UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AMANDA MARIA OLIVEIRA E SÁ

Estudo da ação do extrato da planta *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Gervão roxo) e compostos naturais sobre a enzima arginase de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

AMANDA MARIA OLIVEIRA E SÁ

Estudo da ação do extrato da planta *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Gervão roxo) e compostos naturais sobre a enzima arginase de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Edson Roberto da Silva

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S111e Sá, Amanda Maria Oliveira e
Estudo da ação do extrato da planta
Stachytarpheta cayennensis (Rich.) Vahl. (Gervão
roxo) e compostos naturais sobre a enzima arginase
de *Leishmania* / Amanda Maria Oliveira e Sá ;
orientador Dr. Edson Roberto da Silva. --
Pirassununga, 2016.
52 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. *Leishmania*. 2. arginase. 3. *Stachytarpheta*
cayennensis. 4. Verbascosídeo kusaginín. I. Silva,
Dr. Edson Roberto da , orient. II. Título.

AMANDA MARIA OLIVEIRA E SÁ

**Estudo da ação do extrato da planta *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.)
Vahl.(Gervão roxo) e compostos naturais sobre a enzima arginase de *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência
Animal

Data de aprovação 30 de Junho de 2016.

Banca Examinadora:

Prof^o Dr. Edson Roberto da Silva
FZEA-USP

Prof^a Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira
FZEA-USP

Prof^o Dr. Ed Hoffmann Madureira
FMVZ-USP

Dedico este trabalho aos meus pais **Raimundo e Maria Ancelma**, pelo incansável apoio, por serem minha estrutura, pela confiança que depositaram em mim ao longo dessa jornada, e por lutarem contra todas as dificuldades para eu poder chegar até aqui.

Dedico-o, também, ao meu esposo Reinaldo, por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil, quantas noites mal dormidas, quantos obstáculos vencidos e, se hoje comemoro essa conquista se deve em primeiro lugar a Deus, pois todas as vezes que me peguei pensando negativamente que não conseguiria, entreguei nas mãos Dele, e fui conduzida ao sucesso. Valeu apenas todos os sacrifícios.

Aos meus pais **Raimundo** e **Maria Ancelma**, que se dedicaram sem medir esforços e estiveram sempre apoiando todas as minhas decisões e souberam conviver com a distância e as visitas corridas durante minha trajetória. Meu Papai, que sempre orgulhei-me de ser sua filha, obrigada por cuidar de mim apesar de tantas preocupações. A minha querida Mamãe, que foi a grande responsável por eu estar conquistando essa importante etapa de minha vida, se não fosse suas escolhas, seus sacrifícios dia e noite, sua força para enfrentar tudo sozinha, jamais conseguiria. Sou eternamente grata a vocês, obrigada por serem meus pais. Amo-os de todo meu coração!

Aos meus irmãos, que são minha estrutura. Obrigada pelo apoio de cada um, **Alvino** que sempre esteve comigo por pensamentos. A minha irmã **Amani** que me ajudou em todos os momentos difíceis que passei. Ao meu mano **Geremias** que mesmo crescendo um pouco distante, sei que torce muito pelo meu sucesso e felicidade, obrigada pelo apoio.

Ao meu querido esposo, **Reinaldo**, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Ao **MSc. Ebenézer de Mello Cruz**, pela orientação da Iniciação Científica, o qual foi essencial para entrada no Mestrado, sem seu impulso jamais conseguiria realizar esse sonho.

Ao meu orientador **Dr. Edson Roberto da Silva**, que serei eternamente grata por tanta ajuda, preocupação, empenho para que eu pudesse chegar aqui. Que mesmo sem ter nenhum tipo de relação pessoal nem profissional, vindo do interior do Maranhão, aceitou e acreditou em mim para o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi e cresci muito com seus conhecimentos, que Deus lhe abençoe infinitamente. Obrigada por tudo!

A **Dr^a. Claudia do Carmo Maquiaveli**, obrigada por tanta ajuda que recebi, pelos conselhos, pelas explicações, meu muito obrigada.

A minha amiga **Lindsay**, enviada por Deus para me ajudar na caminhada do Mestrado, longe de minha família. Obrigada pelas conversas, conselhos, risos, dicas de maquiagem, pela

companhia diária no laboratório, tornando assim mais fácil os trabalhos. Foi e será sempre como uma irmã que ganhei!

Agradeço também de todo coração a Assistente Social do campus FZEA **Tânia**, que me acolheu e me ajudou com auxílio moradia e alimentação, tornando minha caminhada mais leve, muito obrigada!

As minhas companheiras de quarto, **Vanessa Piotto** e **Rosa Dulce**. Obrigada por fazerem dos meus dias mais brandos em Pirassununga, pelas histórias, sorrisos, tristezas compartilhadas, foram minha segunda família. Sempre as guardarei em um lugar especial em minha vida.

Aos parceiros de laboratórios **João Lucon**, **Arina**, **Matheus**, obrigada por todos os momentos compartilhados. E a todos que direto ou indiretamente contribuíram pelo meu sucesso. O meu muito Obrigada!

*“Porque o Senhor é bom, e eterna a sua misericórdia; e
a sua verdade dura de geração em geração.”*
(Salmos 100:5)

*“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções.
E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver
deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios
do campo e as aves do céu.”*
(Érico Veríssimo)

*“Como em um espelho d’água uma imagem clara não
dava para ver, os conhecimentos foram chegando e, sem
perceber foram boa parte absorvidos. Hoje a imagem é
límpida e agora consigo enxergar o mundo que outrora
jamais o vi.”*
(José Reinaldo)

RESUMO

SÁ, A.M.O. **Estudo da ação do extrato da planta *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl. (Gervão roxo) e compostos naturais sobre a enzima arginase de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.** 2016. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

As leishmanioses são antropozoonoses com amplo problema de saúde pública, que acometem aproximadamente 12 milhões de indivíduos em todo o mundo e causam cerca de 60 mil mortes por ano. No Brasil, a leishmaniose tegumentar (LT) apresenta coeficiente médio de detecção de 16 casos por 100 mil habitantes, onde em notificações no estado do Maranhão apresenta um dos maiores índices de incidência. Os fármacos utilizados atualmente apresentam eficácia limitada e algumas vezes significativa toxicidade e efeitos adversos, sendo necessária a busca por novos tratamentos. Um dos meios para obtenção deste propósito é obter extratos vegetais que proporcionem a inativação da enzima arginase presente no parasito e responsável pela produção de poliaminas essenciais a sua sobrevivência. A escolha do material vegetal foi baseada através de práticas medicinais de populações onde a planta *Stachytarpheta cayennensis* é utilizada como analgésica, antiinflamatória e no tratamento de úlceras causadas por *Leishmania*. A planta foi coletada e feita a identificação botânica, e a droga foi utilizada para preparo de dois extratos por decocção e maceração em etanol 50%. Ambos foram fracionados com n-butanol e utilizados em testes de inibição da arginase. A fração butanólica do chá (BUF) foi a que apresentou menor número de constituintes. A análise do BUF por ressonância magnética nuclear indicou a presença de uma mistura de 7:3 de verbascosídeo/isoverbascosídeo. Em seguida foi realizado o teste de inibição enzimática com a mesma fração e com os compostos estruturalmente relacionado com o verbascosídeo: ácido cafeico ($IC_{50} = 1.5 \mu M$), ácido clorogênico ($IC_{50} = 3.4 \mu M$), e ácido rosmarínico ($IC_{50} = 1.5 \mu M$). O teste de inibição na forma promastigota do parasito com a fração (BUF-CHÁ) em 72h de tratamento apresentou EC_{50} de $51 \mu g/mL$. A partir dos resultados encontrados faz-se necessário mais experimentos com a planta, como a realização de ensaios com amastigotas de *Leishmania* e teste de toxicidade celular. Conclusão: *S. cayennensis* pode ser uma promissora fonte de novos fármacos para leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania*. arginase. *Stachytarpheta cayennensis*. Verbascosídeo.kusaginin. Isoverbascosídeo. Ácido rosmarínico. Ácido trans-caféico .Ácido clorogênico.

SÁ, A.M.O. **Plant extract action study *Stachytarpheta cayennensis* (Rich .) Vahl . (*Stachytarpheta cayennensis* purple), natural compounds on the enzyme arginase of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* .** 2016. 55 f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

ABSTRACT

Stachytarpheta cayennensis is a plant traditionally used to treat tegumentary leishmaniasis and as an anti-inflammatory. The aim of this study was to evaluate the mechanisms of action of extracts from *S. cayennensis* on the arginase enzyme of the trypanosome parasite *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *S. cayennensis* was collected in Formosa da Serra do Maranhão, Brazil. Crude water extract was fractionated with n-butanol and fractions were tested against arginase enzymes collected from *L. (L.) amazonensis*. The most potent arginase inhibitor fraction was then tested against *L. (L.) amazonensis* promastigotes in axenic culture. To verify arginase inhibition in *L. (L.) amazonensis*, promastigote cultures were supplemented with L-arginine (substrate) and L-ornithine, a product of hydrolysis of L-arginine by the arginase enzyme. Butanolic fraction (BUF) is a potent *L. (L.) amazonensis* arginase inhibitor ($IC_{50} = 5 \pm 1 \mu\text{g/mL}$). BUF showed an IC_{50} of $51 \mu\text{g/mL}$ against *L. (L.) amazonensis* promastigotas. In addition, caffeic acid and two acids containing caffeoyl moiety were tested against arginase showing IC_{50} 1.5-3.4 μM . The inhibition of arginase by BUF in the promastigote cultures was demonstrated by adding L-ornithine, which enhances parasite growth. In conclusion, verbascoside present in *S. cayennensis* extracts (BUF) target the arginase enzyme of *L. (L.) amazonensis*, resulting in the death of the parasites.

