



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**PROSPECÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES
DE PROTEASES EXTRAÍDAS DE *Bauhinia forficata* Link**

Aline Santana Figueredo

São Luís

2021

ALINE SANTANA FIGUEREDO

**PROSPECÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES
DE PROTEASES EXTRAÍDAS DE *Bauhinia forficata* Link**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Processos biológicos em saúde.

Linha de Pesquisa: Doenças endêmicas no Maranhão

Orientadora: Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva

Co-orientadora: Dra. Raquel Elisa da Silva López

Coordenadora do Programa de Pós Graduação: Dra. Maria do Desterro Soares Brandão

São Luís

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Santana Figueredo, Aline.

PROSPECÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE
PROTEASES EXTRAÍDAS DE *Bauhinia forficata* Link / Aline
Santana Figueredo. - 2021.

105 p.

Coorientador(a): Raquel Elisa da Silva López.

Orientador(a): Mayara Cristina Pinto da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2021.

1. Anti-Leishmania. 2. Flavonoides. 3. Inibidores de
Proteases. 4. LSPIII. I. Elisa da Silva López, Raquel.
II. Pinto da Silva, Mayara Cristina. III. Título.

ALINE SANTANA FIGUEREDO

**PROSPECÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES
DE PROTEASES EXTRAÍDAS DE *Bauhinia forficata* Link**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: __13__/_10__/_2021__.

Prof. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade

Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Dayanne da Silva Freitas

Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Marisa Cristina Aranha Batista

Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho a Deus, por sempre estar comigo em todos os momentos.
Aos meus familiares e aos amigos que me acompanharam e me ajudaram ao longo dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar por caminhos seguros e ser o foco da minha vida. Também agradeço à minha família (Mãe, Joilde, ao meu irmão Arlan, a minha irmã “Aioi”, e a minha sobrinha Ana Júlia) e a todos os amigos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Mayara Cristina, por ter me acompanhado em todos os momentos, por toda a paciência que teve comigo no desenvolver desse trabalho, por toda a dedicação e também por toda a confiança depositada. Posso dizer que além de uma orientadora tenho uma amiga, que é uma profissional exemplar e um ser humano incrível, sou muito grata pela sua vida.

Agradeço também a minha co-orientadora, Dra. Raquel Elisa, por sempre acreditar em mim, e confiar na minha capacidade, obrigada por sempre acreditar no meu potencial e pelo seu apoio.

Agradeço ao meu querido Arthur André, por todo o apoio e carinho durante esse ciclo, agradeço por toda compreensão, paciência, todas as conversas de apoio. Agradeço também a dona Vânia e ao seu Josué, por sempre me acolherem em sua casa e me tratarem tão bem, vocês são um presente para mim.

Agradeço a tia Francisca e a Direne, por terem me acolhido quando cheguei em São Luís, em meio a tantas mudanças e incertezas vocês foram meu ponto de apoio.

Agradeço a todas as pessoas do LIF, por todo o aprendizado, pela disponibilidade de me ensinarem. Agradeço a minha parceira de bancada de diversas horas, Joana Neres, por toda ajuda prestada e também pelas conversas incríveis.

Agradeço aos amigos que sei que irei levar comigo, ao Regis, por sempre está disponível para me ajudar quando tinha dúvidas e por todas as palavras de ânimo. A Maris, que mesmo distante sempre teve uma palavra amiga, ao Thyago Leite, por sempre me ouvir e me dar um conselho de ânimo.

Agradeço as pessoas que moram comigo (Douglas, Marcelo, Mariana, Gustavo e Matheus), por vivenciarem comigo várias experiências no decorrer dessa caminhada e por sempre me apoiarem.

Gostaria de agradecer a todos os professores do LIF, por todo o suporte e por toda a disponibilidade.

Também agradeço a turma 18, que mesmo com o distanciamento social se manteve unida e sempre demonstraram seu apoio, um agradecimento especial ao Quarteto Maravilha (Weslyane, Ariadne e Jalila), que sempre me apoiaram e me ajudaram a crescer com elas.

Obrigada a todos os professores do PPGSD pela disponibilidade durante o curso. Ao seu José, por sempre está acessível para atender todas as minhas solicitações, muito grata.

Agradeço aos membros da banca, os doutores Marcelo Souza de Andrade, Dayanne da Silva Freitas, Marisa Cristina Aranha Batista e Maria do Socorro de Sousa Cartágenes por todas as sugestões feitas para este trabalho.

Ao Laboratório de Produtos Naturais, em especial a professora Cláudia, pela parceria incrível e toda a ajuda para a realização deste curso. Agradeço também à Fiocruz, por toda a parceria para a realização da pesquisa. Agradeço a CAPES, pelo suporte financeiro, o que me permitiu realizar esta pesquisa.

Obrigada a todos!!!

“EDUCAÇÃO... é a inimiga número um dos ignorantes e dos governantes tiranos. É o pilar básico de um país enorme. É quem leva oportunidade pros lugares mais distantes. É a força capaz de mudar o mundo. É mais do que conhecimento decorado e provas objetivas. É o que faz o ser humano evoluir. É aquilo que sobrevive graças a corajosos professores. É quem faz mais do que abrir os olhos, faz eles brilharem” (JOÃO DORDERLEIN).

RESUMO

Introdução: As leishmanioses fazem parte do grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo endêmicas em 98 países. A terapêutica utilizada para esta enfermidade está associada a alta toxicidade, dificuldade de administração, altos custos e resistência parasitária. Logo, a busca por novas alternativas medicamentosas mais eficazes e menos tóxicas se faz necessária e os inibidores de proteases são moléculas cruciais, visto que as proteases de *Leishmania* estão envolvidas em diversos mecanismos fisiológicos e patológicos.

Objetivo: Identificar os constituintes químicos do extrato de *Bauhinia forficata* Link, bem como o efeito citotóxico do extrato e da fração de inibidor de aspártico-proteases sobre *Leishmania amazonensis* (L.).

Materiais e métodos: primeiramente foi realizado a preparação do extrato, seguida da dosagem de proteínas, através do método de Bradford, e em seguida essas proteínas foram identificadas através do método de eletroforese. Outro método realizado foi o estudo dos constituintes químicos presentes no extrato, em que foi utilizado o teste de triagem fitoquímica de Matos, seguido da cromatografia de camada delgada, e a identificação dos constituintes químicos foram determinados através da cromatografia líquida de alta eficiência. Após a caracterização química, foram realizados os testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos de carneiro e células imortalizadas de linhagem RAW, e ensaios de toxicidade *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*. Quanto a atividade leishmanicida em promastigota de *Leishmania amazonensis*, o ensaio foi através do método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), e a atividade anti-amastigota foi realizada com ensaio de infecção de macrófagos RAW.

Resultados e discussão: Derivados de quercetina e kaempferol foram os principais metabólitos encontrados no BF-CA. Após o isolamento do inibidor de aspártico protease (BFI) foi obtido $130,6 \pm 29,94$ μg de proteína, com um rendimento aproximadamente de $4,41 \pm 0,77$ %, ou seja, 4,41% das proteínas de BF-CA. O extrato e BFI não apresentaram citotoxicidades para eritrócitos de carneiro. Em células RAW, o extrato e o inibidor testados (BF-CA e BFI) apresentaram uma concentração citotóxica para 50% das células (CC50) de 166,5 $\mu\text{g/mL}$ e 371,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e a pentamidina com CC50 de 15,24 $\mu\text{g/mL}$. Ao analisar a concentração inibitória em 50% (IC₅₀) dos extratos, sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, obtivemos IC₅₀ de 54,9 $\mu\text{g/mL}$ para o BF-CA e de 8,33 $\mu\text{g/mL}$ para o BFI, que exibiu toxicidade em quase todas as concentrações testadas. Ao avaliarmos a inibição de proteases o BFI inibiu 44,66% da atividade da pepsina protease comercial e inibiu 40% da serino protease secretada por *L. amazonensis*, a LSP III. **Conclusão:** O BF-CA possui uma composição rica em flavonoides, com comprovada ação leishmanicida em formas promastigotas, também foi identificado atividades leishmanicida contra as formas amastigotas, evidenciadas pela diminuição da infecção. Quanto ao BFI, o mesmo inibiu a atividade da serino protease secretada por *L. amazonensis* (LSP III), o tornando um potencial alvo terapêutico, uma vez que esta enzima está associada a virulência e/ou patogenicidade do parasito. Sendo assim, os inibidores de proteases despertam interesse, uma vez que são capazes de inibir proteases específicas, interferindo no curso das leishmanioses.

Palavras-chave: Anti-*Leishmania*. Flavonoides. Inibidores de Proteases. Serino Protease.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is part of the group of neglected diseases, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, being endemic in 98 countries. The therapy used for this disease is associated with high toxicity, difficult administration, high costs and parasitic resistance. Therefore, the search for new drug alternatives, more effective and less toxic is necessary and protease inhibitors are crucial molecules, since *Leishmania* proteases are involved in several physiological and pathological mechanisms. **Aim:** To identify the chemical constituents of the *Bauhinia forficata* Link extract, as well as the cytotoxic effect of the extract and the aspartic protease inhibitor fraction on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Materials and methods:** firstly, the preparation of the extract was carried out, followed by the dosage of proteins, through the Bradford method, and then these proteins were identified through the electrophoresis method. Another method performed was the study of the chemical constituents present in the extract, in which the Matos phytochemical screening test was used, followed by thin layer chromatography, and the flavonoid contents were determined by high performance liquid chromatography. After chemical characterization, *in vitro* cytotoxicity tests were performed using sheep erythrocytes and immortalized cells of the RAW lineage, and *in vivo* toxicity tests in *Tenebrio molitor* larvae. As for the leishmanicidal activity in *Leishmania amazonensis* promastigotes, the assay was performed using the MTT method (3-(4,5-dimethylthiazol2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide), and the anti-amastigote activity was performed with RAW cells. **Results and discussion:** Derivatives of quercetin and kaempferol were the main metabolites found in BF-CA. After isolation of the inhibitor of aspartic protease (BFI), 130.6 ± 29.94 μg of protein was obtained, with a yield of approximately 4.41 ± 0.77 %, that is, 4.41% of the proteins of BF-CA. The extract and BFI did not show cytotoxicity to sheep erythrocytes. In RAW cells, the extract and the inhibitor tested (BF-CA and BFI) showed a cytotoxic concentration for 50% of the cells (CC50) of 166.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 371.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, and for pentamidine with CC50 of 15.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$. By analyzing the inhibitory concentration in 50% (IC50) of the extracts on the promastigote forms of *Leishmania amazonensis*, we obtained an IC50 of 54.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for BF-CA and 8.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for BFI, which exhibited toxicity at almost all concentrations tested. When evaluating the inhibition of proteases, BFI inhibited 44.66% of the activity of commercial pepsin protease and inhibited 40% of the serine protease secreted by *L. amazonensis*, LSP III. **Conclusion:** Therefore, BF-CA has a composition rich in flavonoids, with proven leishmanicidal action in promastigote and amastigote forms, evidenced by the reduction of infection. As for BFI, it inhibited the activity of the serine protease secreted by *L. amazonensis* (LSP III), making it a potential therapeutic target, as it is capable of interfering in the pathophysiology of leishmaniasis

Keywords: Anti-*Leishmania*. Flavonoids. Protease inhibitors. Serine Protease.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formas evolutivas da *Leishmania* sp. (A) forma promastigota. (B) forma amastigota. (c) esquema estrutural, ilustrativo. Fonte: adaptado de Martins, 2016; Rey, 2011, respectivamente. 16
- Figura 2.** Ciclo biológico da leishmania. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2017. 1. Os flebotomíneos injetam as promastigotas metacíclicas ao ingerirem o sangue no hospedeiro vertebrado. 2. As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleadas. 3. As promastigotas se transformam em amastigotas dentro do macrófago. 4. As amastigotas se multiplicam por divisão simples em vários tecidos e infectam outras células. 5. Os flebotomíneos são infectados ao ingerirem amastigotas durante a picada. 6. As amastigotas se multiplicam no flebotomíneo e rompem as células. 7. As amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do flebotomíneo. 8. As promastigotas realizam divisão binária e migram para a probóscide. 20
- Figura 3.** Plantas do gênero *Bauhinia*. (A) *Bauhinia x Blakeana dunn*. (B) *Bauhinia tomentosa*. (C) *Bauhinia purpúrea*. (D) *Bauhinia galpinii*. 27
- Figura 4.** Distribuição geográfica mundial de *Bauhinia forficata* link. Os países onde a espécie *Bauhinia forficata* é encontrada são mostrados em tons de verde, variando da tonalidade mais clara (grau 1) para a mais escura (grau 5) de acordo com o grau de ocorrência. Fonte: adaptado de <https://www.tropicos.org/name/13027281>. Acesso em: 12 de agosto de 2020. 29
- Figura 5.** Flores (a), espinhos (b) e folha (c) de *Bauhinia forficata* link. Fonte: <https://www.flickr.com/photos/>; <https://www.oficinadeervas.com.br/busca/diabetes>. Acesso em: 24 de novembro de 2020. 29
- Figura 6.** Análise em SDS-PAGE do perfil de proteínas do extrato aquoso do caule de *B. forficata* (BF-CA) em condições de redução, corado com Azul de Coomassie. A - padrão de peso molecular; B - BF-CA, A.1 análise densitométrica do padrão de peso molecular; A.2 análise densitométrica do BF-CA. 45

Figura 7. Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato aquoso do caule de <i>B. forficata</i> (BF-CA).	47
Figura 8. Cromatograma obtido por HPLC-PDA (254 nm) para o extrato aquoso do caule de <i>B. forficata</i>	48
Figura 9. a região do UV para padrões de A) ácido gálico, B) quercetina. O pico II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e ao pico I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B.	49
Figura 10. Estrutura de um flavonol com anel benzoil e cinamoil.....	49
Figura 11. Estrutura das substâncias identificadas no extrato aquoso de <i>B. forficata</i> Link.....	50
Figura 12. Isolamento do inibidor de pepsina (aspártico protease) de BF-CA por cromatografia de afinidade em pepsina-sepharose.....	52
Figura 13. SDS-PAGE a 15 % em condições não-redutoras e impregnado por prata. A) Padrão de peso molecular; B) BFI.....	53
Figura 14. Inibição da atividade das proteases de referência pelo BFI.	54
Figura 15. Percentual de hemólise do BF-CA e BFI em eritrócitos de carneiro. A porcentagem de hemólise foi avaliada em várias concentrações de BF-CA (A) e BFI (B) em eritrócitos de carneiro. Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação o controle positivo (Triton x-100 a 1%).....	55
Figura 16. Percentual de citotoxicidade e curva dose- resposta do BF-CA, BFI e pentamidina em células RAW. A citotoxicidade foi avaliada em várias concentrações de BF-CA (A), BFI (C) e Pentamidina (E) em células de linhagem RAW. Também foi analisada a curva dose-resposta (B) do extrato, do inibidor (D) e do fármaco utilizado como controle positivo (F), no qual reduz 50% da viabilidade dos macrófagos em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95%). Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata e duplicata.	57
Figura 17. Taxa de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após injeção com o extrato aquoso do caule de <i>Bauhinia forficata</i> Link. As diferenças foram consideradas	

significativas quando $p < 0,05$ (Teste Kaplan-Meier e Teste Log-Rank [Mantel-Cox]).

