU-SILVA, A.L. In vitro antileishmanial activity of essential oil of Vanillosmopsis arborea (Asteraceae) baker. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine,** p. 1-7, 2013.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.; MAESA, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology,** v.106, p. 290-302, 2006.

COUTO, C.L.L.; MORAES, D.F.C.; CARTÁGENES, M.S.S.; AMARAL, F.M.M.; GERRA, R.N. Eleutherine bulbous (Mill.) Urb. A review study. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 21, p. 286–297, 2016.

CRONQUIST, A. On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, v. 1, p.179, 1977.

DASSOLER, M.; SCHWANZ, M.; BUSSETO, F.; MOREIRA, E. A.; GUTIERREZ, L. Perfil Fitoquímico e Ensaio Farmacológico de *Averrhoa carambola L.* (Oxalidaceae). **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.2, p. 4-8, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics of Dermatology,** v.14, n. 5, p, 417-423, 1996.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley e Sons Ltd, 2. ed, p.168-212, 2002.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DINIZ, A.C.B.; ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E.R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de Hypericum perforatum L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta botanica brasilic**, v. 21, n.2, p. 443-450, 2007.

Di STASI, L.C. Plantas Medicinais: arte e ciências – **Um guia de estudo interdisciplinar**, p. 230, 1996.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.3, p. 241-249, 2007.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V.F. β-Lapachona: Sua importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p.140-160. 2010.

GALLO, F.R.; PALAZZINO, G.; FEDERICI, E.; IURILLI. R.; GALEFFI, C.; CHIFUNDERA, K.; NICOLETTI, M. Polyketides from *Eleutherine bulbosa*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 16, p. 1578-1586, 2010.

GARCIA, M.; MONZOTE, L.; SCULL, R.; HERRERA, P. Activity of Cuban Plants Extracts against Leishmania amazonensis. **Pharmaceutical Biology**, v.2012, p. 1-7, 2012.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DEN BERG, CASSIO. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GONÇALVES, H.P.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, D.M.F.; SILVA, A.G.C.; BALLICO, L.J.; LIMA, D.K.S.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. The leishmanicidal activity of a cyclopentenedione derivative isolated from the roots of a native Amazonian pepper (Piper carniconnectivum). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 10118-1023, 2012.

GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I.; Introduction to Plant Biochemistry, **Pergamon Press:** New York, 1972.

GOLDBLATT, P.; Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 74, p. 333-340, 1987.

GOLDBLATT, P.; MANNING, J.C. Radiation of Pollination Systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. **Annals of Botany**, v. 97, p. 317-344, 2006.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews,** v.14, n. 2, p. 229-243, 2001.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.25, p. 363 - 370, 2000.

INSANU, M.; KUSMARDIYANI, S.; HARTAFI, R. Recent Studies on Phytochemicals and Pharmacological Effects of *Eleutherine americana* Merr. Procedia Chemistry, v.13, p. 221-228, 2014.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal Plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitology Today,** v.10, p. 65-68, 1994.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANA, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASH, M.; KOMIYAMA, K.; Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p.1332-336, 1997.

LACERDA, R.B.M.; FEITAS, R.T.; MARTINS, M.M.; TEIXEIRA, T.L.; SILVA, C.V.; CANDIDO, P.A.; OLIVEIRA, R.J.; VIEGAS Jr. C.; BOLZANI, V.S.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M. Isolation, leishmanicidal evaluation and molecular docking simulations of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis*. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 22, p. 5816-5823, 2018.

LACERDA, R.B.M. **Estudo Químico Dos Alcaloides Piperidínicos Presentes Em *Senna Spectabilis* (Fabaceae) E Avaliação Da Atividade Leishmanicida.** Dissertação. Programa de pós graduação em Química. Universidade Federal de Uberlândia Uberlândia, 2017.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniases in Biology and Medicine. **Biology and Epidemiology**, academic press Inc. London, v.1, n. 1 - 120, 1987.

LESTARI, D.; KARTIKA, R.; MARLIANA, E. Antioxidant and anticancer activity of Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb on leukemia cells L1210. **Journal of Physics: Conference**, p. 1-7, Ser. 1277 012022, 2019.

LEVIN, D. The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. **Annual Review of Ecology and System**, v. 7, p. 121, 1976.