Key words: *Leishmania*. arginase. *Stachytarpheta cayennensis*. Verbascoside. Kusaginin. Isoverbascoside. Rosmarinic acid. Trans-caffeic acid. Chlorogenic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil 1990 a 2013	16
Figura 2- Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Maranhão, 1990 a 2012.....	17
Figura 3- confirmados de Leishmaniose Visceral, Imperatriz, 2001 a 2006.	17
Figura 4 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> sp.....	18
Figura5- Folhas e flores da <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	29
Figura 6- Extração e fracionamento dos extratos produzidos por decocção (CHÁ) e por maceração em EtOH 50%.	31
Figura 7- Cromatografia em camada delgada do extrato de <i>Stachytarpheta cayennensis</i> com revelação NP/PEG visualizada em 254 nm.	36
Figura 8- Cromatograma da fração butanólica (BUF- CHÁ) obtida do extrato aquoso por decocção.	37
Figura 9-Estrutura das moléculas identificadas na <i>S. cayennensis</i> : (1) verbascoside, (2) isoverbascosideo..	38
Figura 10- Curvas log(dose) versus resposta para inibição da arginase de <i>L. amazonensis</i> utilizadas para cálculo de IC ₅₀	39
Figura 11- Determinação do mecanismo de inibição da fração BUF-CHÁ.....	39
Figura 12- Determinação do mecanismo de inibição das moléculas: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico.....	41
Figura 13- Viabilidade celular de <i>L. (L.) amazonensis</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores do tempo de retenção (RT) dos picos do cromatograma de CLAE e fator de retenção (RF) da CCD.....	37
Tabela 2- IC ₅₀ para inibição da arginase de <i>L. amazonensis</i> pelas frações obtidas da <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	38
Tabela 3- IC ₅₀ e K _i para inibição da arginase de <i>L. amazonensis</i> pelas moléculas com estrutura relacionadas ao verbascosídio e isoverbascosídio	40
Tabela 4- Atividade leishmanicida do extrato da <i>S. cayennensis</i> e das moléculas, na cultura de promastigota de <i>L. (L.) amazonensis</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50%

IL – Interleucina

LC - Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPDC – Leishmaniose dérmica pós-calazar

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LV– Leishmaniose visceral

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintetase

Sb^V – Antimoniais pentavalentes

Th – T helper

SMF - Sistema Mononuclear Fagocitário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral.....	14
1.1.2 Objetivos Específicos.....	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Leishmaniose.....	15
2.2 Epidemiologia	15
2.3 Aspectos Biológicos	18
2.4 Formas clínicas.....	20
2.5 Terapia da Leishmaniose	22
2.6 Arginase	24
2.7 Fitoativos.....	26
2.8 <i>Stachytarpheta cayennensis</i>	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material.....	30
3.2 Coleta e preparo da droga vegetal	30
3.3 Preparação do extrato vegetal.....	30
3.4 Cromatografia em camada delgada	31
3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	31
3.6 Teste de inibição enzimática	32
3.7 Mecanismo de Inibição e cálculo das constantes K_i/k_i'	33
3.8 Análise de dados.....	33
3.9 Cultivo de <i>Leishmania</i>	34
3.10 Teste de viabilidade celular.....	34
3.11 Suplementação com L-ornitina e L-arginina.....	34
3.12 Análise estatística	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Caracterização dos constituintes ativos de <i>S. cayennensis</i>	36
4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	36
4.3 Inibição da arginase por frações do extrato <i>S. cayennensis</i>	38
4.4 Análise de compostos estruturalmente relacionado com o verbascosideo	40
4.5 Teste de viabilidade celular.....	41
4.6 Atividade sobre promastigotas em cultura suplementadas com L-ornitina e L-arginina.....	42

5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	47
7 PERSPECTIVA	47
8 REFERÊNCIAS	48
9 ANEXO	52

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical causada por um parasita intracelular do gênero *Leishmania*. É um dos maiores problemas de saúde pública com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e 2 milhões de novos casos por ano Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013).

No período de 1988 a 2009 o Brasil apresentou uma média anual de 27.093 casos registrados de leishmaniose tegumentar (LT) e coeficiente médio de detecção de 16 casos por 100 mil habitantes (Brasil, 2011). O Maranhão apresenta um dos maiores índices de incidência de leishmaniose visceral no período de 2000 a 2013 onde foram notificados 7.510 casos, com 4.342 casos a mais que no estado do Piauí que apresentou 3.168 casos registrados no mesmo período (SINAN, 2016).

Os medicamentos de primeira escolha para tratamento da leishmaniose são antimoniais pentavalentes, sendo o antimoniato de N-metilglucamina o mais utilizado tanto para LTA quanto para LV. Não havendo resposta satisfatória, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (BRASIL, 2010).

Com aumento em larga escala de relatos sobre resistência clínica aos antimoniais, a procura por novos fármacos leishmanicidas tem se expandido intensamente (Vouldoukis et al., 2006). Dessa forma há uma grande necessidade na busca por novas substâncias que proporcionem melhores tratamentos para leishmaniose. Vários estudos desenvolvidos propõem que a informação sobre novos fármacos de interesse farmacêutico podem ser obtidos de forma mais efetiva estudando as práticas medicinais de diferentes povos e culturas (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

A planta *Stachytarpheta cayennensis* tem sido empregada na terapia de úlceras causadas por *Leishmania* e possui atividade leishmanicida comprovada tanto para *L. amazonensis* quanto para *L. braziliensis* (MATHIAS; EMILY, 1993).

Segundo Silva, Maquiaveli e Magalhães (2012), a arginase tem se destacado como um alvo potencial para produção de fármacos leishmanicidas e, o reino vegetal tem sido apontado como uma fonte valiosa para produção de drogas efetivas para substituir ou suplementar aquelas de uso corrente (CALDERON et al., 2009).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar a ação da planta *Stachytarpheta cayennensis* utilizada na medicina popular para tratamento da leishmaniose, sobre a enzima arginase e em cultura de promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Testar extratos e frações da planta em cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- Caracterizar as moléculas inibidoras da arginase presentes nos extratos vegetais de *S. cayennensis*
- Testar a inibição da arginase recombinante de *L. amazonensis* para as frações e moléculas isoladas de *S. cayennensis*.
- Determinar a IC_{50} e mecanismo de inibição enzimática para frações extratos de *S. cayennensis* e por moléculas isoladas
- Determinar a constante de inibição (K_i) e a IC_{50} para cada composto estruturalmente relacionados com os componentes identificados da planta.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por um protozoário do gênero *Leishmania*, que pertence à família Trypanosomatidae, encontradas nas formas promastigotas e amastigota, incluindo mais de 30 espécies, onde cerca de 20 causam doenças em seres humanos (NEVES et al., 2011).

A infecção pode ser do tipo visceral ou tegumentar, dependendo do agente etiológico. A LV é caracterizada como doença crônica, sistêmica com manifestações que se exacerbam em decorrência do desequilíbrio entre a multiplicação de parasitos no sistema mononuclear fagocitário (SMF), a resposta imunológica e o processo inflamatório subjacente. LTA não é contagiosa e acomete pele e mucosas do ser humano ou secundariamente de animais (BRASIL, 2010).

Segundo Neves et al. (2005), a *Leishmania* possui dois hospedeiros em seu ciclo de vida: um invertebrado, que é o hospedeiro intermediário que são pequenos insetos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, e um hospedeiro vertebrado que é o definitivo: grande variedade de mamíferos: roedores, edentados, canídeos e primatas, incluindo o homem.

As leishmanioses são antroponoses vistas como amplo problema de saúde pública e que agrega um conjunto de doenças com importância clínica e diversidade epidemiológica (BRASIL, 2007).

Segundo Neves (2005), dos 88 países onde a doença ocorre, 76 são países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. As modificações socioambientais e os obstáculos de controle em grandes cidades, no qual os dilemas de desnutrição, habitação e saneamento básico estão presentes. A imigração dos habitantes e animais de áreas endêmicas auxiliaram para sua disseminação.

2.2 Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012) a cada ano, quase 2 milhões de novos casos de leishmaniose são registrados no mundo e sua prevalência é de aproximadamente 12 milhões com uma taxa de mortalidade anual de cerca de 60.000 pessoas.

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, com registros demonstrados que 90% ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão (Velho Mundo), Brasil e Peru, na América do Sul. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2010).

No período de 1990 a 2013 (Figura 1), a LV no Brasil teve uma soma total de 74.980 casos registrados, com uma média equivalente 3.124. Verificando em 2000 o maior registro de acometidos no país compreendendo cerca de 4.858 casos (SINAN, 2016).

Figura 1- Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil 1990 a 2013

Fonte: SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN. **Casos confirmados de Leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2013.** Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

No período de 1990 a 2013, a LV no Maranhão teve uma soma total de 10.585 casos registrados, com uma média de 441 casos. Em 2000 foi verificado o maior registro de acometidos no estado compreendendo cerca de 842 casos (Figura 02). Neste mesmo período o municípios maranhenses mais afetados foi Buriticupu, situado na região Amazônica do Maranhão, a 450 km de São Luís, com 6,13% do total de casos de LTA do estado (Sinan, 2016).

Figura 2- Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Maranhão, 1990 a 2012

Fonte: SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN. **Casos confirmados de Leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2013.** Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

Em Imperatriz (MA), a leishmaniose visceral foi notificada pela primeira vez em 1991. A partir de então, casos humanos e caninos da doença têm sido sistematicamente notificados. De 2001 a 2011 foram registrados 75 casos. A incidência de casos humanos aumentou em 2008, atingindo um pico de 14 casos (SINAN, 2016).