.....58

Figura 18. Avaliação da sobrevivência de *T. molitor* após injeção do BF-CA. Foi inoculado 10 μL do BF-CA entre o 4º e 5º metâmero, no sentido da calda a cabeça, na porção ventral. Foi observado durante sete dias as larvas mortas e vivas, retirando sempre os mortos. A melanização escura são características do estresse ocorrido. 14

Figura 19. Concentração inibitória mínima do BF-CA sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Foi avaliada a citotoxicidade de várias concentrações do BF-CA (A). Também foi analisada a curva dose-resposta (B) do extrato, no qual inibiu 50% da proliferação celular em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95%). Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação a pentamidina®.....61

Figura 20. Citotoxicidade do inibidor BFI nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. Foi avaliada a citotoxicidade de várias concentrações do inibidor (100; 50; 25; 12,6; 0,26; 3,126; 1,5625 $\mu\text{g/mL}$). Também foi analisada a curva dose-resposta (B) inibidor, no qual inibiu 50% da proliferação celular em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95%). Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação a pentamidina®.62

Figura 21. Atividade anti-Leishmania, sobre formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, do BF-CA, BFI e Pentamidina. Taxa de infecção (A); Determinação da porcentagem de amastigotas por macrófagos (B), e imagens por microscopia de luz comum de macrófagos sem leishmania ($M\emptyset$), macrófagos infectados ($M\emptyset + L$), tratados com pentamidina (Penta - 5 $\mu\text{g/mL}$), ou extrato (BF-CA) ou com inibidor (BFI). Os resultados correspondem a médias \pm EP, de amostras individuais testadas em quintuplicatas. (*) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo penta e (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo BF-CA.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. IPs descritos que apresentam atividade contra <i>Leishmania</i>	25
Tabela 2. Fases móveis, reveladores e reagentes utilizados na CCD para identificação dos metabólitos secundários do BF-CA	36
Tabela 3. Rendimento de obtenção do extrato aquoso de <i>B. forficata</i>	44
Tabela 4. Classes de metabólitos encontrados no BF-CA através do teste de Matos	46
Tabela 5. Substâncias identificadas e os principais fragmentos do extrato aquoso de <i>B. forficata</i> obtidos por LC-ESI-IT/MS	50
Tabela 6. Rendimento da obtenção de inibidor de protease do extrato aquoso de <i>B. forficata</i> (BFi).....	52
Tabela 7. Concentração inibitória mínima do BF-CA sobre as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	60
Tabela 8. Dosagem de citocinas (pg/mL) de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com BF-CA (60 pg/mL), BFI (50pg/mL), Pentamidina (5pg/mL) e controles infectados e não infectados	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOET	Acetato de Etila
ATP	Adenosina Trifosfato
BBI	Inibidores de Bowman-Birk
BF-CA	Extrato Aquoso do Caule de <i>Bauhinia forficata</i>
BFI	Inibidor de aspártico protease do extrato aquoso de caule de <i>B. forficata</i>
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CCD	Cromatografia de Camada Fina
CC50	Concentração citotóxica para 50% de células
IC50	Concentração inibitória para 50% dos microrganismos
CDC	Disease Control and Prevention
CLAE-PDA	Cromatografia de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DCM	Dicloro metano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Classificação de Enzimas
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
GTP	Trifosfato de guanosina
HEX	Hexano
HIV	Vírus de Imunodeficiência Adquirida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IPs	Inibidores de Proteases
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LDPK	Leishmaniose Dermal Pós Calazar
LIF	Laboratório de Imunofisiologia
LMC	Leishmaniose Monocutânea
LSP-III	Serina Protease de <i>Leishmania</i> tipo III

LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MTT	(3-(4,5,-dimethylthiazol2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PAD	Detector de Arranjo Fotodiodos
PBS	Tampão Fosfato Salina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
SDS	Dodecil- sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UV	Ultra Violeta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 A <i>Leishmania</i> e as leishmanioses	16
2.2 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	18
2.3 Tratamento da leishmaniose	20
2.4 Inibidores de proteases (IPs) e proteases de <i>Leishmania amazonensis</i>	22
2.5 Plantas medicinais na terapêutica da leishmaniose	25
2.6 Plantas do gênero <i>Bauhinia</i>	26
2.6.1 <i>Bauhinia forficata</i> Link	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Coleta do material	32
4.2 Preparação do extrato	32
4.4.2 Determinação dos teores de flavonoides totais.....	36
4.4.3 Análise do extrato bruto por cromatografia líquida de alta eficiência	36
4.4.4 Análise por cromatografia de camadas delgada acoplada à espectrometria de massas.....	37
4.5 Cromatografia de afinidade em pepsina-sepharose para isolamento do inibidor de pepsina (aspártico protease) proveniente de BF-CA.....	37
4.6 Ensaios citotóxicos com extrato de <i>Bauhinia forficata</i>	38
4.6.1 Ensaios de hemólise com eritrócitos de carneiro	38

4.6.2 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> (Células RAW).....	39
4.6.3 Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i> (<i>Tenebrio molitor</i>).....	39
4.7 Ensaios de inibição do extrato de <i>B. forficata</i> e do inibidor de proteases.....	40
4.7.1 Inibição das proteases de referência	40
4.8 Atividade leishmanicida	40
4.8.1 Parasitos	40
4.8.1.1 Fracionamento dos parasitos.....	41
4.8.1.2 Isolamento das serino proteases de <i>Leishmania</i>	41
4.8.1.3 Inibição das serino proteases de <i>Leishmania amazonensis</i>	41
4.9 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.2.1 Prospecção dos constituintes químicos (Protocolo de Matos, 1997) e análise do extrato aquoso de <i>B. forficata</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	46
5.3 Isolamento e caracterização parcial do inibidor de proteases de BF-CA	51
5.4 Ensaios citotóxicos com extrato de <i>Bauhinia forficata</i> e inibidor de protease .	54
5.4.2 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> (Células RAW).....	55
5.4.3 Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i> (<i>Tenebrio molitor</i>).....	58
5.5 Atividade leishmanicida	60
5.5.1 Atividade antipromastigota do BF-CA e BFI.....	60
5.5.2 Atividade leishmanicida contra amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	63
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICE	78
ANEXO.....	100

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial, que fazem parte do grupo de doenças infecciosas negligenciadas. Nas Américas, as leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e cerca de 21 espécies produzem formas clínicas que afetam a pele, as membranas, mucosas e as vísceras, sendo transmitidas aos seres humanos e a animais vertebrados, através da picada de insetos vetores do gênero *Lutzomyia*. Nas Américas é caracterizada como uma zoonose, que apresenta diferentes padrões de transmissão, sendo o ciclo silvestre o principal da leishmaniose cutânea e o urbano da leishmaniose visceral. A transmissão do parasito também pode ocorrer de homem a homem por transfusões de sangue contaminado e uso de seringas contaminadas (OPAS, 2019).

No Brasil as espécies que causam leishmaniose tegumentar americana em humanos, são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Já a espécie que causa a leishmaniose visceral (LV), no território brasileiro, é a *Leishmania (Leishmania) chagasi* e sua transmissão ocorre, principalmente, pela picada do inseto vetor, *Lutzomyia longipalpis* (LIMA CUNHA, 2018).

Para o tratamento da leishmaniose, a droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente (Sb5+), com exceção para os pacientes coinfectados com HIV e gestantes. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e o isotiocianato de pentamidina (BRASIL, 2017). A taxa de cura clínica com Sb5+ varia de 60% a 90% (CARVALHO *et al.*, 2019).

Mesmo sendo uma droga utilizada há anos, o mecanismo de ação do antimônio pentavalente ainda não está completamente elucidado, acredita-se que iniba a via glicolítica do parasito, reduzindo a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e, por ser derivado de um metal pesado, apresenta propriedades tóxicas e químicas comparados aos outros metais pesados, sendo um inibidor enzimático irreversível e inespecífico (SINHORIN *et al.*, 2020).

Entretanto, a descoberta de propriedades terapêuticas ativas de extratos vegetais tem despertado grande interesse na investigação de novas opções de tratamento das leishmanioses baseadas em plantas medicinais (LIMA *et al.*, 2015). E

dentre essas propriedades, encontram-se os inibidores de proteases (IPs), que possuem diferentes funções como regular a atividade de proteases endógenas, participar da defesa contra os ataques de insetos e predadores, e impedir infecções por microrganismos patogênicos (COLARES et al., 2017).

As proteases de *Leishmania* são essenciais para a manutenção da vida e da infecção provocada por estes parasitos (SILVA-LÓPEZ & DE SIMONE, 2004 a, b; SILVA-LÓPEZ et al., 2005; SILVA-LÓPEZ et al., 2007; SILVA-LÓPEZ et al., 2010 a), dessa forma, constituem potenciais alvos quimioterápicos para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas mais específicas, baseadas na atividade inibidora de proteases. Por isso, os IPs obtidos de plantas parecem ser opções terapêuticas com menor custo e menos tóxicas para seus hospedeiros (SILVA-LÓPEZ, 2010 b; SILVA-LÓPEZ, 2012; VASCONELOS, 2015).

Sendo assim, a pesquisa elencou a hipótese de que o extrato de *B. forficata* bem como seu inibidor isolado apresentam atividade leishmanicida contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A *Leishmania* e as leishmanioses

O parasito se apresenta basicamente sob duas formas evolutivas: amastigota e promastigota (Figura 1). As amastigotas têm morfologia aproximadamente esférica, ovoide ou fusiforme, ausência de flagelo externo, o núcleo é relativamente grande e redondo, e cinetoplasto bem visível em preparações microscópicas. O diâmetro médio das amastigotas é 1,5 a 3,0 x 3,0 a 6,5 μm .

A forma promastigota, encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, é flagelada, corpo lanceolado longo e pavimentoso com presença de cinetossomo (corpo celular), cinetoplasto em forma de bastão localizado na região anterior próximo à saída do flagelo. O diâmetro do corpo é muito variável, sendo 10,0 a 40,0 x 1,5 a 3,0 μm ; com relação ao flagelo, o mesmo tem comprimento igual ou superior ao corpo do parasito (NEVES, 2011; REY, 2011).

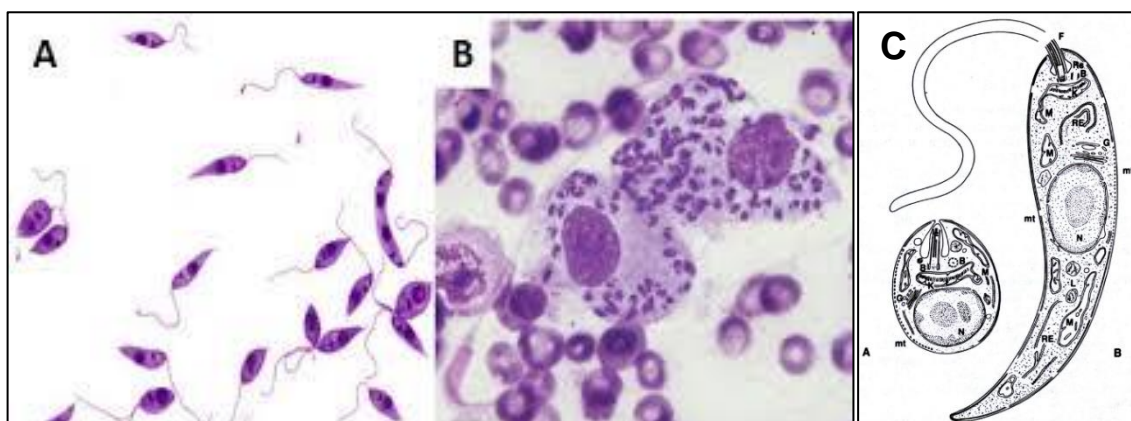


Figura 1. Formas evolutivas da *Leishmania* sp. (A) forma promastigota. (B) forma amastigota. (c) esquema estrutural, ilustrativo. **Fonte:** adaptado de Martins, 2016; Rey, 2011, respectivamente.

Dessa forma, o gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas, com um ciclo de vida digenético, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores para que assim complete o seu ciclo de vida, sendo o vetor responsável pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro (KAYE; SCOTT, 2011, READY, 2013).

A leishmaniose é uma doença tropical considerada uma das seis doenças mais importantes da lista da Organização Mundial de Saúde (OMS) / Pesquisa de Doenças Tropicais. E essa patologia afeta principalmente regiões mais escassas de recursos,

sendo considerada, por este motivo, uma doença associada à pobreza, estimando-se entre 700.000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes anualmente (OMS, 2020).

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), 17 dos 18 países endêmicos das Américas reportaram um total de 989.096 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) no período de 2001-2018, com uma média anual de 54.950 casos e uma tendência decrescente.

E quanto a leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave da doença, foram registrados 63.331 casos novos no mesmo período, com média anual de 3.518 casos. Em 2018, 97% (3.466) do total de casos foram reportados pelo Brasil e os demais por Argentina, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Paraguai, Venezuela e Uruguai (OPAS, 2019).

As leishmanioses causam considerável morbidade e mortalidade, tal nome é dado a doenças com diversas manifestações clínicas (PEARSON; SOUZA, 1996). A LV é a forma mais letal e se não tratada ocasiona óbito. Outras espécies de *Leishmania* causam a LC e LMC, que não são fatais, mas são responsáveis pela considerável morbidade de um grande número de pessoas nos focos endêmicos (SILVA, 2016).

Também tem a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), que é a forma invasiva da LT, e é caracterizada clinicamente pela presença de nódulos e placas não ulceradas em diversas partes do corpo, sendo essa forma um grande desafio ao tratamento, com recidivas constantes (CARVALHO, 2019).

Atualmente, 54 espécies de *Leishmania* são conhecidas e pelo menos 21 delas são patogênicas para humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016). As formas promastigotas são transmitidas para os vertebrados pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas e os canídeos, roedores, marsupiais, mangustos, morcegos e hyraxes são as principais fontes de infecção ou hospedeiros primários (AKHOUNDI *et al.*, 2017).

A LV é frequentemente causada por *L. donovani* na Índia e na África, *L. infantum* no Mediterrâneo e *L. chagasi* na América Latina. Ocasionalmente, espécies causadoras da LC (*L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. major*) são isoladas em pacientes com a forma visceral clássica. Após o reestabelecimento da LV, podem aparecer lesões de pele crônicas denominadas de leishmaniose dermal pós-calazar

(LDPK), que se apresenta como pápulas ao redor da boca e eventualmente se espalha por grandes áreas do corpo (VEERAREDDY; VOBALABOINA; ALI, 2009).

A LC é a forma clínica mais frequente e é classicamente dividida nas formas do Novo e do Velho Mundo. A LC do Novo Mundo é endêmica nas Américas do Sul e Central e é primariamente causada por membros do complexo mexicana (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*) e do complexo braziliensis (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*). No Brasil, as principais espécies que causam a leishmaniose tegumentar são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. O espectro da doença varia de uma úlcera cutânea simples e localizada na LC e nódulos disseminados na LCD ao envolvimento mucocutâneo como na LMC e até mesmo ao envolvimento visceral (SILVA-LÓPEZ, 2010).

LC do Velho Mundo é frequentemente causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopia* e ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia menor, na Bacia do Mediterrâneo, Índia, China e África. A lesão clássica é única, crônica e ulcerativa. A LC pode evoluir para LCD e começa tipicamente como pápulas localizadas e não ulceradas e as amastigotas disseminam-se pela pele e produzem nódulos cutâneos na face e extremidades. É uma forma rara, variante anérgica da LC e, no Brasil, tem sido associada com as infecções causadas por *L. amazonensis* (SILVA-LÓPEZ, 2010).

2.2 Ciclo biológico da *Leishmania*

A *Leishmania* apresenta ciclo biológico digenético, necessitando de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado para conclusão de seu ciclo. No inseto, os protozoários estão localizados no tubo digestivo, no qual as amastigotas no intestino do flebotomíneo são modificadas em promastigotas, as quais são capazes de realizar divisões celulares (divisão binária) ocorrendo a multiplicação dos parasitos ingeridos.

Em grande quantidade, as formas promastigotas chegam ao proventrículo do inseto e se transformam em promastigotas metacíclicos sem capacidade de divisão binária e alta infectividade.

Quando a fêmea de flebotomíneo precisa realizar repasto sanguíneo para maturação dos ovos, inocula no local da picada as promastigotas metacíclicas de *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado. Nos vertebrados, as células infectadas pela

Leishmania são os macrófagos ou outras células do sistema fagocítico mononuclear de pele, vísceras e medula óssea (ROQUE; JANSEN, 2014).

Os vetores de transmissão das leishmanioses estão classificados na família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*. No mundo, são descritas 1026 espécies (994 atuais e 32 fósseis), nas Américas são 546, das quais 529 são atuais e 17 fósseis (GALATI, 2019), sendo 266 delas de ocorrência no Brasil (GALATI, 2019). No entanto, apenas cerca de 10% dessas espécies são transmissoras ou suspeitas de transmitirem os agentes causadores das leishmanioses (CIPA GROUP, 1999; MAROLI *et al.*, 2013).

A saliva do inseto é anticoagulante, vasodilatadora e impede a agregação de plaquetas, favorecendo o fluxo de sangue e linfa intersticial para o inseto. Além destes efeitos, sabe-se que fatores presentes na saliva de flebotomíneos têm ação quimiotática para monócitos e imunorregulador, com capacidade de interagir com os macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo a ação efetora destas células na destruição dos parasitos. A saliva de *Lutzomyia longipalpis* contém o mais potente vasodilatador conhecido, o *maxidilan*, que além disso, parece ser responsável pela maioria dos efeitos imunomodulatórios da saliva deste inseto sobre a célula hospedeira, durante a transmissão de *Leishmania* (NEVES, 2005).

O sistema imune inato, que é a primeira linha de defesa do organismo representado pelas células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente os macrófagos, reconhece imediatamente a presença do protozoário e o fagocita. Dentro da célula hospedeira forma-se o vacúolo parasitóforo onde ocorre a diferenciação de promastigotas em amastigotas.

A forma amastigota, menor e aflagelada, realiza várias divisões binárias, proliferando de maneira significativa, que causa a lise celular, liberando essas amastigotas que são conseqüentemente expostas e fagocitadas por outros macrófagos, continuando assim a multiplicação do parasito no tecido do vertebrado. Ocasionalmente, outro flebotomíneo pode realizar o repasto sanguíneo neste vertebrado e, ser contaminado, reiniciando o ciclo em outro hospedeiro vertebrado (NEVES, 2005) (Figura 2).