LIMA, G.S.; CASTRO-PINTO, D.B.; MACHADO, G.C.; MACIEL, M.A.M.; ECHEVARRIA, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**, v. 22, p. 1133-1137, 2015.

LIMA, N.M.F.; CORREIA, C.S.; LEON, L.L.; MACHADO, G.M.C.; MADEIRA, M.F.; SANTANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Antileishmanial activity of lapachol analogues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 757-761, 2004.

LIN, T.S.; ANTONINI, I.; COSBY, L.A.; SARTORELLI, A.C. 2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone Derivatives as Bioreductive Alkylating Agents with Cross-Linking Potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 813-815, 1984.

LOPES, B.E.R.; BARBIERI, M.G.M.; CAMPOS, W.A. Análise comparativa entre o uso de plantas medicinais e medicamentos industrializados em Rolim de Moura do Guaporé-RO. **Biodiversidade**, v. 20, n. 1, p. 130, 2021.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 512p. 2002.

LUNA, E.J.A.; SILVA Jr., JB. Doenças transmissíveis, endemias, epidemias e pandemias. In FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. A saúde no Brasil em 2030 - prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro: população e perfil sanitário [online]. Rio de Janeiro: Fiocruz/Ipea/Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2013. Vol. 2. pp. 123-176.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu Potencial Terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia de Reprodução**, v. 26, p. 37-44, 2008.

MADUREIRA, M.; MARTINS, A.P.; GOMES, M.; PAIVA, J.; PROENÇA, C.A.; ROSÁRIO, V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditionalmedicine in S Tomé and Príncipe islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 23-29, 2002.

MAHLER, R.H.; LORDES, H.E. Biological Chemistry. **Herper International Edition**: 2ª Edição, London, 1971.

MAHMOUDVAND, H.; AYATOLLAHI-MOUSAVI, S.A.; SEPAHVAND, A.; SHARIFIFAR, F.; EZATPOUR, B.; GOROHI, F.; SAEDI DEZAKI, E.; JAHANBAKHH, S. Antifungal, antileishmanial, and cytotoxicity activities of various extracts of Berberis vulgaris (Berberidaceae) and its active principle berberine. **Pharmacology**. P. 1-7, 2014.

MANJOLIN, L.C.; REIS, M.B.G.; MAQUIAVELI, C.C. SANTOS-FILHO, O.A.; SILVA, E.R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Food Chemistry,** v. 141, n. 3, p. 2253–2262, 2013.

MANN, J.; Chemical of Biosynthesis, **Oxford University Press**, 1994.

MARDEROSIAN, A.D.; BEUTLER, J.A. *The Review of Natural Products*, 2nd ed.; **Facts and Comparisons**, p. 13-43. 2002.

MARTÃO, V.M. **Atividade antioxidante in vitro de plantas medicinais da Amazônia Ocidental. Dissertação**. Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Porto Velho, 2013.

MELO, G.M.A.; SILVA, M.C.R.; GUIMARÃES, T.P.; PINHEIRO, K.M.; MATTA, C.B.B.; QUEIROZ, A.C.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V.S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; VIEGAS Jr., C. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of Senna spectabilis. **Phytomedicine,** v.21, n.3, 96 p. 277-281, 2014.

MERCK, E.; Reactivos de Coloración para Cromatografia em capa fina y em papel. **Darmstadt,** Alemanha. 1972.

MONTELES, R.; PINHEIRO, C.U.B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n.2, p. 38-48, 2007.

MOREIRA, R.C.R.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; BEZERRA, J.L.; GUERRA, R.N.M.; REBÊLO, J.M.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; COSTA, J.M.L. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.59-63, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MOURA, T.R.; NOVAIS, F.O.; OLIVEIRA, F.; CLARÊNCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C.I. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity,** v.73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

MSF- Médicos Sem Fronteiras. Lishmaniose. 2018. Disponível em: https://www.msf.org.br/oquefazemos/atividadesmedicas/leishmaniose?utm_source=adwords_msf&utm_medium=&utm_campaign=doencas_geral_comunicacao&utm_content=_exclusaosaude_brasil_39923&gclid=CjwKCAjwgZuDBhBTEiwAXNofREyCh3eY3Hk8GZVcRPTcuOU_G2UtrP74ryQQDABjGMI2UHGlucWAhoC8LUQAvD_BwE. Acesso em: 02 Abr 2021.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose viceral. 2020. Disponíel em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/l/leishmaniose-visceral. Acesso em: 17 Abr 2021.