Figura 3- confirmados de Leishmaniose Visceral, Imperatriz, 2001 a 2006.

Fonte: SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – SINAN. **Casos confirmados de Leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2013.** Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

2.3 Aspectos Biológicos

Para Neves (2005), os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são inoculadas pelas fêmeas durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente como cangalha, mosquito-palha ou birigui. Dentro de quatro a oito horas, estes flagelados são interiorizados pelas células do sistema fagocítico mononuclear (monócitos, macrófagos, histiócitos, entre outras). Contudo, essas células fagocitárias não conseguem destruir os parasitos que as infectam. Assim, as leishmanias passam da forma promastígota para amastigota e se reproduzem, novamente por divisão binária, no interior dos vacúolos dos macrófagos e provocam a lise da célula e a consequente liberação dos parasitos, iniciando uma reação inflamatória. Os parasitos liberados podem infectar novas células, ampliando a infecção nos hospedeiros suscetíveis, dependendo de suas características genéticas e da resposta imune do organismo. Quando novamente o flebotomíneo realiza hematofagia no animal infectado, adquirem as formas amastigotas nos macrófagos e/ou parasitos livres, onde sofrem diferenciação para promastigotas no intestino do inseto, fechando o ciclo.

Figura 4 Ciclo biológico de *Leishmania* sp.

Fonte: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC.GlobalHealth.Division of Parasitic Disease and Malaria.**Parasites – Leishmaniasis.** 2015. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.>. Acesso em: 02 abr. 2016.

As formas amastigotas possuem formato esférico a ovoide e o tamanho varia de acordo com a espécie, tendo 1,5 a 3 µm de largura e de 2 a 6 µm de comprimento. Possui um núcleo esférico localizado em um dos lados, um cinetoplasto em forma de bastão, geralmente próximo ao núcleo, e um flagelo interno rudimentar. As formas promastigotas são alongadas, com aspecto fusiforme ou piriforme, com um flagelo livre na região anterior. O tamanho é variável, mesmo dentro de uma mesma espécie, e depende do estado da forma promastigota (procíclico ou metacíclico), medindo entre 14 e 20 µm de comprimento por 1,5 a 4 µm de largura. O núcleo esférico geralmente se encontra na região central da célula, mas pode variar de posição. O cinetoplasto afina na região anterior. O corpo flexível movimenta-se tracionado pelo comprido flagelo que emerge da extremidade anterior. A resposta imunológica proveniente da interação de *Leishmania* e hospedeiro pode desencadear a liberação de mediadores e ativação de células da resposta imunitária inata e adaptativa (REY, 2008).

O ciclo de vida da *Leishmania* no animal vertebrado as formas promastigotas metacíclicas inoculadas invadem macrófagos teciduais (que são células de defesa dos mamíferos), na qual irão se diferenciar em formas amastigotas que residem os vacúolos digestivos e se fundem aos lisossomos formando os fagolisossomos, escapando assim da resposta humoral (REY, 2001).

Os macrófagos são células do sistema imune que apresentam papel central na defesa do hospedeiro contra invasores. Uma das suas técnicas é a enzima óxido nítrico sintase induzido (iNOS) que quando ativada catalisa a conversão de arginina em citrulina e o gás difusível óxido nítrico (NO) é liberado que combinado com outras substâncias é altamente reativo matando microrganismos. Outro mecanismo de defesa dos macrófagos é o “burst” oxidativo induzido com a fagocitose, quando a enzima NADPH oxidase é ativada, fazendo com que haja transferência de prótons para moléculas de oxigênio, produzindo diversas substâncias reativas, como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila, que interagem com a membrana dos parasitos (QADOUMI, 2002).

Para sobreviver nos macrófagos, os parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de desviar-se dos mecanismos de defesa, resistindo ao pH ácidos e as enzimas dos lisossomos. As formas metacíclicas são resistentes à lise mediada pelo sistema complemento, principalmente pela presença de moléculas de lipofosfglicanos (LPG) em sua superfície. Com isso, esses patógenos inibem a fusão entre o fagossomo e o endossomo, e resistem às enzimas lisossomais. Outro mecanismo de escape é a capacidade de diminuição da atividade da

enzima iNOS, responsável pela produção de NO, como já mencionado, é fundamental efetor antiproliferativo exercido por macrófagos ativos (BOGDAN;ROLLINGHOFF, 1999).

Com isso, a produção de NO é essencial para hospedeiro ter capacidade de controlar a infecção juntamente com o balanço das respostas imune do tipo Th1 e Th2, que direcionam o metabolismo de L-arginina.

A resposta Th₁ consiste na ativação dos macrófagos através da citocina IL-2 e de contato entre as moléculas, ocasionando a opsonização, tornando-se uma resposta imune celular. O tipo Th₂ inclui resposta imune humoral na qual, não resulta efeito sobre infecção de *Leishmania* nos macrófagos, há liberação de IL-4 e IL-10 que leva a expressão de arginase. O balanço dessas respostas regula o metabolismo de L-arginina durante a infecção, direcionando esse aminoácido para ser utilizado na via metabólica da arginase ou da iNOS (ABBAS et al., 2007).

Estudos sobre a regulação das respostas Th1/Th2 na leishmaniose, mostraram que a infecção por *Leishmania* é facilitada pela resposta Th2, que é a via de expressão da arginase e produção de poliaminas, que ajuda a replicação dos parasitos nos macrófagos, consequentemente diminuindo a quantidade de arginina para síntese de óxido nítrico. A resposta Th1 ativa a iNOS promovendo a morte dos parasitas pelos macrófagos (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

2.4 Formas clínicas

Dentro do gênero *Leishmania* são conhecidas duas principais formas clínicas: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). No Brasil já foram identificadas sete espécies causadoras da LTA, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2007).

Ashford (2000) divide a leishmaniose em cinco grupos principais:

- Leishmanose cutânea: A doença começa com a formação de um nódulo cutâneo pruriginoso o qual evolui para uma úlcera pouco dolorosa, oval ou arredondada, rasa e com os bordos elevados. O tamanho da úlcera é variável desde

alguns milímetros até mais de 10 centímetros. Essa forma da doença usualmente é causada por *Leishmania (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* entre outras;

- Leishmaniose mucocutânea: Do ferimento cutâneo inicial as Leishmanias conseguem dissipar-se pela mucosa da cavidade bucal e das narinas. Em alguns enfermos há desenvolvimento de ulcerações levando deformidade facial, infecção e aprofundamento da mucosa depois de muito tempo da cura. Esse aspecto geralmente esta agregado a *L. (V.) braziliensis*;
- Leishmaniose cutânea difusa: Há ferimentos nodulares ou em placas, alastrando-se por todo corpo, geralmente agregado a deformidades e que reage mal ao tratamento. Normalmente existem grande número de parasitos nas lesões. É causado por *L. (L.) braziliensis*;
- Leishmaniose visceral ou calazar: Forma crônica caracterizada pelo acometimento sistêmico (dos órgãos internos) pela *Leishmania*, Nos casos sintomáticos iniciais, há anemia, esplenomegalia (aumento do baço), hepatomegalia (aumento do fígado), devido os parasitos apresentarem tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear, alojando-se e comprometendo o funcionamento desses órgãos. Essa forma da doença é causada pela *L. (L.) infantum* *L. (L.) donovani*.
- Leishmaniose pos-calazar: é normalmente uma sequela da leishmaniose calazar, pode aparecer em até dois anos após a cura dessa forma da doença, e se manifesta como feridas, e começa com o aparecimento de manchas como sardas na pele.

Os sintomas aparecem subitamente ou gradualmente, conforme a evolução da doença. As primeiras manifestações são febre, tosse seca, diarreia, adenomegalia, sudorese. Sem diagnóstico e tratamento, a pirexia se intensifica, com posterior instalação de desnutrição, edema nos membros inferiores, hemorragia, icterícia e ascite. Se não for diagnosticada e tratada adequadamente pode levar a óbito, que pode ser desencadeada por infecções bacterianas ou sangramentos (BRASIL, 2010).

2.5 Terapia da Leishmaniose

Desde a década de 1950 o tratamento das leishmanioses é realizado a partir dos fármacos de primeira e segunda escolha, porém nenhuma delas apresentou plena eficiência e menor toxicidade a fim de dispensar os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), que contém efeitos colaterais cardiotóxicos e gastrointestinais (RAMOS-E-SILVA; DE MOURA CASTRO, 2002).

No Brasil, ainda hoje, os fármacos de primeira escolha são antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), que são introduzidos na terapêutica da leishmaniose, como o N-metilglucamina, conhecido comercialmente como (Glucantime[®]), e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]), sendo este último não comercializado no Brasil. Não havendo resposta satisfatória, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (BRASIL, 2007).

O antimoniato de N-metilglucamina é destinado ao tratamento de todas as formas de Leishmaniose Tegumentar Americana, no entanto as formas mucosa e mucocutânea requerem máximo cuidado, por exibirem resultados mais demorado e maior probabilidade de reaparecimento. É uma solução injetável comercialmente apresentada em ampolas de 5 mL que contém 1,5 g do antimoniato bruto, correspondendo a 405 mg de (Sb^{5+}). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg (Sb^{5+}) /kg/dia (BRASIL, 2007).