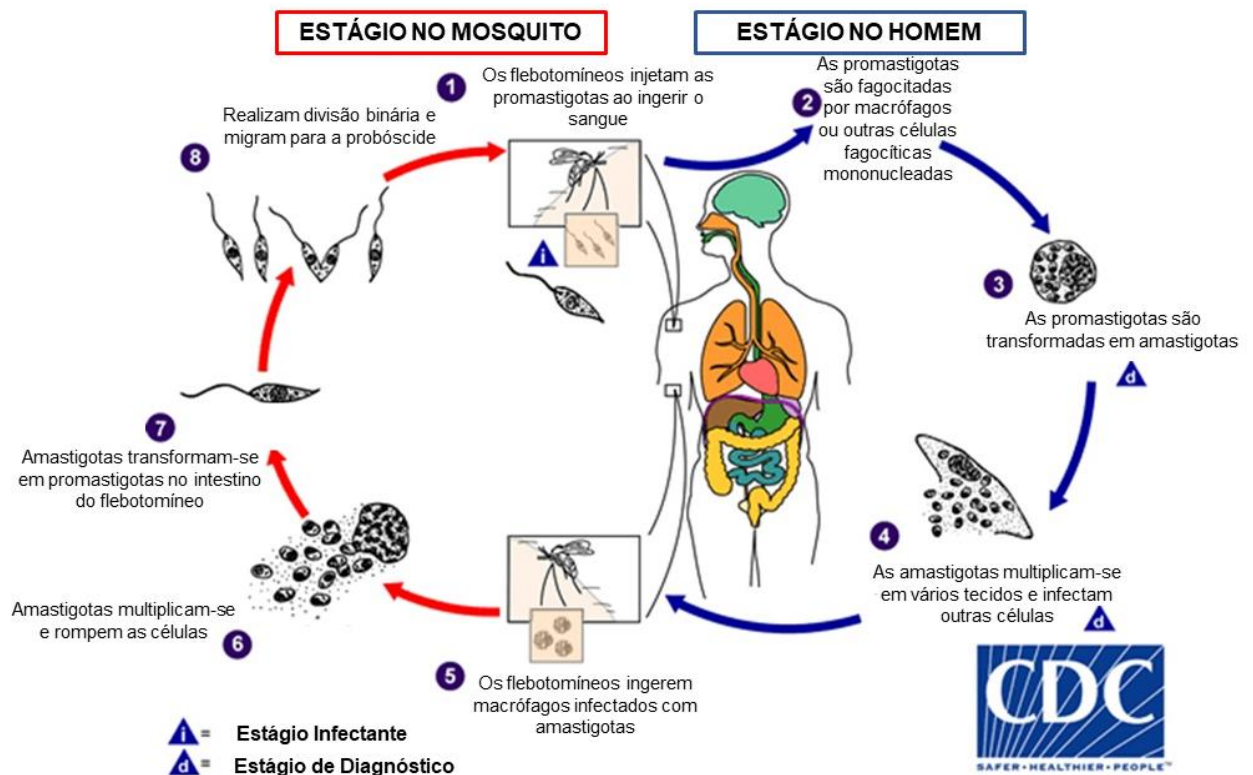


Figura 2. Ciclo biológico da leishmaniose. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2017. 1. Os flebotomíneos injetam as promastigotas metacíclicas ao ingerirem o sangue no hospedeiro vertebrado. 2. As promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleadas. 3. As promastigotas se transformam em amastigotas dentro do macrófago. 4. As amastigotas se multiplicam por divisão simples em vários tecidos e infectam outras células. 5. Os flebotomíneos são infectados ao ingerirem amastigotas durante a picada. 6. As amastigotas se multiplicam no flebotomíneo e rompem as células. 7. As amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do flebotomíneo. 8. As promastigotas realizam divisão binária e migram para a probóscide.

2.3 Tratamento da leishmaniose

Os medicamentos de escolha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose têm sido há mais de 60 anos, os antimoniais pentavalentes. O primeiro derivado de antimônio foi um sal de antimônio trivalente, conhecido como tártaro emético. Alguns anos depois, na Itália, este composto foi utilizado no tratamento do calazar, a forma visceral da doença. Devido à toxicidade elevada e os graves efeitos colaterais associados ao seu uso, os antimoniais trivalentes foram logo substituídos por formulações contendo antimônio pentavalente (Sb^{5+}) (SILVA, 2017).

Em geral, a primeira linha de medicamentos utilizada no tratamento contra a leishmaniose se baseia no uso dos antimoniais pentavalentes complexados a

carboidratos, o antimoniato de metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) (VASCONCELOS, 2015).

Com relação ao mecanismo de ação, foi proposto que esses quimioterápicos atuam no parasito pela indução do efluxo de glutathione (GSH) e tripanotona (T[SH]₂) e a inibição da atividade da enzima tripanotona redutase (TryR) (WYLLIE *et al.*, 2004). Mesmo sendo uma droga utilizada há anos, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, acredita-se que iniba a via glicolítica do parasito, reduzindo a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e, por ser um metal pesado, apresenta propriedades tóxicas e químicas comparados aos outros metais pesados, sendo um inibidor enzimático irreversível e inespecífico (SINHORIN *et al.*, 2020).

Sabe-se ainda que a conformação (Sb⁵⁺) é inativa e que em macrófagos é convertida para a forma ativa (Sb III), estas inibem a atividade glicolítica das amastigotas, sendo esta inibição acompanhada por uma inibição dose-dependente na produção de ATP e trifosfato de guanosina (GTP) (PETITTI; VANNI; BARRESI, 2008; ROYCHOUDHURY; SINHA; ALI, 2011). Sugere-se também que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente após a administração, e que assim possa interferir no processo de β-oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando à uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BALAÑA *et al.*, 1998; ROBERTS *et al.*, 1998).

No Brasil, o antimoniato de meglumina, é a droga de primeira escolha, e portanto, a mais utilizada na maioria dos casos, enquanto que a forma lipossomal da anfotericina B e o isotianato de pentamidina são drogas de segunda escolha, para casos mais graves, ou quando há falha terapêutica de antimoniais (BRASIL, 2014). Os medicamentos utilizados para tratar a leishmaniose desencadeiam uma série de efeitos colaterais, que incluem a resistência do parasito e reações adversas tais como cardionefrotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, podendo levar o hospedeiro a morte. Outro fator importante, é que todos os fármacos disponíveis são administrados por via parenteral, necessitando da colaboração do paciente, o que gera muito abandono do tratamento, fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes (SILVA- LOPEZ, 2019).

A pentamidina é uma diamina aromática que tem alta eficácia como fármaco de segunda linha em pacientes não responsivos à terapia antimonial (CORREIA, *et al.*, 1996; BRYNCETON, 2001). O medicamento é administrado por via intravenosa

ou intramuscular profunda que também apresenta vários efeitos indesejáveis, sendo os mais comuns, dor e abscessos estéreis no local de aplicação, náuseas, vômitos, dores musculoesqueléticas, cefaleia, hipotensão, lipotimia, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Há relatos de cardiotoxicidade grave, porém seu efeito tóxico mais importante é o desenvolvimento de diabetes insulino dependente que pode se manifestar a partir da administração total de 1g. (BRASIL, 2003; SUNDAR, 2011).

A utilização de miltefosina® por via oral, na Índia, tem obtido resultados promissores para o tratamento de leishmaniose. Todavia, seu emprego é limitado pela sua toxicidade e a possibilidade de permanecer em níveis subterapêuticos no plasma do paciente durante algumas semanas, o que poderia levar ao surgimento de resistência parasitária (CUNHA, 2016). Este medicamento para ter sucesso precisa ser administrado em associação com outros fármacos. Contudo, o medicamento ainda não teve seu uso regulamentado no Brasil, mas já foi usada em dois estudos de LC na Bahia (MACHADO *et al.*, 2010) e no Amazonas (CHRUSCIAK-TALHARI *et al.*, 2011), que demonstraram que o uso de miltefosina foi mais seguro e com maior taxa de cura quando comparado com o antimonialo.

A anfotericina B é um antifúngico utilizado como segunda escolha para o tratamento de leishmaniose, desencadeando diversos efeitos colaterais, sendo a nefrotoxicidade uma das principais complicações. E, uma nova formulação da anfotericina B, na forma lipossomal vem sendo indicada para pacientes com leishmanioses visceral grave que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o tratamento com do Glucantime, entretanto, a anfotericina B lipossomal apresenta um custo elevado (BRASIL, 2014).

Passarini (2017) ressalta que a leishmaniose é a única doença tropical tratada com drogas que originalmente não foram desenvolvidas para este fim. Além disso, seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados, e a maioria das pesquisas é financiada para ensaios clínicos são substâncias já utilizadas para tratar a doença, o que justifica a procura por novas alternativas no tratamento das leishmanioses.

2.4 Inibidores de proteases (IPs) e proteases de *Leishmania amazonensis*

O tratamento atual das leishmanioses que inclui os antimonialos, anfotericina B e pentamidina, têm efeitos colaterais graves, como mencionado anteriormente. O alto

custo desses medicamentos e do tratamento parenteral resultou em redução da adesão à terapia, estimulando ao desenvolvimento de novas opções para o controle da doença (ALVES *et al.*, 2017).

Ainda não existem vacinas eficazes para as leishmanioses humanas e, o controle da doença baseia-se na quimioterapia e no controle do vetor. Apesar do tratamento das leishmanioses ser o mesmo, os antimoniais pentavalentes, a mais de 70 anos nenhum dos medicamentos disponíveis são bons pela grande toxicidade, tratamento a longo prazo, alto custo e administração invasiva. Portanto, há uma necessidade urgente de novos compostos com efeito leishmanicida significativo e baixa toxicidade para o hospedeiro (SILVA-LÓPEZ, 2012).

O estudo de proteases de *Leishmania* têm evidenciado que essas enzimas desempenham funções importantes na fisiologia desses organismos, bem como na patologia, e que a inibição dessas enzimas por inibidores específicos pode constituir importante estratégia para a produção de potentes agentes antiparasitários (COOMBS; MOTTRAN, 1997).

Os IPs podem ser genericamente classificados de acordo com sua estrutura em dois grupos: inibidores de baixo peso molecular e inibidores peptídicos com uma ou mais cadeias polipeptídicas. A maioria dos IPs naturais são polipeptídeos, apenas alguns microrganismos secretam pequenos compostos peptideomiméticos ou não-peptídicos que bloqueiam a atividade das proteases de seus hospedeiros. Os IPs, sintéticos ou naturais, têm sido empregados, com grande êxito, no tratamento de algumas enfermidades, tais como enfisema pulmonar, epilepsia, doenças hepáticas e reumáticas, virais dentre outras (SILVA-LÓPEZ, 2009).

Tradicionalmente as proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas ou peptídeos, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres. Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas (EC), as peptidases pertencem à classe 3 e subclasse 3. que ainda está dividida em dois grandes grupos: as exo e as endopeptidases (BARRET, 1994).

Existe ainda a classificação de acordo com a protease que inibem. Sendo assim, Colares *et al.*, (2016) afirmam que proteases possuem seus inibidores subdivididos em 16 classes, entretanto, destacam-se: os inibidores de tripsina do tipo

Kunitz, os inibidores de Bowman-Birk (BBI) e os inibidores presentes na batata do tipo I e II.

Dentre as classes de proteases que são descritas na *Leishmania*, atualmente foram descritas quatro: cisteíno, serino, aspártico e metaloprotease (ALMEIDA *et al.*, 2014). Dentre estas, as cisteíno-proteases são as mais investigadas em *Leishmania* e muitas delas possuem suas sequências depositadas em bancos de dados e seus genes isolados. São enzimas que pertencem ao subgrupo A e superfamília das proteases semelhantes à papaína (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Quanto as serino proteases, atualmente existem três tipos que diferem de outras serino proteases isoladas de *Leishmania* (SILVA-LOPEZ; DE SIMONE, 2004; SILVA-LOPEZ; PINTO COELHO; DE SIMONE, 2005). A primeira serina protease identificada é solúvel em detergente (LSP-I) e apresenta atividade máxima na temperatura de 28°C em um pH 7, sendo sensível a variações de temperatura. A segunda serino protease solúvel (LSP-II) também apresenta atividade ótima em 28°C, porém com distinta localização celular (MORGADO-DIAZ *et al.*, 2005). A terceira serino protease (LSP-III) foi purificada do sobrenadante de cultura de promastigotas de *L. amazonensis* e apresenta uma boa estabilidade térmica.

Em amastigotas, a enzima também foi encontrada em estruturas eletrodensas correspondendo a megassomos, sítios de atividade proteolítica em *Leishmania* envolvidos em processos de diferenciação e sobrevivência intracelular (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2002). Podemos então concluir que a LSP-III é uma enzima secretada, podendo estar, portanto, associada à virulência e/ou patogenicidade. Além disso, o fato de essa enzima estar colocalizada em megassomas com outras proteases poderá possibilitar a compreensão do tráfego intracelular de material proteico, evento fundamental para manter o ciclo de vida do parasito (SILVA-LOPEZ & DE-SIMONE, 2004).

Alguns IPs com atividade anti-*Leishmania* foram descritos e são mostrados na tabela 1 (Machado *et al.*, 2019).

Inibidor	Protease Alvo	Concentração <i>in vitro</i> (IC ₅₀ ¹)	Espécie de <i>Leishmania</i>	Efeitos adversos
<i>Coccinia grandis</i>	Serino	promastigota-308µg/mL	<i>L. donovani</i>	ND*
Tubérculo de batata	Serino	promastigota-312.5 µg /mL Amastigotas-82.3 µg/mL	<i>L. donovani</i>	Atóxico para macrófagos murinos até 2,5 mg/mL
aziridina-2,3-dicarboxilato)	catepsina B (cisteíno)	Promastigota-37.4 µM Amastigota-2.3 µM	<i>L. major</i>	Não afetado
benzofenona derivado	Cisteíno	Amastigota- 74.4 µM	<i>L. amazonensis</i>	Mácrofagos murinos -CC50 = 496,1 µM
Au2Phen (complexo com ouro)	Cisteíno	Amastigota- 3.17 µM	<i>L. infantum</i>	Fibroblasto humano -IC ₅₀ = 2,16 µM
AubipyC (complexo com ouro)	Cisteíno	Amastigota- <0.25 µM	<i>L. infantum</i>	Fibroblasto humano-IC ₅₀ =0.42 µM
MDL 28170 (dipeptidil aldeído)	Calpain (cisteíno)	Promastigota- 23.3 µM	<i>L. amazonensis</i>	ND*
Hirudin	GP63	Promastigota-0.6 µM Amastigota-0.43 µM	<i>L. tropica</i>	Mácrofagos humano-CC50)= 860.11µg/mL
DAN*	Aspártico	Promastigota- 22 µM	<i>L. Mexicana</i>	ND*
Nelfinavir	Aspártico	Promastigota- 14.05 µM	<i>L. infantum</i>	ND*
Saquinavir	Aspártico	Promastigota 55.12 µM	<i>L. infantum</i>	ND*
Nelfinavir	Aspártico	Promastigota- 9.85 µM	<i>L. Mexicana</i>	ND*
Saquinavir	Aspártico	Promastigota- 42.8 µM	<i>L. Mexicana</i>	ND*
Indinavir	Proteossoma	Promastigota- 8.3 µM	<i>L. major</i>	ND*
Saquinavir	Proteossoma	Promastigota- 7.0 µM	<i>L. major</i>	ND*
GNF5343 (azabenzoxazo)	Proteossoma	Amastigota- 7.3 µM	<i>L. donovani</i>	ND*
GNF6702 (azabenzoxazo)	Proteossoma	Amastigota- 18 nM	<i>L. donovani</i>	Não inibe enzima de mamífero

Tabela 1. IPs descritos que apresentam atividade contra *Leishmania*

*IC₅₀: concentração inibitória de 50% de crescimento parasitário

*DAN: éster diazo-acetilnorleucinometílico

*ND: não determinado

Fonte: Machado *et al.*, (2019).

2.5 Plantas medicinais na terapêutica da leishmaniose

Historicamente, o uso de plantas com finalidade terapêutica é registrado desde os primórdios da humanidade. No tratamento das doenças, as plantas podem ser utilizadas de diferentes formas: *in natura*, pulverizadas, extratos brutos ou frações enriquecidas, extratos padronizados, tinturas e outros, ou podem passar por vários processos de extração e purificação para isolamento de uma substância específica. A

planta medicinal, quando passa por um preparo e seu derivado é incorporado a uma formulação específica, torna-se um medicamento fitoterápico (CUNHA, 2016).

Existem pesquisas com várias espécies de plantas demonstrando extratos, frações e princípios ativos com atividade leishmanicida contra todas as espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem (CHOUHAN *et al.*, 2015). O mecanismo de ação para alguns compostos com atividade leishmanicida já foram elucidados, sendo demonstrados alvos importantes, como a tripanotiona redutase, DNA topoisomerase I, a via de apoptose, entre outros (PASSARINI, 2017). Dessa forma, entende-se a importância de investigar substâncias ativas que possam dar origem a novos medicamentos para o tratamento das leishmanioses. Neste caso, as espécies vegetais podem representar uma alternativa muito promissora para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicida (CUNHA, 2016).

Como o presente trabalho visa estudar a atividade IP de um extrato aquoso de caule da leguminosa *Bauhinia forficata* na viabilidade de *L. amazonensis*, alguns aspectos botânicos, moléculas isoladas, bem como atividades biológicas de algumas espécies do gênero *Bauhinia* e da espécie *forficata* serão abordados nos tópicos seguintes.

2.6 Plantas do gênero *Bauhinia*

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as do gênero *Bauhinia*, as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies. É um gênero denominado por *Carolus Linnaeus*, em 1753, em homenagem ao botânico franco-suíço Gaspar Bauhin (SILVA-LÓPEZ; SANTOS, 2015). Muitas destas plantas são usadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul. Os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com estas espécies indicam que são constituídas principalmente de glicosídeos esteróidicos, triterpenos, lactonas e flavonóides (SILVA; FILHO, 2002).

O gênero *Bauhinia* está incluído na família *Leguminosae* ou *Fabaceae* de acordo com a lista de espécies da Flora do Brasil (VAZ, 2013). Esta família possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas. No Brasil ocorrem 200 gêneros e 1500 espécies (NOGUEIRA *et al.*, 2013). O gênero *Bauhinia*,

popularmente conhecidas como pata-de-vaca, unha-de-vaca, dentre outras denominações, possui aproximadamente 300 espécies com característica pantropical e no Brasil 200 espécies nativas foram catalogadas. As espécies de *Bauhinia* são detentoras de uma variedade de benefícios à saúde pelas suas propriedades medicinais. As folhas, caules e raízes, especialmente de *B. manca*, *B. megalandra*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha*, *B. racemosa* e *B. splendens* são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias doenças (MENEZES, 2007).

Menezes (2007), explica que o que caracteriza as plantas deste gênero, é o formato de suas folhas, que se parece muito com uma pata de vaca. Se por um lado esta característica torna fácil a sua identificação, também gera grande confusão, pois para a população todas estas espécies têm o mesmo nome popular de "pata-de-vaca", porém a composição química e as ações terapêuticas são distintas.

O potencial ornamental do gênero *Bauhinia* é reforçado ainda por outras espécies como: *B. galpinii* N.E. Br., *B. tomentosa* L., *B. purpurea* L. e *Bauhinia x blakeana* Dunn (Figura 3).