MS. Manual de vigilância da leishmaniose. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2017

MS. Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2014.

NASCIMENTO, J.R. **Correlação entre potencial eletroquímico e atividade leishmanicida de compostos raros isolados de Fridericia platyphylla (Cham). L. G. Lohmann.** [Dissertação] Programa de pós-graduação em química. Universidade Federal do Maranhão. Maranhão. 2019.

NEVADO, P.T. **A Cluster of Antimony Resistance Genes on Chromosome 34 of *Leishmania infantum* and Their Properties**. Dissertation with the aim of achieving a doctoral degree at the Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, Department of Biology of Universitat Hamburg, 2016.

NOVARYATIIN, S.; ARDHANY, S.D. The Antibacterial Activity Of Bawang Dayak (Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb.) From Central Kalimantan Against Acne-Causing Bacteria**.** **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 11, p. 22-25. 2019.

OGETO, T.K.; ODHIAMBO, R.A.; SHIVAIRO, R.S.; MULEKE, C.I.; OSERO, B.O.; ANJILI, C.; INGONGA, J.M.; OSUGA, I M. Antileishmanial activity of Aloe secundiflora plant extracts against Leishmania major **Advances in Life Science and Technology**, v. 13, p. 9-18. 2013.

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

ORYAN, A.; MEHRABANI, D.; OWJI, S.M.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G. Morphologic changes due to cutaneous leishmaniosis in BALB/c mice experimentally infected with Leishmaniamajor. **Journal of Applied Animal Research**, v. 32, p.87-92. 2008.

ÖZIPEK, J.; Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1168-1173, 2005.

PATOčKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine Signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v.1, p.7-12, 2003.

PINO-RODRIGUEZ, S.; PRIETO-GONZÁLEZ, S.; PÉREZ-RODRIGUEZ, M. E.; MOLINA-TORRES, J. Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios com Actividad Biológica. **Acta Farmaceutica Bonaerense,** v. 23, p. 252-258, 2004.

POZZO, L. de Y.; **Desenvolvimento de metodologia de medida vetorial das forças em tempo real de microorganismos utilizando pinças ópticas para estudo de quimiotaxia e osmotaxia de parasita.** [Mestrado] Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2006.

PRATA, P.S.; MOGOLLÓN, N.G.S.; AUGUSTO, F. Multidimensional Chromatographic Techniques on the Investigation of Secondary Metabolites. **Scientia Chromatografica**, v. 8, n. 4, p. 209-229, 2016.

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; CAVE, A.; PAULO, M.D.; FOURNET, A; Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products,** v. 59, p. 438-440, 1996.

RIBEIRO, C.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Infarma- Ciências Farmacêuticas**, v. 21, n. 1/2. 2009.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Farmacognosia e Farmacobiotecnologia. São Paulo: Editorial Premier, 372p, 1997.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Parasitol Res**, v. 99, n. 1, p. 103–107, 2006.

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SANDJO, L.P.; MORAES, M.H.; KUETE, V.; KAMDOUM, B.C.; NGADJUI, B.T.; STEINDEL, M. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1772-1775, 2016.

SANTANA, R.C.; SANTOS, A.; MATHEUS, R.M.H.; SOARES, D.C.; ATALLA, G.; GUIMARÃES, A.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; SARAIVA, E.M.; PINTO-DA-SILVA, L.H.P. *In vitro* leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of *Protium* (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis.* **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259,n. 15, 2020.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SCORZA, B.M.; CARVALHO, E.M.; WILSON, M.E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. International Journal of Molecular Sciences., v. 18, p. 1296-1322, 2017.

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

SHAW, J. Taxonomy of the genus *Leishmania:* P0072esent and Future Trends and their Implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.10. p. 471-478, 1994.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different Trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneos and mucocutaneous leishmaniosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 323-335, 1975.

SHI, T.; DU, W.; WANG.; TENG, X.; CHEN, X.; YE, L. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. **Food Science Nutrition**, v. 7, p.148-154, 2019.

SiBBr – SISTEMA DE INFORMAÇÃO DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Disponível em: https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/search?q=eleutherine+bulbosa Acesso em: 12 Abr 2021.