O mecanismo preciso da ação desses compostos ainda não está bem elucidado: a hipótese é que haja a possível conversão do antimonial pentavalente (Sb^{5+}) para a forma trivalente (Sb^3), quando interage com as amastigotas do gênero *Leishmania* dentro macrófago. A ação direta do (Sb^{5+}) sobre o parasito pode afetar a sinalização da célula levando a destruição da mesma, esta por sua vez internaliza por meio de um transportador (Sb^3 AQP1) podendo no meio intracelular se converter a Sb^3 pela enzima antimônio redutase (ACR2) ou tripanotiona redutase (TDR1), interagindo assim com alvos celulares, ou podendo interferir no mecanismo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise na membrana do parasito, inibindo a síntese de ATP e GTP, vitais para o patógeno (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004).

A retenção do antimônio nos tecidos é responsável pelos efeitos tóxicos. Os compostos trivalentes ligam-se mais aos tecidos, em geral células vermelhas. Podendo assim,

ocorrer um ou mais efeitos colaterais, como: dores nas juntas, dores musculares, náusea e vômito, dor de cabeça, febre, anorexia (redução ou perda do apetite), alterações nos testes de função do fígado (elevação das transaminases e fosfatase alcalina), níveis de lipase e amilase (enzimas digestivas), leucopenia (redução dos glóbulos brancos no sangue) edema e insuficiência renal aguda (BRASIL, 2006).

Segundo OMS e Ministério da Saúde do Brasil, o esquema terapêutico preconizado é seguido da seguinte forma:

- Leishmaniose Cutânea: 10 a 20 mg Sb^{+5} /kg/dia. Sugere-se 15 mg de $Sb+5$ /Kg/dia tanto para o adulto quanto para crianças durante 20 dias consecutivos;
- Leishmaniose Difusa: A dose é 20mg/ Sb^{+5} /kg/dia 20 dias consecutivos;
- Leishmaniose Mucosa: 20/mg/ Sb^{+5} /kg/dia 30 dias consecutivos, de preferência em ambiente hospitalar. Se não houver cicatrização completa no período de três meses (12 semanas) do término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez;
- Leishmaniose Visceral: Administração parenteral (intravenosa ou intramuscular) de 20 mg/Kg/dia de antimônio pentavalente ($Sb+5$) durante 20 dias consecutivos.

O desoxicolato de Anfotericina B é a droga de segunda escolha, utilizada quando não há respostas Ao tratamento com antimônio pentavalente ou na incapacidade de seu uso. É um antimicrobiano poliênico com ótima atividade *in vitro* na destruição de parasitas de *Leishmania*, dentro e fora dos macrófagos, tornando-se um dos medicamentos mais potentes disponíveis no mercado. Possui excreção lenta, mantém-se no sangue em concentração de 0,5 a 5 mg/L, quando se administra 0,5 a 1 mg/kg de peso corporal, durante 20 dias, ou em dias alternados (GIL et al., 2009).

O mecanismo de ação é resultado da interação do fármaco na membrana plasmática do parasito, no qual existem ésteres (ergosterol ou episterol). A anfotericina B complexa-se com os precursores de um grupo esterol, primariamente ao ergosterol, formando poros ou canais, que alteram a permeabilidade seletiva a cátion pela formação de um cerne hidrofílico com consequente perda de K^+ intracelular causado pelo desequilíbrio osmótico ocasionando à morte celular do parasito (RANG et al., 2005).

A anfotericina B causa efeitos colaterais, como: flebite, cefaléia, efeitos renais em consequência da vasoconstrição, astenia, náuseas e vômitos, dores musculares e articulares, febre, calafrios (CIMERMAN; CIMERMAN, 2010).

Em decorrência dos efeitos colaterais, foram desenvolvidas novas formulações, como a anfotericina B lipossomal, no qual a anfotericina B foi incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterol fosfatidilglicerol, reduzindo as reações adversas. Entretanto, a meia-vida é mais curta, pois a droga é rapidamente sequestrada pelos macrófagos no fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações. O uso dessa nova formulação tem alto custo, impossibilitando seu uso em regiões endêmicas, onde residem as populações afetadas mais carentes (BRASIL, 2007).

As pentamidinas são diaminas aromáticas que vem sendo utilizadas como medicamento alternativo nos casos que não respondem ou nos quais o paciente apresente contra-indicação aos antimoniais pentavalentes e à Anfotericina B convencional e lipossomal. Seu mecanismo de ação não está elucidado, mas há hipótese que o acúmulo da pentamidina nas mitocôndrias leva à desintegração do cinetoplasto e ao colapso do potencial eletrônico da membrana mitocondrial. Tendo como reações adversas: dor, rigidez muscular e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, rigidez, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Atualmente, não existem vacinas disponíveis para humanos como prevenção, e segundo Manual de Vigilância e Controle de LV (2014), há uma vacina para caninos, porém sem constatação de seu custo-benefício e eficácia para controle de reservatório em programas de saúde pública. Devido à toxicidade, falta de resposta terapêutica, seletividade para a maquinaria do parasito e resistência à droga o arsenal terapêutico atual fica longe de ser considerado o ideal. Com isso, há uma necessidade de identificação, caracterização e validação de alvos terapêuticos potenciais urgentemente para o tratamento das formas de leishmaniose (ROBERTS, 2004)

2.6 Arginase

Segundo Riley, Roberts e Ullman (2011), um alvo potencial para produção de fármacos leishmanicidas tem sido indicado, a arginase. Os mamíferos possuem dois genes que codificam duas isoenzimas, tipo I e II, similares quanto às propriedades enzimáticas, porém diferentes com relação à localização subcelular, distribuição tecidual, regulação de expressão e reatividade imunológica. A arginase citosólica do tipo I é expressa abundantemente em hepatócitos e está envolvida na detoxificação de amônia através da síntese de ureia; já

arginase mitocondrial do tipo II é expressa em níveis relativamente baixos nas mitocôndrias de células extra-hepáticas, incluindo enterócitos, células mielóides do baço, células endoteliais, epiteliais, macrófagos e células vermelhas, estando envolvida em funções biossintéticas como síntese de L-ornitina, L-prolina e L-glutamato (WU; MORRIS, 1998).

A arginase é uma enzima presente em mamíferos e protozoários que regula concentração de L-arginina nas células onde é expressa, pois, acelera a hidrólise da L-arginina em L-ornitina (precursora da produção de poliaminas) e ureia competindo com a óxido nítrico sintase (NOS II) pelo mesmo substrato (WU; MORRIS, 1998).

Segundo Wu e Morris (1998), a L-arginina é empregada na síntese de óxido nítrico (NO), um gás inorgânico de meia vida curta envolvido em várias funções fisiológicas como: neurotransmissão, atividade imune, vasodilatação, adesão e agregação plaquetárias. Foram relatadas três isoenzimas de óxido nítrico sintase (NOS), codificadas por diferentes genes: NOS neuronal (nNOS tipo I), NOS induzida (iNOS, tipo II) e NOS endotelial (eNOS, tipo III). Para que haja atividade da eNOS como da nNOS nos tecidos da maioria dos animais, é necessária uma concentração mínima de cálcio no interior da célula; já a iNOS não está na maioria das células, mas é induzida por endotoxinas e citocinas inflamatórias em macrófagos.

A ativação clássica de macrófagos ocorre quando a NOS oxida L-arginina para NO, obtendo como intermediários N-hidroxi-L-arginina e L-citrulina (MULEME et al., 2009). A atividade microbiana do NO é parte integrante na resposta do hospedeiro a infecção. Inversamente, a arginase pode reduzir a atividade da iNOS por competição com L-arginina. Assim, atividades de iNOS e arginase podem ser influenciados pela disponibilidade da L-arginina (WANASEN; SOONG, 2008).

Assim, a arginase é fundamental na regulação do funcionamento da iNOS de macrófagos, regulando a concentração de arginina. Como visto nos estudos há diminuição na produção de NO quando arginase II é induzida, danificando o papel da célula de defesa (WANG et al., 1995).

As enzimas envolvidas na biossíntese de poliaminas apresentam características estruturais, que diferem significadamente entre o parasito e o homem. Existem transportadores de poliaminas (POT1) presentes em protozoários do gênero *Leishmania* e encontradas na célula humana, assim, quando os níveis de poliaminas ficam reduzidos no parasito, este pode dispor de seus transportadores para obter poliaminas imprescindível ao seu desenvolvimento (HEBBY; PERSSON; RENTALA, 2007).

O parasito dispõe também da tripanotona em seu meio intracelular, sendo esta poliamina responsável pela detoxificação pela inibição do estresse oxidativo proveniente da indução de NO pelos macrófagos, tornando-se possível a sobrevivência deste protozoário nesta célula (HEBBY; PERSSON; RENTALA, 2007).

A DL- α -difluorometilornitina (DFMO) é uma substância ativa contra promastigotas de *Leishmania donovani*. Atua como inibidor irreversível da ornitina descarboxilase (ODC), enzima que catalisa a conversão de L-ornitina a putrescina, assim na presença desse inibidor torna-se inviável a produção de poliaminas com consequente morte do parasito (ROBERTS et al., 2004).

A sequência completa do gene da arginase de *L. (L.) amazonensis* foi elucidada (SILVA, 2002) possibilitando encontrar diferenças no sítio ativo desta enzima nos parasitos e mamíferos. Assim foi possível iniciar a exploração de bioativos que inibem apenas a arginase da *Leishmania*, contribuindo para obtenção de novos quimioterápicos efetivos contra essa doença (DA SILVA et al., 2008).