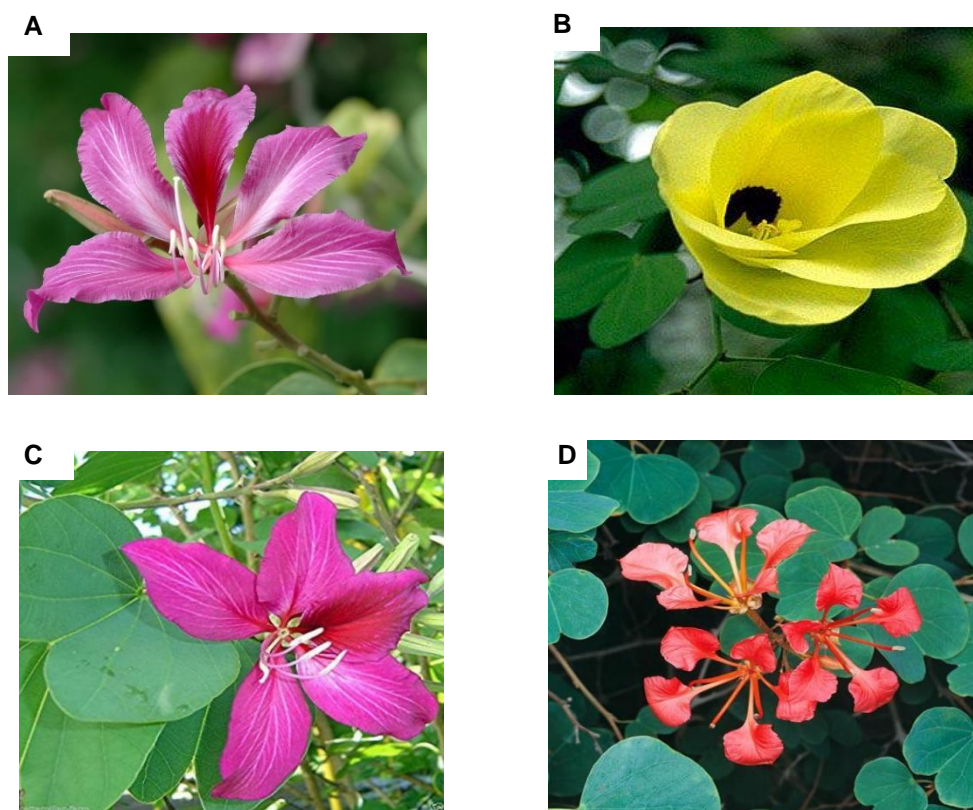


Figura 3. Plantas do gênero *Bauhinia*. (A) *Bauhinia x Blakeana dunn*. (B) *Bauhinia tomentosa*. (C) *Bauhinia purpúrea*. (D) *Bauhinia galpinii*.

Algumas espécies deste gênero foram e estão sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente e, com isto, muitos compostos foram isolados e identificados. Assim, diferentes classes de compostos orgânicos de interesse medicinal foram relatadas, incluindo lactonas, flavonóides, terpenóides, esteróides, triterpenos, taninos e quinonas (SILVA; FILHO, 2000).

No Brasil várias espécies de *Bauhinia* são usadas pela população como hipoglicemiante. As folhas são consideradas anti-diabéticas, diuréticas e hipocolesteremiantes, no tratamento de cistites, parasitoses intestinais e elefantíase (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000). Além disso, são atribuídas propriedades antifúngicas, antibacterianas e antidiabéticas. Outras espécies são utilizadas como alimentos (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Ademais dos metabólitos secundários de plantas do gênero *Bauhinia*, os IPs constituem uma importante classe de moléculas biologicamente ativas (SILVA-LÓPEZ; SANTOS, 2015). Os primeiros inibidores isolados foram do tipo tripsina e obtidos das espécies *B. petandra* e *B. bauhinoides* (OLIVA, 1986; OLIVA; SAMPAIO; SAMPAIO, 1988). Posteriormente foram isolados quatro outros inibidores de tripsina de *B. bauhinoides*: o BbTI-I, o BbTIII que inibe a calicreína pancreática (OLIVA *et al.*, 1999). Em sementes de *B. purpurea* foram obtidos dois inibidores de tripsina, o BpuTI com 20 kDa e estrutura primária muito semelhante com BbTI-I e BdTIII (SILVA LUCA *et al.*, 2010).

Mesmo que muitos IPs tenham sido identificados em várias espécies de *Bauhinia*, apenas uma única protease de 30 kDa foi identificada e caracterizada em folhas *B. forficata* (ANDRADE *et al.*, 2011; SILVA-LUCA *et al.*, 2013). Esta enzima chamada baupaína é uma cisteíno protease capaz de clivar o cininogênio de alto peso molecular humano e liberar bradiginina, que é um modulador potente do tônus da musculatura lisa de diversos órgãos (ANDRADE *et al.*, 2011; KAPLAN, 2014).

2.6.1 *Bauhinia forficata* Link

Bauhinia forficata Link caracteriza-se como uma árvore de porte pequeno, pertencente à família *Fabaceae*, que abrange mais de 300 espécies do gênero *Bauhinia*, é uma espécie nativa da América do Sul, com distribuição na Argentina, Bolívia, Paraguai, Peru, Uruguai e predominantemente no Brasil (Figura 4).

Sua importância está voltada para o seu largo uso popular para diversas finalidades terapêuticas. A infusão de suas folhas é utilizada como agente diurético, tônico e depurativo, mas se destaca por seu uso como hipoglicemiante, sendo inclusive conhecida como insulina vegetal (PEPATO *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2010; GASPARETTO, 2014).



Figura 4. Distribuição geográfica mundial de *Bauhinia forficata* link. Os países onde a espécie *Bauhinia forficata* é encontrada são mostrados em tons de verde, variando da tonalidade mais clara (grau 1) para a mais escura (grau 5) de acordo com o grau de ocorrência. Fonte: adaptado de <https://www.tropicos.org/name/13027281>. Acesso em: 12 de agosto de 2020.

A leguminosa *B. forficata* se assemelha muito com outras folhas de outras espécies do gênero *Bauhinia*, contudo sua principal característica morfológica é a presença de suas flores que são exclusivamente brancas e espinhos (Figura 5 A e B) (OLIVEIRA; SAITO, 1989). Ela possui dois espinhos no ramo onde fica aderido o pecíolo de cada folha, formando uma espécie de forca, dando origem ao nome.

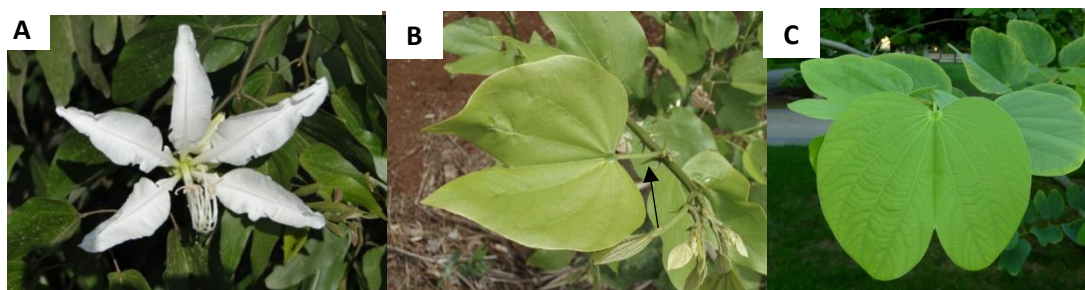


Figura 5. Flores (a), espinhos (b) e folha (c) de *Bauhinia forficata* link. Fonte: <https://www.flickr.com/photos/>; <https://www.oficinadeervas.com.br/busca/diabetes>. Acesso em: 24 de novembro de 2020.

É uma planta arbustiva, decídua, grande ou arbórea, perene, que atinge até 8m de altura. Tem ramos frágeis, pendulares, glabros ou pubescentes, com acúleos gêmeos na axila foliar. Folhas alternas, medindo de 8 a 9 cm de comprimento, ovais ou lanceoladas, divididas acima do meio, glabras, compostas de dois folíolos unidos pela base, pouco divergentes, obtusas ou um pouco agudas, ou acuminadas na base, arredondadas ou subcodiformes, membranáceas, com a forma típica de 9 nervos (Figura 5 C). Acúleos quase sempre gêmeos, ora uniformemente retos, ora ligeiramente curvos para dentro, finos ou grossos (SILVA-LÓPEZ; SANTOS, 2015).

Na medicina popular, a infusão das folhas desta espécie, é utilizada predominantemente no tratamento do *diabetes mellitus*, sendo ainda empregada como agente diurético, tônico, depurativo (PIZZOLATTI *et al.*, 2003). Além disso, no estudo realizado por Oliveira *et al.*, (2005) com *B. fortificata*, atribuem propriedades anticoagulantes e antifibrinogenolíticas à mesma, enquanto extratos de caules e cascas mostraram efetiva ação antimicrobiana, contra dermatófitos fúngicos.

Além disso, no estudo realizado por Oliveira *et al.*, (2005) com *B. fortificata*, atribuem propriedades anticoagulantes e antifibrinogenolíticas à mesma, enquanto que extratos de caules e cascas mostraram efetiva ação antimicrobiana, contra dermatófitos fúngicos.

Outros estudos pré-clínicos evidenciam a atividade antidiabética das folhas de *B. forficata* L., atribuindo-a aos glicosídeos flavonoídicos canferólicos e quercetínicos, e, em particular, ao 3,7-di-O- α -L-rhamnopiranosilcanferol (canferitrina), marcador químico, presente somente nas folhas (PEPATO *et al.*, 2002; JORGE *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2004; CAZAROLLI *et al.*, 2006; MENEZES *et al.*, 2007; ENGEL *et al.*, 2008; DA CUNHA *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar os constituintes químicos do extrato de *Bauhinia forficata* Link, bem como o efeito citotóxico do extrato e da fração de inibidor de aspártico-proteases sobre *Leishmania amazonensis* (L.).

3.2 Específicos

- Identificar a concentração de proteínas do extrato e seu perfil em eletroforese;
- Determinar os teores de substâncias fenólicas totais e flavonoides totais presentes no extrato de *Bauhinia forficata* Link;
- Caracterizar a composição química do extrato por LC-MS.
- Isolar uma fração rica em inibidores de proteases do tipo aspártico protease;
- Estudar a atividade de inibidores de aspártico-proteases do extrato de *Bauhinia forficata* em LSPIII;
- Analisar o efeito citotóxico do extrato de *Bauhinia forficata* e inibidor de aspártico protease por meio de ensaios *in vitro*;
- Analisar toxicidade aguda do extrato de *Bauhinia forficata* em larvas de *Tenebrio molitor* (*in vivo*)
- Avaliar os efeitos leishmanicida do extrato de *Bauhinia forficata* e inibidores aspártico-protease isolados de plantas sobre promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do material

Os pecíolos das folhas de *B. forficata* foram fornecidas pela Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos da Fundação Oswaldo Cruz (PAF-FIOCRUZ), Campus Mata Atlântica, localizada no bairro de Jacarepaguá, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil (S:22° 56´ 24.10"/W: 43° 24´ 09.22"). O material vegetal foi coletado no período da manhã em dias ensolarados, entre agosto de 2019 e julho 2020. A exsiccata da espécie encontra-se depositada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, sob o registro RB - 511.138.

4.2 Preparação do extrato

O material vegetal fresco foi selecionado, lavado com água destilada, e imediatamente processado para preparação do extrato. Os pecíolos foram triturados com triturador com lâminas e suas proteínas extraídas com água destilada em 4 pulsos rápidos de 5 segundos para prevenir a desnaturação das proteínas. O sobrenadante obtido foi então centrifugado a 10.000 x g por 30 min à 4 °C e, posteriormente, liofilizado, obtendo-se o extrato aquoso de folha, nomeado como extrato aquoso de *Bauhinia forficata* (BF-CA).

4.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD *et al.*, 1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como proteína padrão. Esta é uma técnica sensível e com poucas substâncias que interferem a quantificação por este método. Esta metodologia minimiza a interferência de alcaloides e polifenólicos como flavonoides e taninos que são comumente encontradas observadas nos vacúolos dos citoplasmas vegetais (ZAIA *et al.*, 1998).

Para tal, foi feita uma solução de albumina bovina sérica (BSA) (Código:1870; Temperatura: 2-8°C; Fabricação: 07/2017; Validade: 01/2022), na concentração de 2mg/mL, tanto para o BF-CA, que foi utilizado 5mg, e também para o BFI, sendo

utilizada 2mg, após foi feita diluição seriada. Foi transferido 190µL do reagente de Bradford por poço e acrescentado 10µL da amostra (BSA que é o padrão e amostra de concentração desconhecida). As absortividades das reações foram medidas em espectrofotômetro a 595 nm.

4.3.1 Identificação de proteínas por eletroforese

As amostras do extrato provenientes da purificação (item 4.5) foram submetidas à detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi realizada utilizando-se as condições descritas por Laemmli (LAEMMLI, 1970) num sistema de eletroforese Mini-protean II (Bio-Rad) e com espaçadores de 0,75 mm. O gel separador será preparado na concentração de 12% e o empacotador (superior) a 5%. As amostras foram preparadas em solução de tampão Tris-HCl 1,2 mM pH 7,0, SDS 1%, glicerina 5%, uréia 5% e azul de bromofenol 0,25% e β-mercapto etanol 3%, que será usado para preparar as amostras reduzidas, todas foram aquecidas em banho de areia por 7 min a 100 °C. Após a corrida em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 contendo 192 mM de glicina, as proteínas foram reveladas pelo reagente de Azul de Coomassie R-250 0,2 % em metanol/ácido acético/água (4:1:5). A caracterização da massa molecular mass foi utilizado um padrão de peso molecular "Precision Plus Protein Standards" (250–10 kDa) num sistema Mini Protean ambos da Bio-Rad (Berkeley, CA, USA).

4.4 Análise fitoquímica do extrato de *B. forficata*

4.4.1 Prospecção dos constituintes químicos

Para a identificação dos metabólitos secundários presentes no BF-CA, foi realizado testes químicos qualitativos, seguindo o protocolo de Matos (1997). Na preparação da amostra, 1 g de BF-CA foi diluído em 20 mL de metanol e água, na proporção de 1:9, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos à uma temperatura de 8 °C, e após centrifugação foi coletado o sobrenadante. Foi retirado metade do volume do sobrenadante, e o mesmo foi diluído em quatro vezes para posterior realização dos testes, sendo os seguintes: fenóis e taninos; antocianinas;

flavonóis; flavononas; diidroflavonóis e xantonas. A outra metade do sobrenadante foi submetida a uma partição com éter, para posterior identificação de alcaloides. Para a realização de identificação de estereoides, triterpenoides e saponinas, usou-se 80 mg do extrato, que foi diluído em 3 mL de clorofórmio, em que foram usadas a fração orgânica e fração solúvel (MATOS, 1997).

- **Fenóis e taninos:** cerca de 1 mL do sobrenadante reagiu com uma gota de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3) 10% e foi agitado até homogeneização. A alteração da coloração, variando entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis. A formação de um precipitado escuro é indicativo de taninos. Se o precipitado for azul sugere taninos hidrossolúveis e se for esverdeado taninos condensados ou catequinas (MATOS, 1997).
- **Antocianinas, antocianidinas:** três alíquotas de 1 mL foram reservadas, uma delas acidificada com solução de HCl 40% para $\text{pH} < 3$, uma alcalinizada com solução de NaOH 70% para $\text{pH} > 11$ e a outra mantida em pH neutro. As soluções foram homogeneizadas e a mudança na coloração pode sugerir a presença ou ausência de tais substâncias pela variação de cores de acordo com os diferentes tratamentos conforme uma tabela padrão de Matos, 1997.
- **Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas:** como descrito na etapa anterior, as amostras foram acidificadas, alcalinizadas e mantidas em pH neutro. Posteriormente, estas foram aquecidas à 60°C em banho-maria por 10 min e as mudanças de coloração ocorridas foram comparadas com as amostras da etapa anterior, indicando a presença ou ausência de tais substâncias (MATOS, 1997).
- **Flavonóis, flavanonas, diidroflavonóis e xantonas:** em um tubo com 1 mL do sobrenadante foi adicionado um pequeno pedaço de magnésio em fita e três gotas de HCl concentrado. Após a efervescência foi feita a comparação da mudança de coloração em relação a solução inicial. O aparecimento ou intensificação da cor originalmente observada sugere a presença de tais flavonoides (MATOS, 1997).
- **Alcaloides:** dez mililitros do sobrenadante foram alcalinizados com 70% de NaOH até $\text{pH} > 11$ e particionados com três lavagens de 10 mL com éter em um funil de separação. A fase orgânica (etérea) foi filtrada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) a fim de eliminar qualquer resíduo permanente da fase aquosa. Foram reservados três tubos contendo cerca de 3 mL da fase orgânica filtrada e em cada

tubo adicionou-se três gotas dos reagentes indicadores da presença de alcaloides (Dragendorff, Mayer e Bertrand). A formação de precipitado floculoso em duas das três amostras é um indicativo da presença de alcaloides (MATOS, 1997).

- **Esteroides e triterpenoides:** a solução clorofórmica foi filtrada em um funil com papel de filtro, contendo algodão e alguns gramas de Na₂SO₄ anidro. Ao filtrado foi adicionado 1 mL de anidrido acético e dez gotas de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) e cuidadosamente agitado. O rápido aparecimento de uma coloração azul ou verde sugere a presença de esteroides livres, enquanto o aparecimento de uma coloração que varia entre o pardo até o vermelho indica a presença de triterpenoides pentacíclicos livres (MATOS, 1997).