SILVA, C.G.; SILVA, R.M.M.; DINIZ, V.A.; CÔRTE-REAL, S. Ultraestrutura de Parasitos do Gênero Leishmania. *In:* CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. Leishmanioses do continente americano. SciELO – Ed. FIOCRUZ, 2014. Disponível em: https://www.jstor.org/stable/10.7476/9788575415689.6. Acesso em 10 Abr 2020.

SILVA, J.A. **Obtenção e caracterização do extrato seco por aspersão de Eleutherine plicata** Herb. Belém, Dissertação (Mestrado) UFPA. 2013

SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 60, n. 3, p. 201-210, 1995.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia da naftoquinonas, com ênfase na β-Lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 2002.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SOUSA, E.A.; ROSA, A.P.; SANTOS, R.R.; SANTOS, I.L.; SOUSA, V.C.; CARVALHO, F.A.A.; VIEIRA Jr., G.M.; CHAVES, M.H. Composição Química e Atividade Antileishmania De *Tocoyena hispidula.* **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 192-196, 2019.

SOUSA, V.C.; SANTOS, I.L.; SANTOS, R.R.L.; CARNEIRO, S.M.P.; CARVALHO, F.A.A.; GONÇALVES, A.A.; GUIMARÃES, D.G.; ARAÚJO, C.R.M.; COSTA, M.P. Avaliação da atividade antileishmania in vitro de novos derivados quinónicos semi-sintéticos sobre formas promastigotas de *Leishmania major*. Disponível em: https://docplayer.com.br/115068569-Avaliacao-da-atividade-antileishmania-in-vitro-de-novos-derivados-quinonicos-semi-sinteticos-sobre-formas-promastigotas-de-leishmania-major.html. Acesso em: 14 Mai 2021.

SOUZA, D.C.M.; SOUSA, V.C.; CRUZ, L.P.L.; CARNEIRO, S.M.P.; ALVES, M.M.M.; CARVALHO, F.A.A.; COSTA, M.P.; CORRÊA, C.M.; GONSALVES, A.A. ARAÚJO, C.R.M. Síntese, atividade antileshmania ecitotóxica de hidrozonas derivadas de aldeídos naturais. **Química Nova**, v. 43, n.1, p. 50-57, 2020.

STAUBER, L.A.; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An Eight-day Method for Screening Compounds against Leishmania donovani in the Golden Hamster. **The Journal of Protozoology**, v. 5, n. 4, p. 269-273, 1958.

STEBUT, E.V.; Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**. p. 191-201. 2015.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites e Vector**, v. 10, n. 1, p. 82-92, 2017.

STROBEL, G.A.; LONG, D.M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**, v 64, p. 263-268. 1998.

SWAIN, T.; Chemistry in Evolution and Systematics, **Butterworth**, Londres, 1973.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, n. 1, p. 176-184, 2005.

THEODOS, C.M.; TITUS R.G. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory affect on macrophage function *in vitro*. **Parasite Immunology**, v.151, p. 4891-4901, 1993.

THOMSON, R.H.; Naturally occuring quinones. 2ed. **London: Academic**, 1971.

Van Den BERG, M. E.; Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2ed. **Museu Paraense Emílio Goeldi**, 1987.

VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz. 2013. Disponível em: https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas. Acesso em: 20 Abr 2021.

VIANA, S.M.; FERREIRA, M.A.D.; GUERRA, P.V.; VIANA, G.S.B.; TEIXEIRA, M.J. In vitro and in vivo evaluation of quinones from Auxemma oncocalyx Taub. on Leishmania braziliensis. **Journal Medicinal Journal Research**, v. 9, n. 5, p. 132-139, 2015.

WHO. http://www.who.int/leishmaniasis/en/. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. Acesso em: 12 Mar 2020.

WHO. **Control of the leishmaniases:Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, Geneva, 22–26, 2010.

ZAPPI, D.C.; FILARDI, F.L.R.; LEITMAN, P.; SOUZA, V.C.; WALTER, B.M.T.; PIRANI, J.R.; MORIN, M.P.; QUEIROZ, L.P.; CAVALCANTI, T.B.; MANSANO, V.F.; FORZZA, R.C. Growing Knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113. 2015.