2.7 Fitoativos

A utilização de plantas medicinais com objetivo de cura por parte da população é provavelmente tão antigo quanto o aparecimento do próprio homem, propiciando empenho de cientistas na busca por moléculas que possam ser usadas na cura de doenças. A maior diversidade de plantas medicinais esta localizada no Brasil e são utilizadas pelos seus habitantes. Esse imenso patrimônio genético torna-se um local perfeito para desenvolvimentos de pesquisas voltados à comprovação de usos populares de plantas (FOGLIO et al., 2006).

Estudos com plantas medicinais estão associadas a etnofarmacologia, ou seja, as informações coletadas da população que fazem uso culturalmente das espécies vegetais, com pesquisas químicas e/ou farmacológicas. Dessa forma, há possibilidades de elaborar hipóteses relacionadas aos efeitos benéficos ou adversos observadas pela população que as utilizam (ELISABETSKY; SOUZA, 2007). Com isso, para usufruir de todos os ativos biológicos, deve-se criar um preparo e uso correto. A etnofarmacologia investiga as possibilidades e hipóteses referentes aos conhecimentos tradicionais, buscando empiricamente o que provoca os efeitos dos "fármacos tradicionais" (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

Apontamentos de efeitos colaterais de plantas medicinais são externos à manipulação, estão associados a vários problemas de processamento tais como identificação errônea das plantas, falta de padronização, troca e falsificação de plantas, preparação, dosagem incorreta (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

A eficácia de medicamentos dinamizados (plantas medicinais) beneficia de forma relevante para divulgação das qualidades terapêuticas dos vegetais, receitados rotineiramente pela eficácia medicinal que demonstram, mesmo que seus constituintes químicos sejam desconhecidos (MACIEL et al., 2002).

O conhecimento adquirido nos estudos realizados em grandes centros de pesquisa científica precisa chegar até a população que utiliza terapias medicinais, para que ela possa ser beneficiada com informações corretas acerca do uso dessas plantas (FERRO, 2006). Com isso, o Ministério da Saúde criou o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais para garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e, também para desenvolvimento de terapias com embasamento científico por meio da realização de pesquisas que confirmassem as propriedades terapêuticas alegadas pela população brasileira como potencialmente medicinais (BRASIL, 2006).

Na leishmaniose, pesquisas químicas e imunofarmacológicas tem sido efetuadas com objetivo de descobrir novos compostos com menos efeitos colaterais, mais favorável economicamente e que reverta à resistência do patógeno às drogas. No entanto em lugares endêmicos a utilização de plantas no tratamento da leishmaniose é uma prática bastante antiga. Mas, esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na leishmaniose cutânea pode ocorrer a cura espontânea das lesões, daí a importância dos estudos etnofarmacobotânicos (BEZERRA, 2006).

Os metabólitos secundários são essenciais para sobrevivência das plantas, são encarregados de ajudar na adaptação do vegetal em seus ambientes e também responsáveis por moléculas biologicamente ativas (FUMAGALI et al., 2008).

As lignanas, lactonas sesquiterpênicas, alcaloides, flavonoides, terpenos são os principais metabólitos secundários que tem efeito leishmanicidas contidos na literatura (BEZERRA, 2006).

2.8 *Stachytarpheta cayennensis*

Segundo Moreira et al. (2002), na Amazônia do Maranhão, Município de Buriticupu, Brasil, local endêmico para LTA, pesquisas executadas mostraram que o extrato de folhas da *Stachytarpheta cayennensis*, conhecida popularmente como gervão, é uma das mais utilizadas pela população para tratamento da doença causada por *Leishmania*.

A *Stachytarpheta cayennensis*, pertencente à família Verbenaceae, conhecida como gervão, gerbão e gervão roxo, é uma planta invasora, facilmente encontrada em pastagens, pomares, lavouras anuais e terrenos baldios. É ocasionalmente empregada para fins medicinais, principalmente na região norte do Brasil onde popularmente é mais difundida. Popularmente, é utilizada como antidiarréica, analgésica, antiinflamatória, antipirética, hepatoprotetora, laxante, distúrbios gastrintestinais e para o tratamento de lesões cutâneas (MATHIAS; EMILY, 1993).

São comumente encontradas em terrenos baldios, pomares, lavouras anuais, crescem em bordas de matas, pastagens, beiras de estradas, podem ser utilizadas para fins ornamentais e medicinais. Infusões de toda a sua parte aérea são amplamente utilizadas na medicina popular brasileira como antipiréticos, estomáquicos, no tratamento de doenças hepáticas crônicas e com diversas outras (LORENZI, 2000). Suas raízes são usadas como cicatrizantes, tratamento de reumatismo e dores nas costas (CORRÊA, 1984).

S. cayennensis é nativa do continente Americano, em especial do Brasil, onde ocorre espontaneamente. É uma planta subarborescente anual, perene, ereta, bastante ramificada, com até 1 m de altura; caule semi quadrangular; folhas alternas, ovais, pecioladas, enrugadas, com margens serrilhadas, com até 8 cm de comprimento; flores em espigas terminais, azuladas, de até 40 cm de comprimento (figura 5), apresenta grupos de metabólitos secundários, tais como flavonoides, saponinas e glicosídeos cardioativos (LORENZI; MATOS, 2002).

A *S. cayennensis* apresenta efeito benéficos como: antimicrobiana, gastroprotetora, analgésica e anti-inflamatória, recomendados pela população e que foram testados experimentalmente (SCHAPOVAL et al., 1998). Seus principais metabólitos secundários são: ácido glicogênico, compostos fenólicos, alcaloides, glicosídeos, verbenina, taninos, flavonoides, glicosídeos, esteróides. Alguns desses compostos tem efeitos leishmanicida (MATHIAS; EMILY, 1993).

Figura 5- *Stachytarpheta cayennensis*

Fonte: Própria autoria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os compostos ácido clorogênico (C3878), ácido cafeico (51868), ácido rosmarínico (536954), L-arginina (A5006), L-ornitina (O2375), 2-aminoethyl diphenylborinate (D9754), polyetilenoglicol (PEG), soro fetal bovino (F0804) foram comprados da SIGMA ALDRICH. Reagentes para análise de ureia ‘Ureia CE’ foram adquiridos da Labtest; meio de cultura M199, penicilina e streptomicina foram adquiridos da Gibco.

3.2 Coleta e preparo da droga vegetal

As folhas de *Stachytarpheta cayennensis* foram coletadas no dia 26 de julho de 2014 às 06:30 h da manhã na Fazenda Vaca-Gorda, Município de Formosa da Serra Negra, Maranhão, Brasil (-6.158711/ -46.065286). A identificação foi feita pela Dr^a. Claudia do Carmo Maquiaveli. A exsicata foi depositada no Herbário Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo – ESALQ, sob o número 132694.

3.3 Preparação do extrato vegetal

As folhas de *S. cayennensis* foram lavadas em água corrente, depositadas em jornal para retirar o excesso de umidade e secas ao ar livre em sombra por cinco dias. Depois as folhas foram trituradas em moinho.

O material vegetal foi deslipidificado em aparelho de Soxhlet com hexano, para retirada da clorofila e lipídeos. Após esse processo a amostra foi incubada em estufa a 37°C para remoção do solvente residual. A partir da droga deslipidificada foi feita extração por decocção a 72° C durante 30 minutos e a seguir foi realizado o fracionamento com butanol (1:1, v/v). Foram obtidas as frações butanólica (BUF-CHÁ) e aquosa (Aq-CHÁ). Uma segunda extração foi feita por maceração em etanol 50% por quatro dias em frasco âmbar. Foi adicionado butanol também para extração e separação das fases (BUF-EtOH) e aquosa (Aq-

EtOH). A remoção do butanol foi feita em rotoevaporador à pressão reduzida a 65°C. A droga seca foi ressuspensa em água na mesma temperatura, congeladas e liofilizadas.

Figura 6- Extração e fracionamento dos extratos produzidos por decocção (CHÁ) e por maceração em EtOH 50%.

Aq=fase aquosa gerada após fracionamento com butanol.

3.4 Cromatografia em camada delgada

A fração (BUF-CHÁ) diluída em etanol 50% foi aplicada à placa de sílica gel (70644 SIGMA-ALDRICH) utilizando fase móvel ETOAC:ETOOH:HCOOH:H₂O:CHCl₃ na proporção de 30:4:4:8:10. A análise foi feita aplicando os reveladores NP (2-aminoethyl diphenylborinate 1% em metanol) e PEG (polyetilenoglicol 5% em etanol). A visualização foi realizada em câmara BOITTON com luz UV (254 nm).

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Utilizou-se Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu-Prominence) para caracterização dos componentes ativos da planta *S. cayennensis*. A separação foi efetuada utilizando resina RP-amida (5 µm, Ascentis-Supelco, Sigma-Aldrich) em coluna (25 cm x 4,6

mm). As amostras foram preparadas a 5 mg/mL em 0,1% de HCOOH, e alíquotas (10 µL) foram injetados na coluna com fluxo de 1 mL/min. Os componentes foram eluídos usando um gradiente linear de 10% a 35% de CH₃CN / H₂O contendo 0,1% de HCOOH em 30 min. A detecção foi realizada a 280 nm com PAD (Photodiode Array Detector). Os constituintes foram caracterizados por comparação com uma amostra autêntica de verbascoside e isoverbascosido por RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

3.6 Teste de inibição enzimática

As frações (BUF-CHÁ, Aq-CHÁ, BUF-EtOH e Aq-EtOH) do extrato da *Stachytapheta cayennensis*, os compostos ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, foram testados para verificar quais apresentavam atividades sobre a enzima arginase de *L. (L.) amazonensis*. Os experimentos foram realizados em duplicata em pelo menos três experimentos independentes conforme descrito perveiramente (MANJOLIN, 2013).