- **Saponinas:** o resíduo insolúvel da etapa anterior (retido no algodão) foi deixado exposto na capela até a total evaporação do clorofórmio. Esse material foi então lavado e suspenso em 5 mL de água destilada. A solução foi filtrada para um tubo com tampa e agitada manualmente de modo vigoroso por dois min. A formação de espuma abundante e persistente é um indicativo da presença de saponinas. Um teste confirmatório foi realizado, adicionando 2 mL de HCl concentrado ao conteúdo do tubo preparado. Essa solução permaneceu imersa por 1 h à 70°C em banho-maria. Após o resfriamento, a solução foi neutralizada com 70% de NaOH e a formação do precipitado, ausente de espuma, confirmou a presença de saponinas (MATOS, 1997). Além dos testes qualitativos, foram realizadas cromatografias em camada fina (CCD) para cada classe de metabólitos secundários. No preparo de amostra, 2,5 mg do BF-CA foram diluídos em 0,5 mL de metanol ou etanol. As amostras permaneceram em ultrassom (UstraSonic Cleaner USC-1800A) durante 5 min e então 10 µL foram aplicados nos “spots” das cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 (Merck). Após a saturação da cuba com a fase móvel, a cromatoplasma foi colocada dentro da cuba cromatográfica e a separação ocorreu pela migração da fase móvel da base até a marcação na parte superior (*front*). Em seguida, as placas foram retiradas da cuba e, após estarem secas, os reveladores foram nebulizados. As fases móveis e os reveladores utilizados foram específicas para cada classe de metabólitos secundários de acordo com a metodologia de Wagner e colaboradores (1984) e estão apresentados na seguinte tabela (Tabela 2) (WAGNER *et al.*, 1984).

Tabela 2. Fases móveis, reveladores e reagentes utilizados na CCD para identificação dos metabólitos secundários do BF-CA

TIPO DE METABÓLITO	FASE MÓVEL	REVELADOR
Alcaloides	Tolueno - acetato de etila - dietilamina (70:20:10)	Reagente de Draggendorf
Cumarinas	Tolueno - éter (1:1)	KOH etanólico - observar em UV 365 nm
Flavonoides	Acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético glacial - água (100:11:11:27)	NP/PEG - Observar em UV 365 nm
Saponinas	Clorofórmio - metanol - água (64:50:10)	Vanilina sulfúrica (ou anisaldeído sulfúrico) - observar levando a placa ao aquecimento
Terpenoides	Acetato de etila - metanol - água (77:15:8)	Vanilina sulfúrica (ou anisaldeído sulfúrico) - observar levando a placa ao aquecimento

Fonte: adaptado de Wagner *et al.*, 1994.

4.4.2 Determinação dos teores de flavonoides totais

A determinação de flavonoides totais foi realizada por regressão linear com comparação da curva padrão de quercetina com concentrações entre 5 a 50 µg/mL, logo depois foi verificado a absorvância de 2 mL de cloreto de alumínio a 2% (m/v) em 2 mL do extrato deixados a dez minutos em ambiente escuro, após esse tempo as amostras foram lidas contra um branco (solução de 2 mL de água purificada com 2 mL de cloreto de alumínio 2%). A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 425 nm. As análises serão realizadas em triplicatas.

4.4.3 Análise do extrato bruto por cromatografia líquida de alta eficiência

Foram diluídos 10 mg do extrato em 500 µL de metanol/água (8:2), sendo filtrado em seguida, após foi adicionado 100 µL de água deionizada. A amostra foi homogeneizada por 5 minutos no vórtex. Em seguida a máquina foi lavada com 2 ml de H₂O (MeOH (1:1)). Com uma seringa de precisão foram injetados 10 µL da amostra, em uma Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE-PDA), modelo Shimadzu (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), constituído por um módulo de bombas binário,

detector PDA (SPA-10A) com coluna Luna 5 μ m C18 100 A (150 μ m x 4,6 μ m). Os solventes de eluição A (Água e Ácido acético a 1%) e B (Metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 10% a 100 % de B em 60 min a um fluxo de 1mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 10 μ L. Os dados foram coletados e processados utilizando o software LC Solution.

4.4.4 Análise por cromatografia de camadas delgada acoplada à espectrometria de massas

A amostra foi preparada com 10 mg do extrato aquoso de BF-CA diluído em 500 μ L de metanol:agua (8:2), sendo filtrado em membrana PES 0,22 μ m, 30 mm 1 unidade Kasvi. Sendo a amostra analisada por HPLC (LC-20AD) Shimadzu, e uma coluna Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,6 mm – 5 μ m). As fases móveis consistiam de água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol (B). O seguinte gradiente linear foi aplicado: 0 min, 5% B; 1–60 min, 5–100% B; 60–70 min, 100% B na taxa de fluxo de 1 mL/min. O LC foi acoplado a um espectrômetro de massa (Amazon Speed ETD, Bruker, MA, USA) equipado com ionização por *electrospray* (ESI) e um analisador do tipo *ion-trap* (IT) em modo negativo, nas seguintes condições: tensão capilar a 4,5 kV, temperatura capilar de 325 °C, fluxo de gás de arrastamento (N₂) a 12 L/min e pressão do nebulizador de nitrogênio a 27 *psi*. O intervalo de aquisição foi m/z 100–1000, com 2 ou mais eventos.

4.5 Cromatografia de afinidade em pepsina-sepharose para isolamento do inibidor de pepsina (aspártico protease) proveniente de BF-CA

Para o isolamento do BFI foram utilizadas diferentes concentrações de BF-CA, que variou de 200 e 600 mg, entretanto o melhor rendimento foi obtido usando 300 mg de BF-CA. Portanto o isolamento dos IPs do tipo aspártico proteases envolveu uma etapa cromatográfica clássica de afinidade utilizando seringa de 5 mL de plástico recheada resina pepsina-sepharose, que possui pepsina imobilizada por ligações amidícas à polímeros de Sepharose (GE, healthcare, Co). A coluna foi previamente lavada vinte vezes com tampão Citrato de sódio 10 mM, pH 5,5 com 20 mM de CaCl₂ e as proteínas adsorvidas foram eluídas em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,5 contendo 1,5 M de NaCl. Após exaustivas lavagens com tampão de equilíbrio, as

frações de 1,0 mL foram coletadas num fluxo de 15 mL/h. As frações 4 e 8 de maior absorvância, que foram a 280 nm foram reunidas, liofilizadas e acondicionadas a -4 °C para estudos posteriores de cinética enzimática e de caracterização bioquímica. Esta fração foi denominada de BFI, que é um inibidor de aspártico protease de extrato de caule aquoso de *B. forficata*.

4.6 Ensaio citotóxicos com extrato de *Bauhinia forficata*

4.6.1 Ensaio de hemólise com eritrócitos de carneiro

A atividade hemolítica foi realizada seguindo a metodologia de Almaaytah *et al.*, (2014). Foram coletados 10mL de sangue de carneiro em um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), disponibilizado pelo biotério da Universidade Federal do Maranhão, o mesmo foi submetido ao comitê de ética e pesquisa de uso de animais, tendo recebido o seguinte parecer: Processo n. 23115.005441/2017-62 (CEUA). O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, a 20 °C. O plasma foi removido e os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato salina (PBS). Uma alíquota de 100µL de suspensão de eritrócitos foi misturada a 200 µL de extrato (BF-CA) e inibidor de aspártico protease (BFI), em microplaca de 96 poços, em diferentes concentrações de BF-CA (15; 7.5; 3.75; 1.87; 0.93; 0.46; 0.23; 0.11 µg/mL) que foram incubadas por 1 hora a 37°C. Os controles positivo e negativo receberam 100 µL de Triton x-100 a 1% e PBS, respectivamente. Após 1 hora de incubação a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 20°C. Foi retirado o sobrenadante (100 ou 150 µL), transferido para uma microplaca e suas absorvâncias medidas a 450 nm.

A atividade hemolítica foi expressa em relação a ação do Triton x-100 e calculada pela seguinte fórmula:

Hemólise % = [(Abs₄₅₀ amostra tratada com o extrato – Abs₄₅₀ amostra tratada com PBS)/ (Abs₄₅₀ amostra tratada com Triton x-100-Abs₄₅₀ tratada com PBS)]*100.

$$\text{Hemólise \%} = \frac{(\text{Abs}_{450}/\text{extrato} - \text{Abs}_{450}/\text{PBS})}{(\text{Abs}_{450}/\text{Triton x-100} - \text{Abs}_{450}/\text{PBS})} \times 100$$

Onde: Abs₄₅₀/extrato é Abs₄₅₀ amostra tratada com o extrato; Abs₄₅₀/PBS é Abs₄₅₀ amostra tratada com PBS); e Abs₄₅₀/Triton é Abs₄₅₀ amostra tratada com Triton.

4.6.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* (Células RAW)

Macrófagos de linhagem murina RAW 264.7 (doadas pelo Laboratório de Imunologia Aplicada – Rio de Janeiro) foram mantidos em garrafas de cultura estéreis com meio RPMI 1640 (SIGMA) contendo penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 U/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) e suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 5% de CO₂ à 37 °C.

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, utilizou-se 5x10⁵/mL de células em meio RPMI-1640 suplementado com 1% de SFB. As células foram adicionadas num volume de 100 µL por poço em placas de 96 poços de fundo chato. Em seguida os macrófagos foram acondicionados por 1 hora em estufa de CO₂ a 5% para aderência ao fundo da placa.

Após esse período, os macrófagos foram incubados com diferentes concentrações BF-CA (1000-7,81 µg/mL) e BFI (100-1,56 µg/mL), para posteriormente realizar o cálculo da CC₅₀. Como controles serão mantidos poços com células sem tratamento e tratados com pentamidina® (100-1,56 µg/mL). Após incubação por 48 horas, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, EUA) (5 mg/mL) foi adicionado na cultura, sucedendo-se nova incubação (3 h/37° C). A viabilidade das células foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada em espectrofotômetro, sob comprimento de onda igual a 540 nm. Após as 3 horas de incubação, adicionou-se 100 µL de DMSO por poço e leu-se em leitor de Elisa 540 nm, a porcentagem de citotoxicidade foi realizada de acordo com o cálculo (BARROS, et al., 2016): (% citotoxicidade = (1- Densidade ótica do teste/ Média do controle negativo) X 100.

A citotoxicidade foi expressa em porcentagem, sendo determinada a concentração citotóxica de 50% das células (CC₅₀) utilizando o programa GraphPad Prism 8.

4.6.3 Ensaio de toxicidade *in vivo* (*Tenebrio molitor*)

A toxicidade aguda BF-CA foi avaliada empregando modelo *in vivo* da larva *Tenebrio molitor*. As larvas, que foram adquiridas e cultivadas no Laboratório de

Imunofisiologia (LIF/UFMA), com peso médio de 100 mg, foram distribuídas de forma randômica, em placas de petri em quatro grupos teste nas concentrações de 1000; 500; 250 e 100 mg, e no grupo controle (PBS), contendo 15 larvas cada. Com o auxílio de uma seringa de insulina, foram inoculados 5 µL na região caudal das larvas do BF-CA e do controle PBS. As larvas permaneceram em temperatura ambiente e a taxa de sobrevivida foi observada em intervalos de 24 h, durante 7 dias. Para estabelecer a morte das larvas, verificou-se visualmente a melanização e resposta aos estímulos físicos.

4.7 Ensaio de inibição do extrato de *B. forficata* e do inibidor de proteases

4.7.1 Inibição das proteases de referência

O potencial inibitório do extrato de *B. forficata* foi avaliado sobre proteases de referência representando as classes: serino, cisteíno e aspártico-proteases utilizando respectivamente: a tripsina, a papaína e a pepsina a 1 mg/mL. As proteases foram pré-incubadas com 10 µg de BFI extratos de *B. forficata* por 30 min à temperatura ambiente. Nos casos em que foram ensaiadas frações dos extratos submetidos previamente a estratégias cromatográficas, foi utilizado 1 mg das proteases de referência. A reação iniciou após a adição do substrato BSA (0,5 mg/mL) no tampão de pH ótimo das enzimas a 25 °C por 30 min. Os tampões: 50 mM de tris HCl pH 8,5, 50 mM de fosfato de sódio pH 5,5 e 50 mM acetato de sódio pH 4,5, respectivamente para tripsina, papaína e pepsina. As reações foram paralisadas com 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e as absorbâncias foram quantificadas em 280 nm. Controles apropriados foram conduzidos usando a mesma solução enzimática livre dos extratos e a inibição foi expressa como porcentagem da atividade residual destes controles. Os experimentos foram feitos em triplicatas e repetidos três vezes.

4.8 Atividade leishmanicida

4.8.1 Parasitos

As formas promastigotas e amastigotas (5×10^5 /mL) de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia (UFMA) em garrafas para cultura estéreis contendo meio Schneider (SIGMA), gentamicina (50 µg/mL) e suplementado com Soro Fetal Bovino (GIBCO) 10%, sendo acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) à 27°C. As

mesmas foram obtidas na fase estacionária, em culturas de 5 dias. A solução contendo os protozoários foi centrifugada (200 x g por 15 min) e as promastigotas foram ressuspensas em meio RPMI (suplementado com 10% de soro fetal bovino).

4.8.1.1 Fracionamento dos parasitos

O sobrenadante de cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram processados de acordo com SILVA-LÓPEZ *et al.*, (2005) para obtenção da fração III, que é rica em inibidores de proteases. Inicialmente ele foi centrifugado a 10.000 x g/ 30 min/ 4 °C, e o sobrenadante precipitado à 45% de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ por 18 h a 25 °C. Este material foi centrifugado (10.000 x g/ 30 min/ 4 °C) para obtenção do precipitado. Este foi dialisado exaustivamente contra 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, obtendo-se a fração III que é sabido conter proteínas e enzimas secretadas pelo parasito (CANTON; KIMA, 2012).

4.8.1.2 Isolamento das serino proteases de *Leishmania*

A serino protease secretada de *L. (L.) amazonensis*, LSPIII foi purificada como descrito por Silva-López *et al.* (2005). A fração III foi submetida à cromatografia de afinidade em aprotinina-agarose (2,5 mL de gel), previamente equilibrada com 10 mM Tris-HCl pH 7,5 contendo 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) e após exaustivas lavagens (20 volumes de coluna) o material foi eluído com 10 mM Tris HCl pH 7,5 contendo 1,5 M de cloreto de sódio (NaCl). Frações de 1 mL foram coletadas em gelo e suas absorvâncias monitoradas em 280nm para detectar o máximo de absorção que corresponde a eluição da proteína.

4.8.1.3 Inibição das serino proteases de *Leishmania amazonensis*

Nestes ensaios de inibição foram utilizados 10 µg de proteína da fração III de *L. (L.) amazonensis* e 1 µg de proteína de LSPIII, que foram incubadas com 10 µg de proteína de BF-CA e 1 µg de proteína do inibidor de protease isolado de BF-CA, o BFI. As reações foram previamente incubadas por 30 min em 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5 para a fração III. Após este período de tempo, foram adicionados 50µL do substrato N-α-tosyl-L-arginina metil ester (L-TAME) a 0,125mM e a reação transcorreu por mais 15 min. As absorvâncias foram determinadas a 247nm. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas e os resultados da inibição dos extratos foram expressos

em atividade residual (%), em relação à porcentagem da atividade controle (100 %) das enzimas de *Leishmania* com o substrato L-TAME sem a adição de BF-CA ou BFI.

4.8.1.4 Atividade antipromastigota do BF-CA e BFI

O efeito anti *Leishmania* tanto do extrato (BF-CA) quanto do inibidor de protease isolado (BFI) foi estudado em promastigotas (5×10^7 /mL - 10 μ L), que foram adicionadas em placas de 96 poços (5×10^5 mL por poço), na presença de diferentes concentrações BF-CA (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 μ g/mL) e do BFI (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,625 μ g/mL). Como controle positivo foi utilizada a pentamidina® (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,625; 0,78125 μ g/mL) e o controle negativo foi preparado apenas com o meio de cultura Schneider. Após 48 horas de incubação foi adicionado 10 μ L de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) 5mg/mL e novamente incubado por 3 horas para haver a formação dos cristais de formazan. Finalmente, foi adicionado 100 μ L de SDS a 10% e suas absorbâncias medidas em espectrofotômetro a 570 nm após 24 horas (no dia seguinte).

A concentração inibitória de 50% (IC₅₀) foi obtida por regressão não linear com o auxílio do GraphPad Prism versão 8.0.2.

4.8.1.5 Atividade antiamastigota do BF-CA e BFI

Para a realização do experimento, um volume de 500 μ L de meio de cultura contendo 1×10^5 células/poço foi adicionado em placas de 24 poços previamente ocupadas com lamínulas de vidro estéreis e incubadas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C por 1 hora para adesão. Em sequência, o sobrenadante foi descartado e em cada poço foi adicionado 2×10^5 (10 parasitos/célula) de promastigotas de *L. amazonensis*. Logo após, as placas foram levadas para a estufa de CO₂ (5%) a 33°C por 24 horas (tempo de fagocitose do parasito). Após este período os poços foram lavados e as células infectadas com amastigotas foram tratadas (48 horas, 37°C, CO₂ 0,5%) com BF-CA na concentração de 60 μ g/mL, BFI na concentração de 50 μ g/mL e pentamidina, na concentração de 5 μ g/mL. As lamínulas foram coradas com Giemsa e colocadas sobre lâmina para avaliação do número de parasitas intracelulares, considerando a contagem de 100 macrófagos, com auxílio de microscópio óptico, de campo claro, e aumento de 1000X, (GIAIMIS et al., 1992). A taxa de infecção dos

diferentes grupos, foi calculada utilizando-se a fórmula abaixo (LIMA JUNIOR *et al.*, 2014):

$$\text{Taxa de infecção} = \frac{\% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{n}^\circ \text{ de amastigotas}}{\text{n}^\circ \text{ total de macrófagos}}$$

4.8.1.6 Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante da cultura de macrófagos

A quantificação de citocinas foi realizada pela técnica de CBA (cytometric beads array) a partir do sobrenadante das culturas, sendo utilizado kit inflammatory mouse IL-6, IL10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70 BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Após a leitura, os dados foram analisados no software Flow Jow®, onde os valores foram expressos em pg/mL para cada citocina.