A concentração de ureia foi determinada pelo teste colorimétrico da Labtest® referente aos reagentes do kit 'Ureia CE'. A ureia (10 µL) provinda da hidrólise de L-arginina por ação da arginase contida nas amostras foi incubada com 750µL de urease tamponada a 37°C por 5 minutos. A urease hidrolisa a ureia a gás amônia que gera íons amônio em meio aquoso por hidrólise. Os íons amônio reagem com salicilato catalisado por nitroprussiato de sódio e a seguir quando adicionado 750 µL de oxidante hipoclorito de sódio em pH alcalino gerando cor (azul de indofenol) após incubação a temperatura de 37°C por 5 minutos. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra. Assim a concentração de indofenol foi determinada por meio da absorbância a 600 nm. Foram preparados juntamente com os testes, o branco e o padrão para controle. A taxa de inibição foi calculada pela formula:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{A_{600A}}{A_{600C+}} \times 100$$

A_{600A} = Absorbância da amostra e

A_{600C+} = Absorbância do padrão de ureia a 70 mg/dL

As IC₅₀ foram determinadas com a utilização do programa origin 8.0 utilizando modelo logarítmico de dose x resposta de inibição.

3.7 Mecanismo de Inibição e cálculo das constantes K_i/k_i'

As constantes K_i e K_i' se referem aos equilíbrios estabelecidos entre a enzima (E) e substrato (S) na presença do inibidor (I). A constante de inibição K_i se refere a constante de dissociação do complexo EI enquanto que K_i' se refere a dissociação do complexo EIS (CORNISH-BOWDEN, 1974).

Para determinação de K_i e K_i' foram realizados testes de inibição no formato 3 x 3, ou seja, três concentrações diferentes de substrato para três concentrações diferentes de inibidor. Todas as reações unitárias foram realizadas em tampão (50 mM CHES pH 9,5) contendo concentrações variáveis do substrato L-arginina (25, 50 e 100 mM a pH 9,5). Os inibidores foram utilizados em três concentrações diferentes sendo uma concentração próxima à IC_{50} , uma a 2 vezes a IC_{50} e uma com a metade da IC_{50} . As diferentes concentrações de substratos e inibidor foram obtidas por diluição seriada. Duas soluções foram preparadas para posterior obtenção das reações unitárias: a primeira solução (S1) continha L-arginina (pH 9,5) na concentração de duas vezes em relação àquela desejada na reação unitária, a segunda solução (S2) continha enzima diluída em CHES 500 mM (pH 9,5). A reação unitária foi obtida pela homogeneização de 50 μ L de S1, 10 μ L de inibidor e adição de 40 μ L de S2. A adição foi feita de forma sincronizada a cada 10 segundos, seguida de incubação imediata em banho-Maria por 15 minutos a 37 °C. A ureia produzida foi analisada como descrito acima.

3.8 Análise de dados

Os dados de velocidade relativa na presença do inibidor foram utilizados para a construção das curvas do inverso da velocidade em função da concentração de inibidor gráfico de Cornish-Bowden: $[i] \times S/V$. a constante K_i foi determinada para os inibidores que apresentaram mecanismo de inibição competitiva (CORNISH-BOWDEN, 1974). O cálculo de cada K_i foi feito utilizando-se as equações das retas obtidas por regressão linear: foram determinados os pontos de intersecção das curvas igualando-se as equações duas a duas, utilizando-se a média dos valores obtidos como resultado final. As regressões lineares foram obtidas como o programa MS-OFFICE-Excell v.2010. Os resultados foram expressos pela média calculada das constantes e seu desvio padrão da média.

3.9 Cultivo de *Leishmania*

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM /BR / 1973 / M2269) foram gentilmente cedidas pela Dr^a Lucile Maria Floeter-Winter, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. As promastigotas foram mantidas a 25°C em meio M199, suplementado com 10% de soro fetal bovino 50 U/mL de penicilina, 50µg/mL de estreptomicina e 5 µg/mL de hemina. Para determinação da fase estacionária de crescimento do parasito, foram inoculados $5,0 \times 10^5$ parasitos/mL em meio M199, mantidos em microtubos de 1,5 mL por 8 dias. A curva de crescimento de *L. amazonensis* foi determinada por contagem direta dos parasitos fixados em paraformaldeído 2% utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico.

3.10 Teste de viabilidade celular

Os testes foram realizados em duplicata em três experimentos independentes, com seis diluições seriadas da fração do extrato (BUF-CHÁ) a 500 µg/mL e das moléculas isoladas ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, pentamidina (controle) com concentração inicial de 500 µM. Foram realizados em microtubos com inoculo de $5,0 \times 10^5$ parasitos/mL em fase estacionária em microtubos contendo 900 µL de meio M199. O crescimento e/ou inibição dos parasitos foram avaliados por contagem direta em câmara de Neubauer nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

3.11 Suplementação com L-ornitina e L-arginina

Culturas de promastigotas de *Leishmania* na fase estacionária (5×10^5 células/mL), foram inoculadas com e sem 50 µg/mL do inibidor (BUF-CHÁ). Foram realizados os seguintes tratamentos: a cultura de células não tratadas (controle); cultura de células suplementado com ornitina 5 mM (ORN); cultura de células tratadas com 50 µg/mL do inibidor (BUF), cultura de células tratadas com 50 µg/mL do inibidor (BUF) e suplementado com ornitina 5 mM (BUF+ORN); cultura de células suplementado com 5 mM de arginina (ARG); cultura de células tratadas com 50 µg/mL do inibidor (BUF) e suplementado com 5 mM de arginina (ARG + BUF). Os testes foram realizada em microtubos com um volume final de 900 uL em meio M199. As células sobreviventes foram contadas em câmara de

Neubauer após 72 h de incubação. Dois ensaios independentes foram realizados em triplicado. Os dados foram expressos como a média do número de células e o erro padrão da média (EPM) para cada tratamento.

3.12 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPadPrism. Os resultados do teste L-arginina reversão L-ornitina foram analisados por análise de variância one-way (ANOVA) por apresentarem normalidade e homogeneidade de variância, seguida de teste múltiplo de comparação Newman-Keuls post-hoc. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos constituintes ativos de *S. cayennensis*

Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa dos constituintes da fração butanólica (BUF). A (Figura 7) mostra separação dos compostos presentes no extrato butanólico, fração (BUF-CHÁ) das folhas de *S. cayennensis* por cromatografia em camada delgada (CCD), foi utilizado como revelador NP (2-aminoethyl diphenylborinate 1% em metanol) e PEG (polyetilenoglicol em etanol 5%) visualizados em luz UV-C 254 nm, revelando pelo menos a presença de 4 substâncias com diferentes fatores de retenção (RF) (Tabela 1).

Figura 7- Cromatografia em camada delgada do extrato de *Stachytarpheta cayennensis* com revelação NP/PEG visualizada a 254 nm.

4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A fração butanólica do chá (BUF-CHÁ) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (Figura 8), onde foram revelados vários picos (Tabela 1), no qual o pico 2 se destacou como majoritário (70 %) com um tempo de retenção (TR) de 23,5 minutos. A análise por ressonância magnética nuclear (RMN) indica o isolamento dos compostos verbascosídeo (A) e isoverbascosídeo (B) (Figura 9), através de comparação com as amostras padrão para CLAE. A presença de dois grupos catecol, grupo metila da ramnose foram essenciais para identificação de ambos compostos na mistura. Também foi possível estimar uma proporção de 7:3, respectivamente, para as moléculas verbascosídeo e isoverbascosídeo. Relacionando-se a CCD e o cromatograma obtido através da CLAE, pode se dizer que as

bandas presente na cromatografia de camada delgada é indicativa das substâncias ativas e pode está relacionada com os picos apresentados na cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 8- Cromatograma da fração butanólica (BUF- CHÁ) obtida do extrato aquoso (decocção).

Tabela 1- Valores do tempo de retenção (RT) dos picos do cromatograma de CLAE e fator de retenção (RF) da CCD.

RT	Pico/Banda	Percentual	RF
21	1	3%	0,2
23,5	2	90%	0,3
25,0	3	7%	0,4
26,8	4	5%	0,6

RF= distância percorrida da amostra dividida pela distância percorrida pelo solvente na placa.

Figura 9-Estrutura das moléculas identificadas na *S. cayennensis*: (1) verbascoside, (2) isoverbascosideo..

4.3 Inibição da arginase por frações do extrato *S. cayennensis*

As quatro frações obtidas do extrato da *S. cayennensis* (BUF-CHÁ, Aq-CHÁ, BUF-EtOH e Aq-EtOH), foram utilizadas em ensaio de inibição da arginase para determinação da IC_{50} . A Figura 10 mostra as curvas de $\log(\text{dose})$ versus resposta obtidas pelo modelo sigmoidal ($\log IC_{50}$) que foram utilizadas nos cálculos de IC_{50} das frações do extrato (Tabela 2). A fração (BUF-CHÁ) apresentou melhor atividade inibitória, com uma IC_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$ e foi determinado o mecanismo de inibição enzimática. A cinética foi analisada através dos gráficos de Dixon e Cornish-Bowden (Figura 11). O mecanismo de inibição encontrado foi do tipo competitivo com $K_i = 4,2 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 2- IC_{50} para inibição da arginase de *L. amazonensis* pelas frações obtidas da *Stachytarpheta cayennensis*.

Inibidor	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
BUF-CHÁ	5 ± 1
Aq-CHÁ	22 ± 2
BUF-EtOH	11 ± 2
Aq-EtOH	19 ± 2

Figura 10- Curvas log(dose) versus resposta para inibição da arginase de *L. amazonensis* utilizadas para cálculo de IC₅₀.