4.9 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, que foram analisados por análise de variância (ANOVA one-way) seguido do teste de Tukey – Kramer (para três ou mais grupos) ou por teste t de Student (dois grupos). Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$. Os valores de CI_{50} (concentrações dos compostos que reduziram a resposta a 50% em relação ao grupo controle) e de CC_{50} (concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular) foram estimados a partir dos valores médios de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Todos os dados foram analisados com auxílio do Programa Graph Pad Prism versão 8.0.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do extrato aquoso de caule de *B. forficata*

A proteína é um dos objetos de estudo deste trabalho, visto que os IPs de plantas são polipeptídeos de tamanho variável. Contudo, existem outras proteínas no extrato, como as estruturais, algumas enzimas, proteínas relacionadas à fotossíntese e os inibidores enzimáticos, em especial os IPs. Estes inibidores não são majoritários, visto que são tão específicos que não são necessárias em grandes concentrações para regular a atividade de suas proteases endógenas e nem para inibir as proteases de seus predadores (SILVA-LÓPEZ, 2009). Sendo assim, a partir de 210,70 g de pecíolos frescos de *B. forficata* foram obtidos 8,87 g de BF-CA com cerca de 111,40 µg de proteínas por mg de extrato (11,4 %), totalizando cerca de 988 mg de proteínas extraídas (Tabela 3), ou seja, o conteúdo de proteínas de cada grama caule fresco é de 0,47%, representando, portanto, uma fonte pobre em proteínas quando comparado a um tecido animal, mas as leguminosas são boas fontes de proteína vegetal.

Tabela 3. Rendimento de obtenção do extrato aquoso de *B. forficata*

Lote	Pedúnculo (g)	Extrato (g)	Rendimento da extração (%)	Teor de proteínas (µg/mg de extrato)	Proteínas totais extraídas (mg)
16/03/2020	210,70	8,87	4,21	111,40	988,12

As proteínas do BF-CA foram analisadas por eletroforese em condições redutoras e não redutoras, contudo, apenas é mostrado o perfil de proteínas em redução, visto que foi apresentado melhor resolução e ambos apresentaram perfis eletroforéticos muito semelhantes (Figura 6). Neste gel é possível observar apenas as 5 proteínas majoritárias com os pesos moleculares aproximados de 75, 60, 36, 24 e 20 kDa. Contudo, outras proteínas de pesos entre 75 a 50, 37 a 25, e 24 a 20 kDa, podem ser observadas no gel (Figura 6 B), mas não foram mensuradas e, portanto, identificadas na densitometria como pode ser observado na figura 6 A.2.

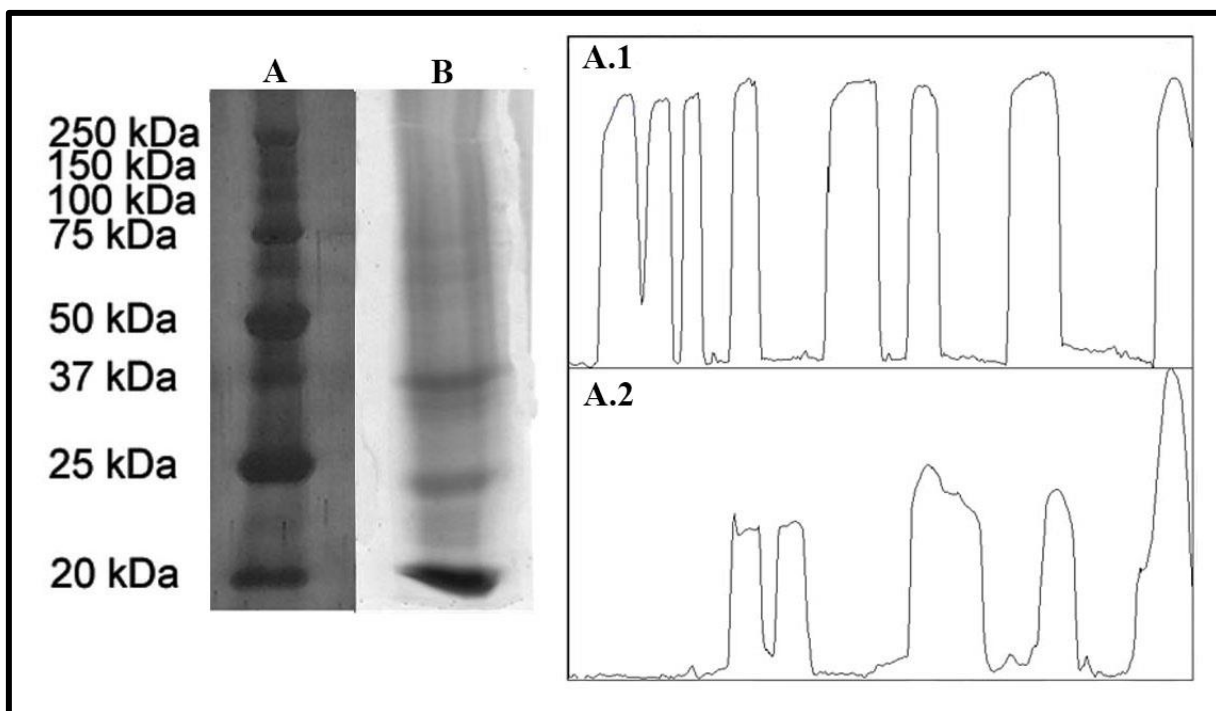


Figura 6. Análise em SDS-PAGE do perfil de proteínas do extrato aquoso do caule de *B. forficata* (BF-CA) em condições de redução, corado com Azul de Coomassie. A - padrão de peso molecular; B - BF-CA, A.1 análise densitométrica do padrão de peso molecular; A.2 análise densitométrica do BF-CA.

Como mencionado anteriormente, de modo geral, não é possível observar as bandas referentes aos IPs numa amostra complexa como é o caso do extrato BF-CA, contudo a eletroforese é um controle de processo de extração de proteínas e sempre é realizada. Além disso, é importante ressaltar que as proteínas observadas no gel são geralmente polipeptídeos de cadeia única, visto que a utilização do agente redutor β -mercaptoetanol, que rompe as pontes de enxofre que unem as diferentes cadeias polipeptídicas de uma proteína com mais de uma cadeia, não alterou o peso molecular das proteínas no gel (MATSUMOTO *et al.*, 2019).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato BF-CA inibiu completamente a atividade da pepsina, uma aspártico protease, e reduziu a atividade da papaína e tripsina em 37 e 30%, respectivamente. Indicando assim que este extrato possui um inibidor de aspártico protease semelhante a pepsina e também inibidores de cisteíno e serino proteases (SANTOS; SILVA-LÓPEZ, 2014). Além disso, BF-CA inibiu completamente (100 %) a atividade proteolítica da fração III de *L. amazonensis* que é conhecida por conter proteases do tipo serino, cisteíno e aspártico que são secretadas pelo parasito para o meio extracelular (SILVA-LÓPEZ, *et al.*, 2005; SANTOS; SILVA-LÓPEZ, 2014).

5.2 Estudo dos metabólitos secundários

5.2.1 Prospecção dos constituintes químicos (Protocolo de Matos, 1997) e análise do extrato aquoso de *B. forficata* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a identificação dos metabólitos secundários presentes no BF-CA- foi realizado o protocolo da Matos (1997), sendo uma metodologia limpa, utilizada para a identificação de flavonoides. Após o teste, o extrato apresentou positividade para as classes de taninos e fenóis, antocianinas, anticianidinas e flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas e flavonas, flavonóis, flavonas e xantonas, esteroides e triterpenoides (Tabela 4), essas classes são representadas nas bandas (Figura 7)

Tabela 4. Classes de metabólitos encontrados no BF-CA através do teste de Matos

Classes	Característica da amostra	Resultado
Taninos e Fenóis	Formação de precipitado marrom	Positivo
Antocianinas, anticianidinas e flavonoides	Solução amarelo intenso em pH alcalino	Positivo para flavona, flavonóis e xantonas
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	Solução amarelo-pardo em pH ácido	Positivo para catequinas e flavanonas
Flavonóis, flavanonas e xantonas	Solução alaranjada e grande formação de espuma	Positivo
Alcalóides	Não houve formação de precipitado	Negativo
Esteroides e triterpenoides	Sem mudança da cor da solução	Positivo
Saponinas	Formação significativa de precipitado esbranquiçado	Negativo

Após realizada a cromatografia de camada delgada, as classes positivas foram somente cumarinas (Banda 2), flavonoides (Banda 3) e terpenos (Banda 5) (Figura 7).

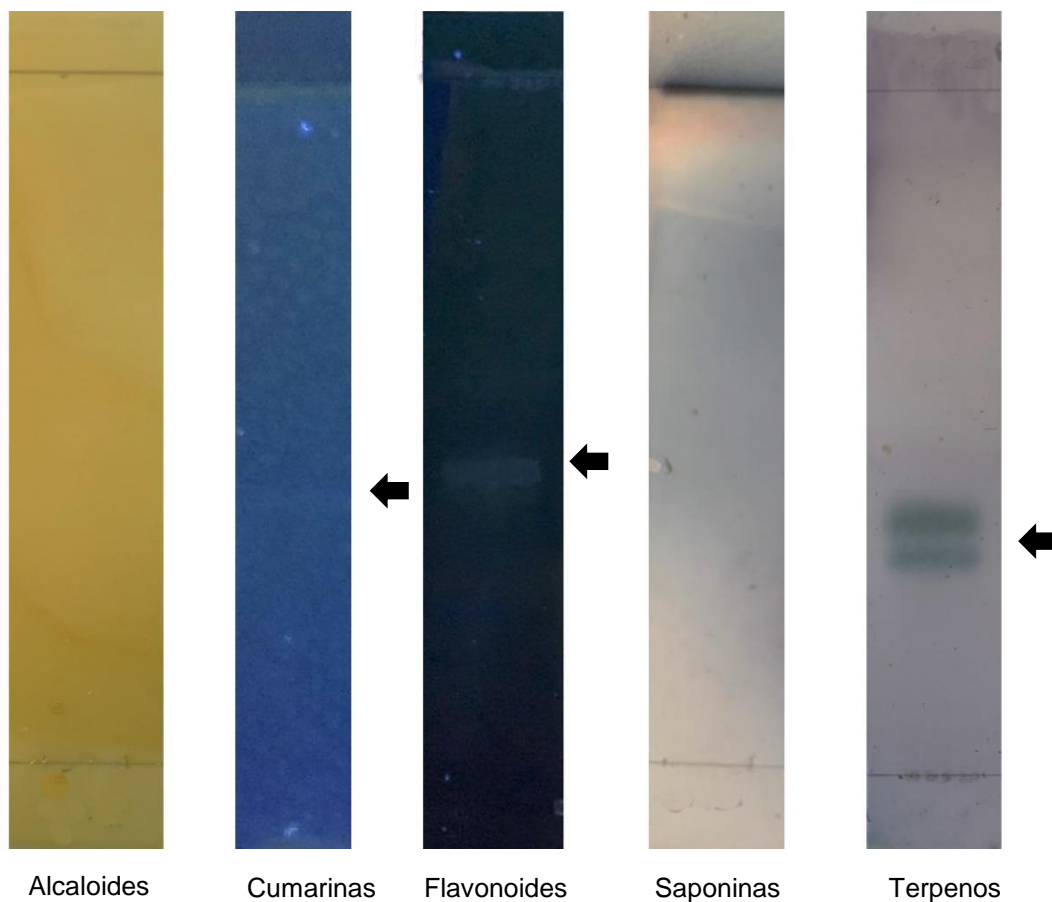


Figura 7. Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato aquoso do caule de *B. forficata* (BF-CA).

E, para se obter das informações sobre a composição química do extrato aquoso e melhor identificação dos constituintes da *B. forficata*, uma análise por CLAE-PDA foi realizada. O perfil por CLAE-PDA mostrou que a composição química de *Bauhinia forficata* apresenta comprimentos de ondas característicos para uma determinada classe de metabólito secundário (Figura 8).

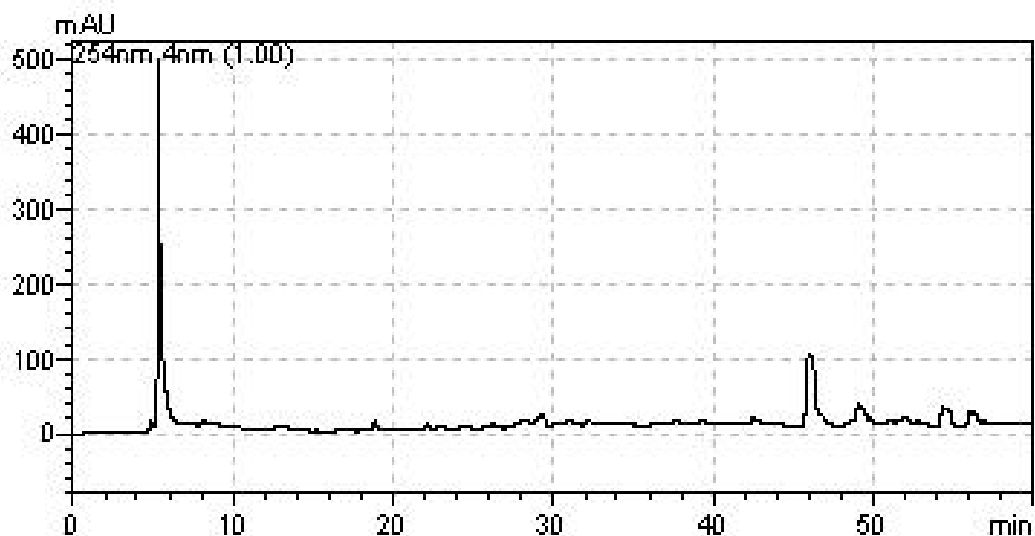


Figura 8. Cromatograma obtido por HPLC-PDA (254 nm) para o extrato aquoso do caule de *B. forficata*.

Após avaliação por HPLC-PDA do extrato de *B. forficata*, observou-se grande complexidade e diversidade na composição química da matriz, avaliada pelo grande número de picos eluídos ao longo da corrida cromatográfica (Figura 8). Com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) acoplado ao sistema HPLC, pôde-se processar os dados cromatográficos e obter os cromatogramas em comprimentos de onda seletivos para uma determinada classe de metabólito secundário. O cromatograma obtido por CLAE-PDA mostra compostos com características relacionadas à presença de fenólicos, sendo a principal delas, os flavonoides e ácidos fenólicos. A verificação da presença destes metabólitos foi constatada pela presença de espectros com bandas características dessas classes em todo o extrato.

Derivados de ácidos fenólicos apresentam uma única banda de absorção referente ao anel benzílico, com máximo na região do UV variando entre 260-280 nm. Já os flavonoides, por sua vez, são reconhecidos por apresentarem no geral, duas bandas de absorção referentes aos dois sistemas aromáticos encontrados em agliconas; o pico II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e o pico I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B. O pico I é associado à absorção do Anel B, que possui o sistema cinamoil com maior extensão da conjugação eletrônica. O pico II é atribuído ao Anel A, que envolve a absorção do anel benzoil de menor conjugação (Figura 9 e 10).

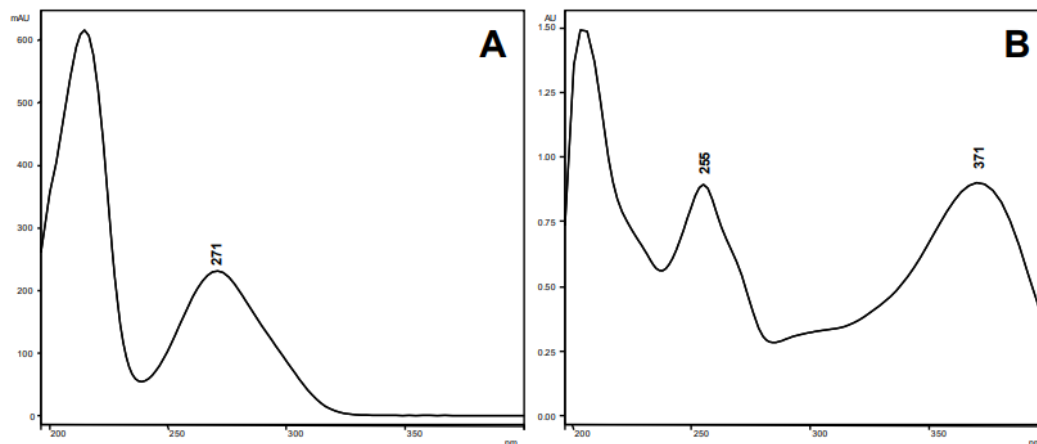


Figura 9. a região do UV para padrões de A) ácido gálico, B) quercetina. O pico II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e ao pico I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B.

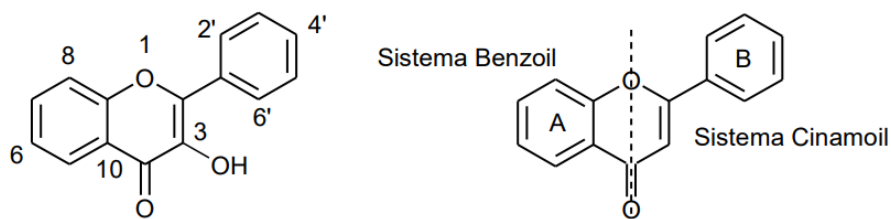


Figura 10. Estrutura de um flavonol com anel benzoil e cínamoil

Quando identificados, por CLAE-PDA, os principais metabólitos secundários presentes no extrato, quercetin 3-rhamnosil(1->4)- rhamnosil-(1->6)-glucosídeo foi o mais abundante, seguida de Kaempferol 3-O-(2,6-di-O-rhamnopiranosil)-galactopiranosídeo e ácido rosmarínico-diglucosídeo (Tabela 5), também é possível observar as estruturas desses compostos (Figura 11).