Figura 11- Determinação do mecanismo de inibição da fração BUF-CHÁ. Gráfico de Dixon (A) e Cornish-Bowden (B). Concentração de L-arginina: ◆ 100mM ■ 50mM ▲ 25 mM. Concentração de inibidor utilizada: 2.5, 5 e 10 µg/mL.

4.4 Análise de compostos estruturalmente relacionado com o verbascosídeo

O verbascosídeo possui em sua estrutura (Figura 9) a presença de ácido cafeico esterificado à molécula de glicose. O ácido cafeico também está presente em compostos como ácido clorogênico e ácido rosmarínico. Assim, foram realizados ensaios de inibição da arginase para determinação das IC_{50} dos três ácidos observando-se uma variação de 1,5-3,4 μ M (Tabela 3). Os dados da cinética obtidos através das curvas dos gráficos Dixon e Cornish-Bowder (Figura 12) foram utilizados para calcular o K_i e mecanismo de inibição, sendo que todos os ácidos apresentaram inibição competitiva.

Tabela 3- Inibição da arginase de *L. amazonensis* pelas moléculas com estrutura relacionadas ao verbascosídeo e isoverbascosídeo.

Inibidor		IC_{50} (μ g/mL)	R^2	K_i	Mecanismo de inibição
Ácido clorogênico		$3,4 \pm 0,5$	0,98	$0,6 \pm 0,1$	competitivo
Ácido cafeico		$1,5 \pm 0,1$	0,99	$1,2 \pm 0,6$	competitivo
Ácido rosmarínico		$1,5 \pm 0,5$	0,97	$0,7 \pm 0,4$	competitivo

Figura 12- Determinação do mecanismo de inibição das moléculas: ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico.

Gráficos de Dixon (A,B,C) e Cornish-Bowden (D,E,F). Concentração de L-arginina: ◆ 100mM ■ 50mM ▲ 25 mM. Concentração de inibidor utilizada: 2.5, 5 e 10 μM .

4.5 Teste de viabilidade celular

O teste em cultura das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* como BUF-CHÁ apresentou atividade inibitória após 48 h de tratamento com pico máximo de atividade em 72h. Os ácidos cafeíco, rosmarínico e clorogêncios apresentaram inibição após 72 h em contato com os parasitos. O efeito leishmanicidas foi mais eficaz no tempo de 72 h de incubação para os ácidos cafeíco e rosmarínico, enquanto o ácido clorogênico atingiu pico de atividade em 96 h (Tabela 4). Foi utilizado pentamidina como controle de inibição do crescimento celular.

Tabela 4- Atividade leishmanicida do extrato da *S. cayennensis* das moléculas, na cultura de promastigota de *L. (L.) amazonensis*

Inibidor	Viabilidade celular (IC ₅₀) (µg/mL)			
	24h	48h	72h	96h
BUF-CHÁ	NE	125 (80-195)	51 (29-89)	89 (57-146)
Ácido Cafeico	NE	790 (193-3230)	202 (64-632)	NE
Ácido Clorogênico	397 (87-1800)	219 (80-599)	247 (143-427)	30 (31-43)
Ácido Rosmarínico	176 (28-1088)	219 (80-599)	22 (10-48)	189 (65-553)
Pentamidina	23 (12-44)	0.6 (0.-0.9)	0.1 (0.01-0.5)	0.6 (0.03-0.1)

Os dados representam experimentos independentes em duplicata. Os resultados são expressos como IC₅₀ ($R^2 \geq 0,80$) e intervalo de confiança de 95%. IC₅₀ = concentração que inibe 50% do crescimento de promastigotas *L. (L.) amazonensis*. NE = nenhum efeito.

4.6 Atividade sobre promastigotas em cultura suplementadas com L-ornitina e L-arginina

Foi realizado teste de inibição da fração BUF-CHÁ (50µg/mL), na cultura de promastigotas de *Leishmania* com suplementação de L-ornitina e L-arginina (5 mM), para avaliar inibição do crescimento do parasito. Duas hipóteses foram testadas: 1- o crescimento poderia ser reiniciado contornando o passo interrompido causado pela inibição de arginase utilizando L-ornitina e 2- por competição com o aumento da arginina no meio de cultura.

A inibição resultante do extrato foi revertida com a adição da L-ornitina (BUF+ORN •#) após 72 h de incubação. O tempo de incubação e a concentração do inibidor foram baseados na melhor EC₅₀ do extrato BUF-CHÁ que foi obtida em 72 horas. A L-arginina (BUF+ARG *) não induziu e nem inibiu o crescimento das promastigotas de *L.(L.) amazonensis* na presença de BUF-CHÁ (Figura 13).

Figura 13- Viabilidade celular de *L. (L.) amazonensis*.

CONTROLE = Células em meio 199; BUF = Células mais inibidor (••); ORN = Células mais L-ornitina (##); ARG = Células mais L-argina (**).

5 DISCUSSÃO

O uso empírico de plantas medicinais pela população torna o campo da pesquisa promissora para novos e seletivos agentes ativos para tratamento de doenças acometidas por parasitos, como a leishmaniose, que é uma doença negligenciada, e é considerado um problema de saúde mundial que afeta milhões de pessoas (GARCÍA *et al.*, 2012). Aproximadamente 60% dos agentes antiparasitários, antitumorais, anti-infecciosos estão disponíveis comercialmente com ativos biológicos adquiridos das plantas (SHU, 1998).

No estudo de Moreira et al (2002), uma das plantas mais mencionadas para tratamento da leishmaniose foi *Stachytarpheta. cayennensis*. Assim a planta *S. cayennensis* foi selecionada para o estudo. No trabalho de Battisti et al (2013), a população em estudo mencionou várias formas de uso da planta e suas indicações, sendo usada folhas, caules e raízes da *S. cayennensis* na forma de chás sendo preparados por infusão, decocção, macerados ou formas de uso externo como cataplasma.

Foi feito a extração das folhas da planta em estudo, pelo processo de decocção e por extração com etanol. O etanol foi empregado na extração, pois, segundo Simões et al. (2004), geralmente todos os metabólitos secundários apresentam alguma solubilidade em contato com EtOH e ainda por ter baixo ponto de ebulição para posterior extração do solvente.

Para conhecer os constituintes químicos da fração (BUF-CHÁ) das folhas de *S. cayennensis* foi feito análise cromatográfica por CCD que apresentou bandas distintas com colorações nítidas. Em estudos prévios Hostettmann et al (1986), a cromatografia de camada delgada apresenta algumas vantagens, como: melhor resolução, sensibilidade, possibilidades de utilização de maior variação de reagentes de detecção.

A fração BUF-CHÁ também foi analisada por CLAE, para verificação da pureza do composto isolado. O pico 2 (Figura 8) destacou-se como principal (90%) com tempo de retenção de 23,5 minutos. A análise por RMN indicou isolamento de dois compostos majoritários identificados como sendo verbascosídeo e isoverbascosídeo, através de comparação com as amostras autênticas utilizadas como padrão. O verbascosídeo foi isolado com elevado grau de pureza na planta *Euphrasia rostkoviana* exibindo fortes atividades antioxidantes (BLAZICS et al. 2011), e propriedades anti-inflamatórias que afirma ser um glicosídeo feniletanóides ativo de muitas plantas medicinais e chá amargo (CHEN et al. 2009).

Manjolin et al. (2013), descreveu que uma das características principais dos inibidores da arginase é a presença de grupo catecol. Sendo assim, verbascosideo e isoverbasosideo podem ser indicativos esperançosos para testes de inibição da enzima.

O posicionamento da esterificação do ácido cafeico na glicose é que difere o verbascosideo (hidroxila do carbono 5) do isoverbasosideo (hidroxila do carbono 4). O ácido cafeico também está presente em compostos como ácido clorogênico e ácido rosmarínico, que possibilitou assim hipóteses de atividades inibitória da arginase.

Segundo Birkholtz et al., (2011), a via metabólica de poliaminas fornece alvos de fármacos promissores de estratégias para tratamento de doenças parasitárias causadas por protozoários como a *Leishmania* sp. A enzima arginase catalisa a conversão de L-arginina em ureia e ornitina, sendo assim o primeiro passo na biossíntese de poliaminas no parasito. O nocaute do gene da arginase em *Leishmania mexicana* estabeleceu que a arginase é uma enzima essencial para a forma promastigotas e que a enzima fornece um importante mecanismo de defesa para a sobrevivência do parasita no seu hospedeiro vertebrado. Assim inibidores da arginase oferecem uma alternativa para busca e produção de medicamentos leishmanicidas (RILEY 2011).

Neste trabalho foi utilizado a fração (BUF-CHÁ) do extrato da planta *S. cayennensis* para inibição da arginase. Previamente testamos o extrato bruto hidroalcoólico da planta, no qual apresentou IC_{50} de 36 $\mu\text{g/mL}$, direcionando assim para o fracionamento e execução dessa pesquisa. A fração (BUF-CHÁ) apresentou IC_{50} de 5,2 $\mu\text{g/mL}$, mostrando maior potencia comparado com outros trabalhos, como o de Cruz et al (2013) onde, a fração acetato de etila (AF) da planta *Cecropia pachystachya* apresentou uma IC_{50} de $17 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ para inibição da arginase de *L. amazonensis*.