Tabela 5. Substâncias identificadas e os principais fragmentos do extrato aquoso de *B. forficata* obtidos por LC-ESI-IT/MS

Substância identificada	Fórmula Molecular (massa molecular)	[M H] ⁻	MS ⁿ
Kaempferol-3-O-glucorhamnoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ (594)	593	447;250
Quercetina-3-O-rutinosideo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ (610)	609	463;301
Kaempferol 3-O-(2,6-di-O-rhamnopiranosil)-galactopiranosideo	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉ (740)	739	593; 447; 285
Quercetin 3-rhamnosil(1->4)-rhamnosyl-(1->6)-glucosideo	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀ (756)	755	609; 301
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ (302)	301	151
kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆ (286)	285	267; 151;
Ácido rosmarinico-diglucosideo	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₈ (684)	683	341; 179
Quercetina 3-rhamnosideo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ (448)	447	301

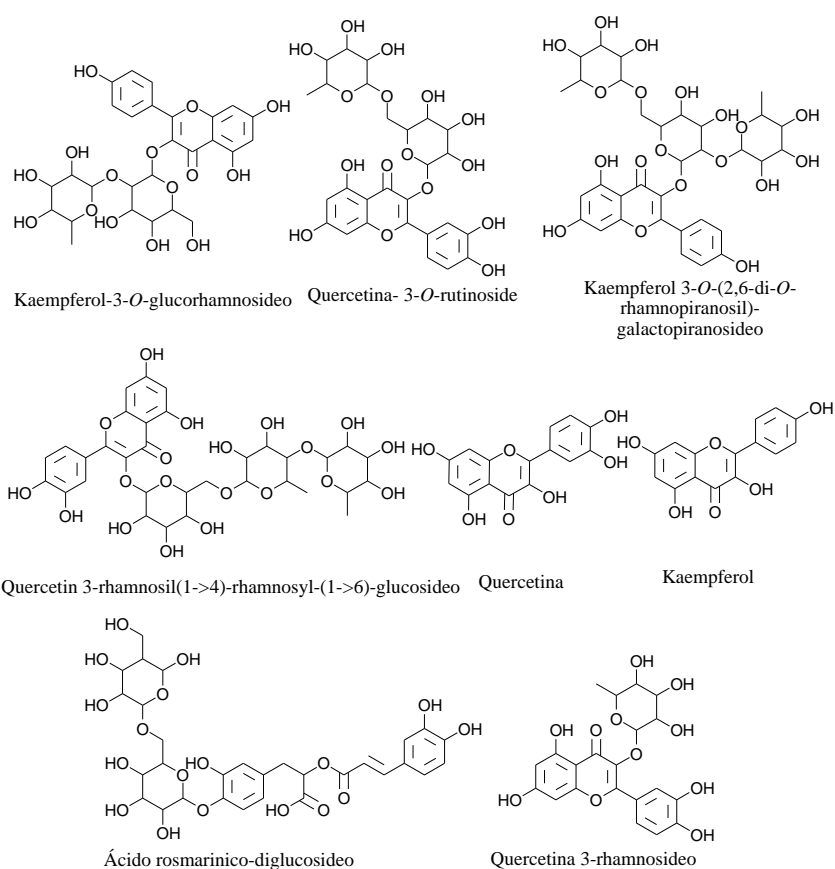


Figura 11. Estrutura das substâncias identificadas no extrato aquoso de *B. forficata* Link.

A literatura já ressalta a atividade antioxidante dos flavonoides, auxiliando na neutralização de radicais livres gerados pelo organismo, além de ações anti-inflamatórias, possuem outras atividades, como: ação antibacteriana, antifúngica, anti-protozoário, na reparação de tecidos, regulação enzimática, estimulação das células fagocíticas e ação antitumoral (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Oliveira e Lima (2017) ao analisar os metabólitos secundários do extrato aquoso de talos da espécie de *B. forficata*, constataram a presença de altas concentrações de flavonoides. Sendo que, alguns flavonoides são capazes de diminuir a permeabilidade dos capilares e reforçar sua resistência; aumenta o aproveitamento da vitamina C; apresentam uma atividade anti-inflamatória; ação de reforço e melhoria da qualidade de fibras de colágeno; ação antihialuronidase e antielastase, diminuindo a permeabilidade vascular; inibição indireta da agregação e adesividade plaquetária; assim como sua propriedade vitamínica P (fator P), reconhecida por muitos clínicos como de efeitos benéficos, principalmente, em alterações circulatórias.

5.3 Isolamento e caracterização parcial do inibidor de proteases de BF-CA

É sabido que a inibição das proteases de *Leishmania* por inibidores específicos, naturais ou sintéticos, causa a morte do parasito em cultivo pela indução de vacúolos autofágicos (SILVA-LÓPEZ, 2007). Como mencionado anteriormente, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa observou expressiva atividade inibidora de pepsina em BF-CA (SANTOS; SILVA-LÓPEZ, 2014). Portanto, foi utilizada uma coluna de cromatografia de afinidade de pepsina-agarose com o objetivo de isolar o inibidor do tipo aspártico protease de BF-CA, denominado BFI. A figura 12 mostra um perfil cromatográfico da eluição de BFI com um sinal único, que é característico de cromatografias de afinidade, com grande absorvidade a 280 nm.

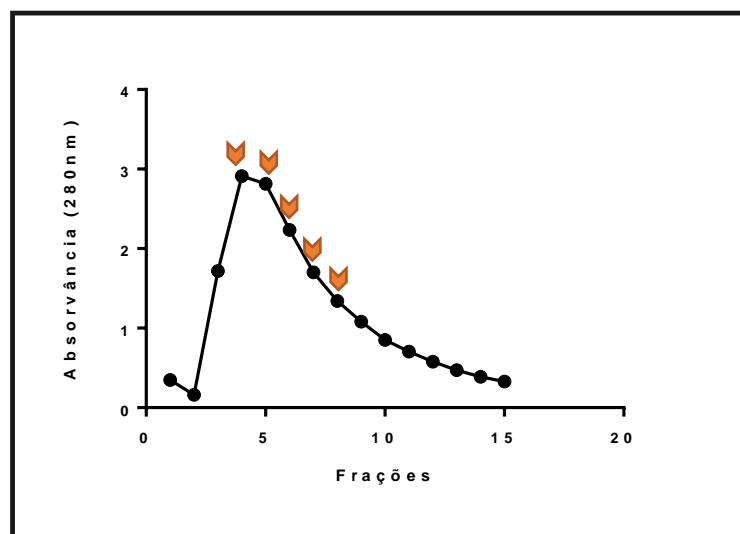


Figura 12. Isolamento do inibidor de pepsina (aspártico protease) de BF-CA por cromatografia de afinidade em pepsina-sepharose.

Para obtenção de BFI foram feitas colunas com diferentes quantidades de extrato que variou de 200 a 600 mg de BF-CA, contudo o melhor rendimento, ou seja, a melhor recuperação de proteínas foi obtido usando 300 mg de BF-CA.

Na tabela 6 estão representados os rendimentos, em termos de teores de proteínas, de três corridas cromatográficas em pepsina-sepharose, em diferentes datas, para obtenção de BFI.

Tabela 6. Rendimento da obtenção de inibidor de protease do extrato aquoso de pedúnculo de *B. forticata* (BFI).

Amostra BF-CA	Quantidade de amostra (mg)	Teor de proteínas totais adicionadas de BF-CA (mg)	Teor de proteínas totais recuperadas de BFI (µg)	Rendimento proteico (%)
C1: 20.08.2020	300	3,64	139,50	3,80
C2: 09.09.2020	300	1,64	90,30	5,50
C3: 22.10.2020	300	4,13	162,00	3,92

De acordo com a tabela 6, a partir de 300 mg de BF-CA, que possui aproximadamente $3,14 \pm 1,07$ mg de proteínas, foi obtido em média $130,6 \pm 29,94$ µg de proteína relativa ao BFI, com um rendimento de cerca de $4,41 \pm 0,77$ %, ou seja, 4,41% das proteínas de BF-CA é composta pelo material ligada à coluna, o BFI. A homogeneidade desta fração foi inicialmente avaliada por SDS-PAGE (Figura 13). Na figura 13 B foi observada uma banda de proteína bem definida com peso molecular

aproximado de 30 kDa, contudo, foi também observada uma fraca banda em aproximadamente 60 kDa. Em outros géis podem ser observadas bandas de proteínas com pesos múltiplos de 30 kDa, sugerindo auto-associação. É sabido que os IPs naturais são geralmente proteínas monoméricas e de baixo peso molecular (SILVA-LÓPEZ, 2009). Além disso, em condições experimentais é comum observar a auto-associação de tais IPs formando dímeros, trímeros ou polímeros (COTABARREN *et al.*, 2020).

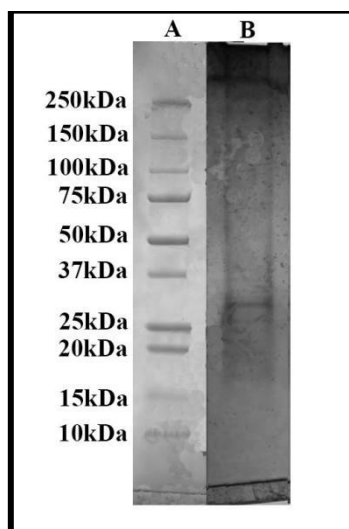


Figura 13. SDS-PAGE a 15 % em condições não-redutoras e impregnado por prata. A) Pardão de peso molecular; B) BFI.

A atividade inibidora de proteases do BFI foi inicialmente avaliada com proteases de referência como pepsina, que é uma aspártico protease, papaína, uma cisteíno protease e finalmente a tripsina que é representante das serino proteases (Figura 14). Como esperado, a atividade da pepsina foi a mais inibida (44,66 %), visto que BFI foi purificado usando tal enzima, logo é um inibidor de aspártico protease do tipo pepsina. Contudo, ele inibiu cerca de 21,67% a atividade da papaína e não afetou a atividade da tripsina, uma enzima alcalina. Os inibidores de proteases naturais, com natureza polipeptídica, podem inibir mais de um tipo catalítico de protease (RUAF *et al.*, 2021), e como a pepsina e a papaína catalisam a hidrólise das ligações peptídicas em valores de pH ácidos, é possível que o pH tenha influenciado a ligação de BFI à papaína com menor afinidade (COTABARREN *et al.*, 2020).

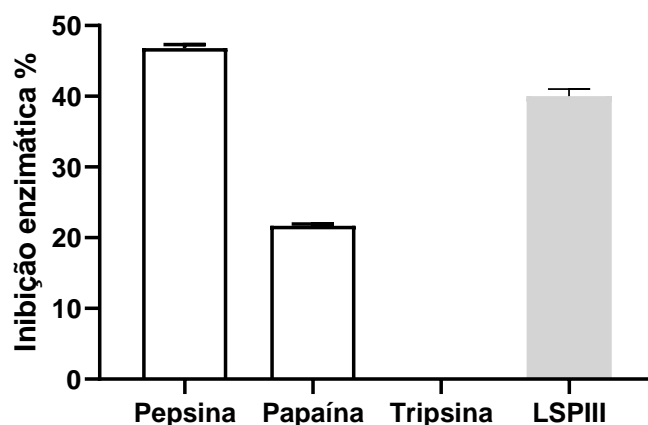


Figura 14. Inibição da atividade das proteases de referência e LSP III pelo BFI.

Finalmente o BFI foi avaliado contra a fração III de *L. amazonensis* que é conhecida por possuir os produtos de secreção do parasito, como as proteases (SILVA-LÓPEZ *et al.*, 2005). O BFI inibiu em 40 % (SD=0) a atividade da serino protease secretada por *L. amazonensis*, a LSP III. Este resultado não foi esperado porque BFI é um inibidor de proteases do tipo aspártico, como a pepsina, e inibiu a LSP III que é uma serino protease. Contudo, os IPs polipeptídicos de plantas são capazes de inibir mais de um tipo catalítico de protease com diferentes afinidades de ligação (HELLINGER; GRUBER, 2019).

5.4 Ensaios citotóxicos com extrato de *Bauhinia forficata* e inibidor de protease

5.4.1 Ensaios de hemólise com hemácias de carneiro

Foi avaliado o efeito tóxico do BF-CA e BFI em eritrócitos de carneiro, por meio do ensaio *in vitro* da atividade hemolítica. Não houve citotoxicidade do BF-CA e BFI em nenhuma das concentrações testadas (15; 7.5; 3.75; 1.87; 0.93; 0.46; 0.23; 0.11 µg/mL), quando comparado ao controle positivo (Figura 15 A e B).

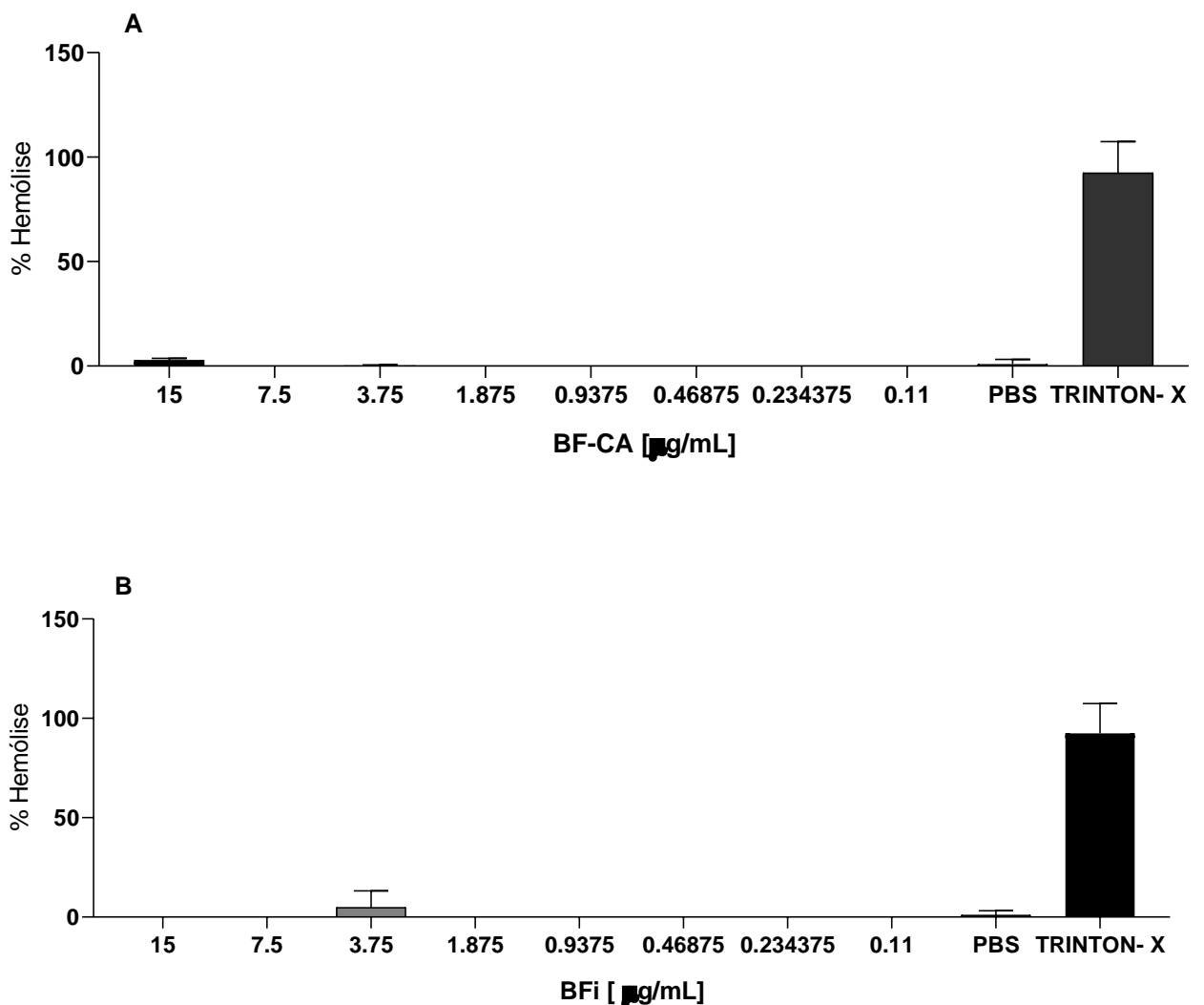
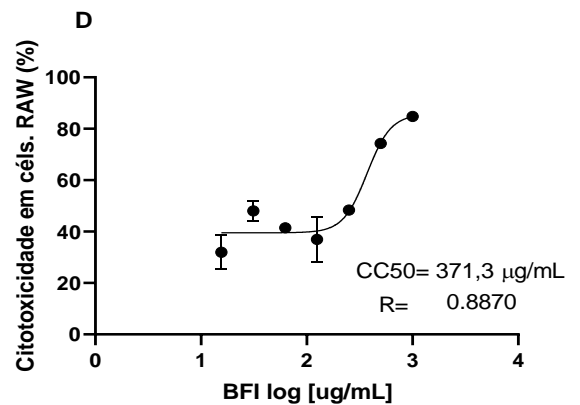
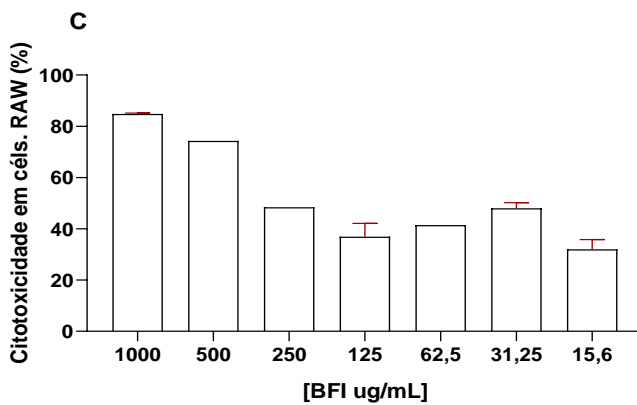
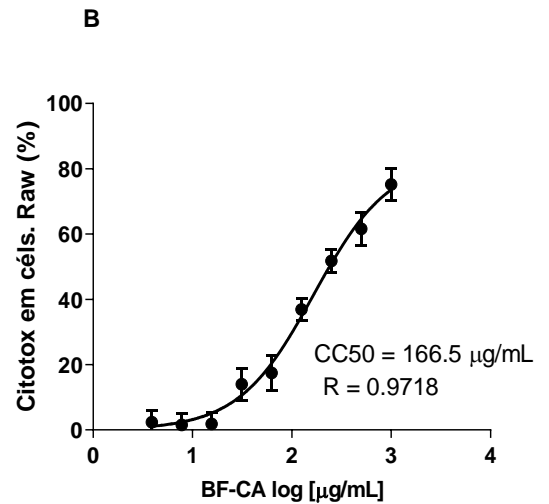
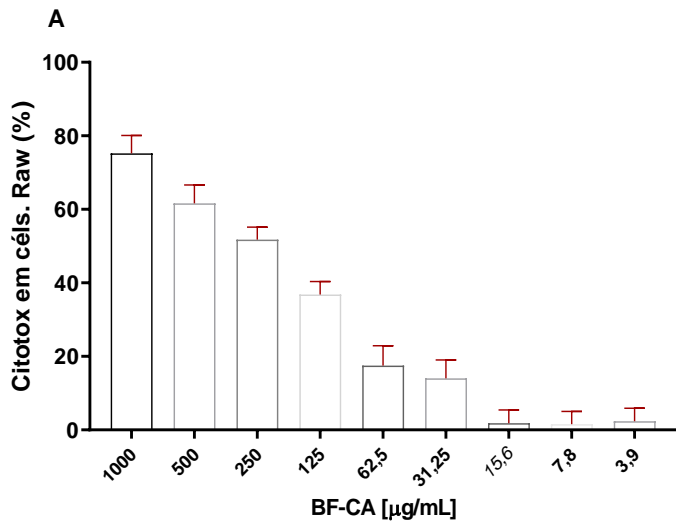