Os compostos com alto grau de pureza apresentaram alta inibição da arginase. O ácido cafeico ($IC_{50} = 1,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$), e o ácido rosmarínico ($IC_{50} = 1,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$) apresentaram potência duas vezes maior que o ácido clorogênico ($IC_{50} = 3,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$). Estudo prévio de teste de inibição enzimática da arginase com o ácido clorogênico a 20 μM havia apresentado inibição de 67% (CRUZ et. al. 2013). Outro trabalho envolvendo inibição da arginase que utilizou os flavonoides quercetina, quercitrina e isoquercitina para inibição da enzima, mostrou valores de IC_{50} de 3,8-10 μM mostrando assim que a IC_{50} dos ácidos testados aqui tem até o dobro da potencia da quercetina (SILVA et al 2012).

As constantes K_i e K_i' referem-se ao equilíbrio estabelecido entre a enzima (E) e o substrato (S) na presença do inibidor (I). A constante de inibição K_i se refere a constante de dissociação do complexo EI enquanto que K_i' se refere à dissociação do complexo EIS (CORNISH-BOWDEN, 1974). As moléculas ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido rosmarínico e a fração (BUF-CHÁ), mostraram-se todas com mecanismo do tipo competitivo ou seja, o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima através de um processo reversível, formando somente complexo do tipo EI.

No teste de viabilidade celular todos os inibidores apresentaram melhor inibição com 72 horas de tratamento. A fração (BUF-CHÁ) apresentou uma IC_{50} de 51 $\mu\text{g/mL}$, mostrando menor potência que a molécula do ácido rosmarínico onde, sua IC_{50} foi de 22 $\mu\text{g/mL}$. A diferença entre ação inibitória do (BUF-CHÁ) na arginase e das formas promastigotas de *L. amazonensis*, pode ser devido ao acesso dos compostos ao glicossomo, a organela onde arginase está localizada no parasito (Silva et al. 2012). Comparando com o trabalho de Cruz et al. (2013), a fração acetato de etila (AF) da *Cecropia pachystachya* apresentou-se com IC_{50} de 53.3 $\mu\text{g/mL}$ que foi similar ao resultado obtido para *S. cayennensis* (BUF-CHÁ). O extrato hidroalcoólico de folhas de *S. cayennensis* inibiu o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* com EC_{50} de 382,5 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas (MOREIRA et al. (2007).

Em pesquisas realizadas por Nakamaruet al. (2006), foram testados extratos da planta *Piper regnellii* e suas frações sobre cultura de *L. amazonensis* com 72 horas de tratamento, apresentando melhor atividade inibitória nas frações aquosa e acetato de etila com IC_{50} de 167 e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Foi realizado teste de inibição da fração BUF-CHÁ (50 $\mu\text{g/mL}$) com suplementação de L-ornitina e L-arginina (5 mM). A inibição do crescimento de promastigotas foi revertida com a suplementação de L-ornitina nos meios de cultura, mostrando a inibição da arginase nas formas promastigotas. A adição do substrato L-arginina no meio de cultura não reverteu o crescimento.

6 CONCLUSÃO

- ✓ A fração butanólica (BUF-CHÁ) do extrato feito por decocção (CHÁ) da planta *S. cayennensis* apresentou uma potente inibição da arginase (5,2 µg/mL) e também inibiu o crescimento das formas promastigotas (51 µg/mL) de *L. (L.) amazonensis*. E comparando-se com o valor encontrado na literatura para mesma e outras espécies de plantas com potencial leishmanicida, conclui-se que a espécie estudada também apresenta tal potencial e pode resultar em ativos bastante interessantes para o tratamento das leishmanioses;
- ✓ A partir das análises por CCD e CLAE-UV e RMN realizadas, provavelmente verbascosídeo e isoverbascosídeo são os compostos ativos da *S. cayennensis*,
- ✓ O verbascosídeo possui em sua estrutura (Figura 9) a presença de ácido cafeíco esterificado a molécula de glicose. O ácido cafeico também está presente em compostos como ácido clorogênico e ácido rosmarínico. Com isso foi feita IC₅₀ dessas moléculas onde mostraram-se como potencial melhor na inibição da arginase do que na cultura de promastigotas, isso pode ser devido ao acesso dos compostos ao glicosomo (organela onde arginase está localizada nos parasitos);
- ✓ A suplementação com L-ornitina reverteu o efeito do inibidor nas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

7 PERSPECTIVA

A planta *Stachytarpheta cayennensis* apresenta-se como uma promissora terapia para leishmaniose causada por *Leishmania (L.) amazonensis*. Mais estudos devem ser realizados com a planta, como testar na forma amastigota do parasito, teste de toxicidade em células do hospedeiro.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Cellular and molecular immunology**. ed. Philadelphia: Saunders, 2007.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** 30: 1269-1281, 2000.
- ALBUQUERQUE, U. P. de.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.99 p.17-23, 2005.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v. 6, n.2, p. 1-6, 2005.
- BATTISTI, C. et al. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 11, n.3, p. 338-348, 2013.
- BEZERRA, J. L. **Avaliação da atividade leishmanicida de espécies vegetais**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.
- BIRKHOLTZ, L. et al. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. **Biochemical Journal**, London, v. 438, p. 229-244, 2011.
- BLAZICS, B. et al. Identification and LC–MS–MS determination of cateoside, the main antioxidant compound of *euphrasia rostkoviana*, using the isolated target analyte as external standard. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 203-208, 2011.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**, Kidlington, v.15 p. 22-28, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 180 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- CALDERON, L. de A. et al. Amazonian biodiversity: a view of drug development for Leishmaniasis and Malaria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, p. 1011-1023, 2009.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION -CDC. Global Health. Division of Parasitic Disease and Malaria. **Parasites – Leishmaniasis**. 2015. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> >. Acesso em: 02 abr. 2016.

- CHEN, C. et al. Acteoside and 6-O-acetylacteoside downregulate cell adhesion molecules induced by IL-1 β through inhibition of ERK and JNK in human vascular endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 19, p.8852-8859, 2009.
- CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. **Biochemical Journal**, London, v. 137, p. 143-144, 1974.
- CORRÊA, P. **Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984. v. 5
- CRUZ, E. M. et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 89, p. 71-77, 2013.
- DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. do C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, New York, v. 130, n. 3, p. 183-188, 2012.
- DA SILVA, E. R. et al. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 159, n. 2, p. 104-111, 2008.
- ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p.107-108.
- FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Atheneu, 2006.
- FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2015.
- FUMAGALI, Elisângela. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, João Pessoa, 2008.
- GARCIA, M. et al. Activity of Cuban plants extracts against *Leishmania amazonensis*. **ISRN Pharmacology**, New York, v. 2012, art. 104540, 2012.
- GIL, E. S. et al. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 3, p. 223-230, 2009.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2006. 1821p.

- HEBBY, O.; PERSSON L.; RENTALA M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and Leishmaniasis. **Amino Acids**, New York, v. 33, n. 2, p. 359-366, 2007.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. **Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation**. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. 544 p.
- MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 429-438, 2002.
- MANJOLIN, L. C. et al. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis infection. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 141, p. 2253-2262, 2013.
- MATHIAS, L. A.; EMILY, A. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 40, p. 53-75, 1993.
- MOREIRA, R. C. R. et al. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 187-95, 2002.
- MOREIRA, R. C. R. et al. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2007.
- MULEME et al. Infection with Arginase-Deficient *Leishmania major* Reveals a Parasite Number-Dependent and Cytokine-Independent Regulation of Host Cellular Arginase Activity and Disease Pathogenesis. **The Journal of Immunology**. 1550-6606, 2009.
- NAKAMURA, C. V. et al. Atividade anti *Leishmania* do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- _____. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, London, v. 7, n. 4-5, p. 257-266, 2004.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Leishmaniasis**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 15 ago. 2015.
- QADOUMI, M. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4638-4642, 2002.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

REY, L. **Parasitologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REY, L. **Parasitologia médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RILEY, E.; ROBERTS, S.C.; ULLMAN, B. Inhibition profile of *Leishmania mexicana* arginase reveals differences with human arginase I. **International Journal for Parasitology**, London, v.130, p. 545-552, 2011.

ROBERTS, S. C. et al. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 22, p. 23668-23678, 2004.

SILVA, E. R. da et al. Genomic organization and transcription characterization of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. **International Journal for Parasitology**, London, v.32, p.727-737, 2002.

RAMOS-E-SILVA, M.; DE MOURA CASTRO, J. C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 20, n. 2, p. 122-134, 2002.

SCHAPOVAL E. E. S. et al. Antiinflammatory and antinoceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **J Ethnopharmacol** v. 60, p. 53-59, 1998.

SIMÕES, M. O. et al **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO –SINAN. **Casos confirmados de Leishmaniose visceral, Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2013**. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

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

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.135, n. 2, p. 137-146, 2006.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunologic Research**, Basel, v.41, n. 1, p. 15-25, 2008.

WANG, W. W. et al. Co-induction of arginase and nitric oxide synthase in murine macrophages activated by lipopolysaccharide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 210, n. 3, p. 1009-1016, 1995.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 336 p. 1-17, 1998.

9 ANEXO

ANEXO A - Autorização

Formosa da Serra Negra, 11 de maio de 2014.

Autorização

Eu, Raimundo de Sá Santos, portador do R.G. nº [REDACTED], proprietário legal da fazenda Vaca-Gorda autorizo a acadêmica Amanda Maria Oliveira e Sá, RG nº [REDACTED] e o Professor Dr. Edson Roberto da Silva, R.G. nº 22.010.196-6, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) a realizar coleta de 1 Kg de gervão roxo (*Stachytarpheta cayennensis*) na minha propriedade localizada no município de Formosa da Serra Negra, estado do Maranhão.

Atenciosamente,

Raimundo de Sá Santos

Jairo Brito Lima
ESCRITANTE SUBSTITUTO