Figura 15. Percentual de hemólise do BF-CA e BFI em eritrócitos de carneiro. A porcentagem de hemólise foi avaliada em várias concentrações de BF-CA (A) e BFI (B) em eritrócitos de carneiro. Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação o controle positivo (Triton x-100 a 1%).

5.4.2 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* (Células RAW)

Foi avaliado o efeito citotóxico BF-CA e do BFI em células de linhagem RAW, através do ensaio *in vitro*. Houve citotoxicidade nas maiores concentrações de BF-CA (1000, 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 16 A), quando comparada com o controle positivo (pentamidina®) (Figura 16 B). Já nas menores concentrações não houve citotoxicidade (Figura 16 A). Quanto ao inibidor BFI, quando testado em células RAW, o mesmo apresentou citotoxicidade nas duas maiores concentrações (100 e 500 $\mu\text{g/mL}$), apresentando percentual semelhantes nas demais concentrações (250; 125; 62,5; 31,25; 125,6 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 16 B). Também foi analisado a citotoxicidade da

pentamidina em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 µg/mL) em que o percentual de citotoxicidade foi inversamente proporcional a quantidade de células (Figura 16 E). Também foi analisado a concentração citotóxica que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos (CC50), sendo que o BF-CA apresentou CC50: 166,5 µg/mL, seguido do BFI com CC50 de 371,6 µg/mL e da pentamidina com CC50= 15,24 µg/mL (Figuras 16B, 16D e 16F, respectivamente).



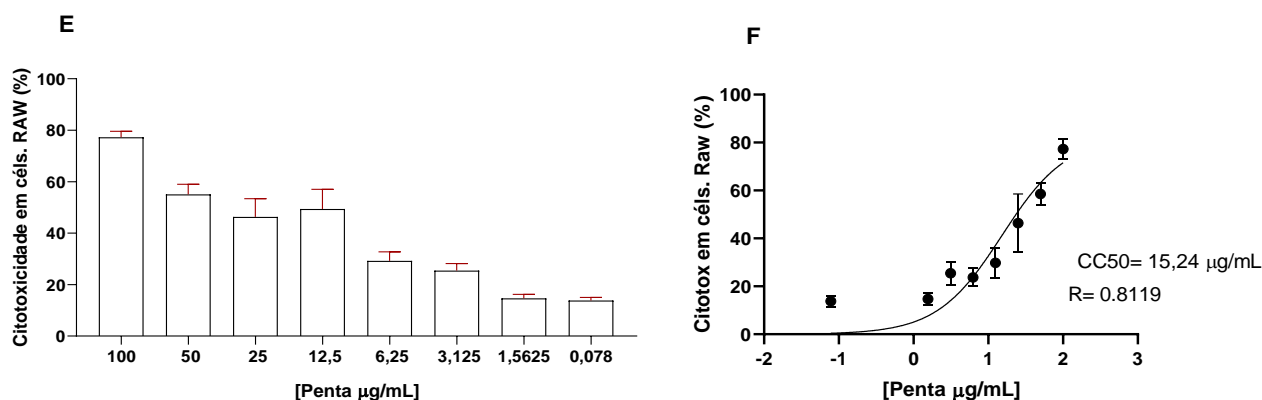


Figura 16. Percentual de citotoxicidade e curva dose- resposta do BF-CA, BFI e pentamidina em células RAW. A citotoxicidade foi avaliada em várias concentrações de BF-CA (A), BFI (C) e Pentamidina (E) em células de linhagem RAW. Também foi analisada a curva dose-resposta (B) do extrato, do inibidor (D) e do fármaco utilizado como controle positivo (F), no qual reduz 50% da viabilidade dos macrófagos em µg/mL (intervalo de confiança 95%). Os resultados correspondem a (médias ± SD) de amostras individuais testadas em triplicata e duplicata.

Os flavonoides são considerados marcadores químicos e taxonômicos das espécies da família *Leguminosae* pois são encontrados em grandes quantidades e diversidade (HEGNAUER *et al.*, 1993), e por isso, foram encontrados em abundância no BF-CA.

Dessa forma, a baixa citotoxicidade do extrato pode ser explicada pela presença desses metabólitos em sua composição, que podem promover uma ação protetiva às células, bem como também devido as proteases, uma vez que o inibidor também apresentou baixa citotoxicidade. Vale ressaltar que fatores como o tipo celular utilizado para a avaliação dos extratos, o tipo de solvente utilizado para a extração e a composição química dos extratos estudados, certamente influenciam na sua atividade biológica e também na sua toxicidade, visto que o BF-CA foi obtido com água e não com solventes orgânicos que podem ser tóxicos para as células (LIMA & CARDOSO, 2007; VERSTEG *et al.*, 2017).

Quanto a citotoxicidade o inibidor (BFI), em estudo realizado por Almeida *et al.*, (2015), em que foram testados inibidores de cisteíno proteases em células RAW, foi evidenciado que três dos inibidores, denominados de 1A, 1C e 3A, testados apresentaram baixa toxicidade, com CC50 de 107,8; 496,1 e > 456,9 µg/mL, respectivamente.

Além disso, os dois compostos testados, o extrato (BF-CA) e o inibidor de aspártico protease (BFI) foram menos tóxicos que o medicamento de referência (pentamidina), o BF-CA e o BFI foram cerca de 6 e 4 vezes menos citotóxicos, respectivamente, do que a pentamidina® (CC50=27,36 µg/mL).

5.4.3 Ensaio de toxicidade *in vivo* (*Tenebrio molitor*)

O ensaio *in vivo* com as larvas de *T. molitor* demonstraram que a média de sobrevivência foi de 93,3% no grupo da maior dose (1000 mg/kg), enquanto apresentou taxa de sobrevivência de 100% nas doses de 500 e 100 mg/kg, sem significância estatística ($p=0,5259$) quando comparadas com o controle, sugerindo baixa toxicidade (Figura 17).

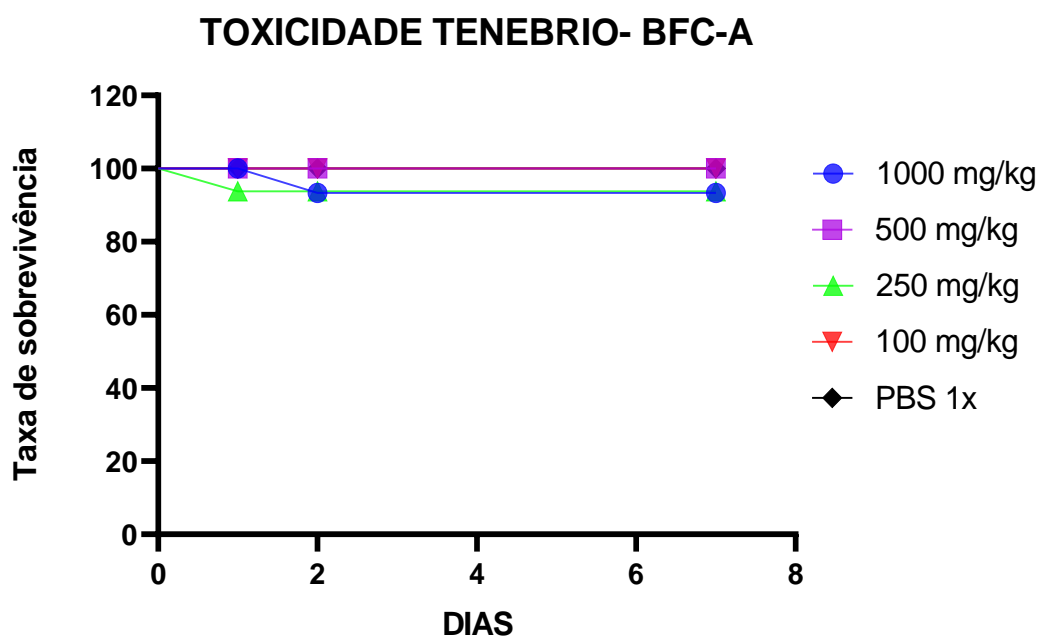


Figura 17. Taxa de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* após injeção com o extrato aquoso do caule de *Bauhinia forficata* Link. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (Teste Kaplan-Meier e Teste Log-Rank [Mantel-Cox]).

Na figura 18 também é possível notar que o BF-CA não foi tóxico para as larvas, sendo observadas as taxas de sobrevivência de 100% nas doses de 500 e 100 mg/kg. Através das imagens foram visualizados pontos de melanização, característicos da indução de estresse nesse modelo de estudo de toxicidade de substâncias. Esse processo ocorre devido a ação de uma enzima chamada fenoloxidase, que é responsável pela cascata profenolixade, em que catalisa a oxidação de compostos

fenólicos presentes na hemolinfa e na cutícula dos insetos para produzir melanina. Essa enzima é muito ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para o inseto como para os microrganismos invasores, devido a isso sua ativação é limitada ao local de infecção, pois o contrário poderia levar a sua melanização generalizada e letal para o inseto (DA SILVA, 2002).



































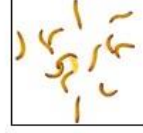
GRUPOS	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
Grupo PBS							
BF-CA 100 mg/kg							
BF-CA 250 mg/kg							
BF-CA 500 mg/kg							
BF-CA 1000 mg/kg							

Figura 18. Avaliação da sobrevivência de *T. molitor* após injeção do BF-CA. Foi inoculado 10 µL do BF-CA entre o 4º e 5º metâmero, no sentido da calda a cabeça, na porção ventral. Foi observado durante sete dias as larvas mortas e vivas, retirando sempre os mortos. A melanização escura são características do estresse ocorrido.

E, assim como outros organismos, *T. molitor* possui um sistema de defesa contra infecções mediadas pela produção de espécies reativas, sendo estas produzidas em excesso em quadros mais críticos (ZHU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016). Devido a capacidade do *T. molitor* produzir espécies reativas em resposta à infecção faz deste inseto um modelo potencial para o estudo de substâncias com caráter antioxidante. Considerando que o BF-CA não é tóxico e que os metabólitos secundários apresentam atividade antioxidante, logo, esse extrato representa um bom indicativo para futuros testes em modelo de infecção.

5.5 Atividade leishmanicida

5.5.1 Atividade antipromastigota do BF-CA e BFI

Ao analisar a concentração inibitória em 50% (IC₅₀) do BF-CA sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, constatou-se que a IC₅₀ (54,9 µg/mL), foi aproximadamente cerca de 78,4 vezes maior do que a pentamidina® (0,7 µg/mL), quanto ao BFI, o mesmo apresentou IC₅₀ de 8,33 µg/mL, sendo 11,9 vezes maior que o medicamento de referência, usado como controle positivo nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração inibitória mínima do BF-CA sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*

Tratamento	IC ₅₀ (µg/mL)**
BF-CA	54,9
BFI	8,33
Pentamidina®	0,7

BF-CA: extrato aquoso do caule de *Bauhinia forficata*.

(**) Concentração inibitória de 50% (IC₅₀) das amostras individuais.

Os resultados de IC₅₀ podem ser observados através da curva dose-resposta do BF-CA nas formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 19 B). Ao avaliarmos a atividade anti-*Leishmania* do BF-CA sobre *L. amazonensis* foi constatado maior atividade nas concentrações (125, 250 e 500 µg/mL), sendo semelhante à pentamidina® na concentração de 250 µg/mL (Figura 19 A).

Os resultados mostraram que o extrato afetou a viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis*. Baseado nesses achados, acredita-se que a presença dos IPs e

dos metabólitos secundários do extrato, como flavonoides e ácidos fenólicos podem estar envolvidos no mecanismo de ação da atividade anti-*Leishmania*.

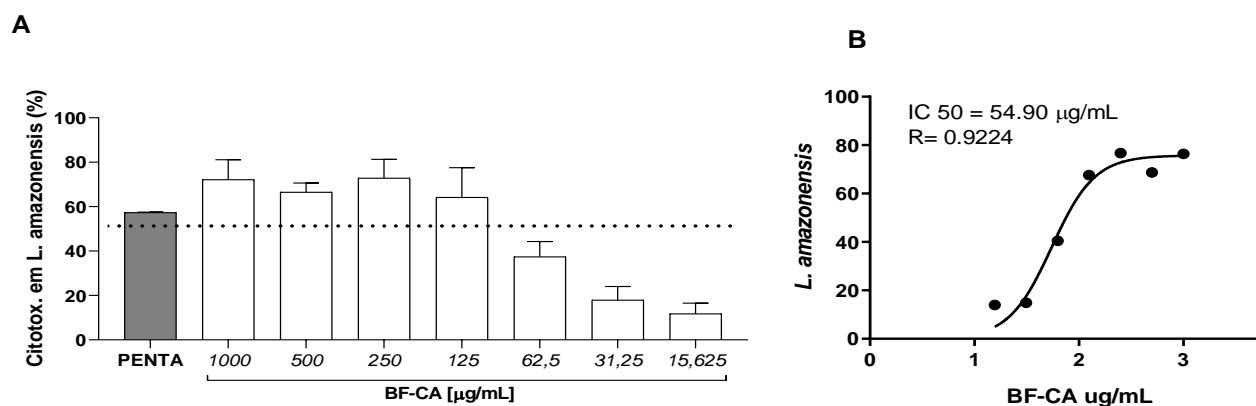


Figura 19. Concentração inibitória mínima do BF-CA sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Foi avaliada a citotoxicidade de várias concentrações do BF-CA (A). Também foi analisada a curva dose-resposta (B) do extrato, no qual inibiu 50% da proliferação celular em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95%). Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação a pentamidina®.

De acordo com os estudos realizados por Tasdemir *et al.*, (2006), foi possível concluir que a quercetina e derivados (7,8 – dihidroxiflavona) possuem atividade antiprotozoários potente e eficaz. A maioria dos compostos mais ativos contra tripanossomas e *Leishmania* têm uma estrutura típica de flavona (2,3 e C-4 da função ceto) e/ou uma subestrutura de catecol sem obstáculos no anel B, no esqueleto benzocromona e em 7,8 – dihidroxiflavona.

Da Silva *et al.*, (2012) e Muzitano *et al.*, (2006) ressaltam que a quercetina (quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-rhamnosídeo), apresentou atividade anti *Leishmania* em promastigotas de *L. amazonensis* e baixa citotoxicidade para as células hospedeiras.

Apesar da predominância dos flavonoides (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002), alguns estudos demonstraram a presença de outras classes de substâncias em *B. forficata*, dentre elas alcaloides, taninos, mucilagens, óleo essencial, triterpenos, saponinas, esteroides e outras de natureza fenólica (DUARTE-ALMEIDA; NEGRI; SALATINO, 2004; MARQUES *et al.*, 2012; MIYAKE; AKISUE; AKISUE, 1986; SARTORELLI; CORREA, 2007).

Quanto a ação do inibidor de protease contra as promastigotas de *L. amazonensis*, constatou-se que o BFI inibiu o crescimento das promastigotas em todas as concentrações (100 – 1,525 µg/mL) (Figura 20 A), sendo sua IC50 de 8,333 µg/mL (Figura 20 B). Isto pode ser explicado porque o BFI em solução pode se auto-associar, pois em alguns géis de eletroforese anteriores (não mostrados) eram observadas bandas de proteínas com pesos múltiplos de 30 kDa, sugerindo auto-associação (COTABARREN *et al.*, 2020).

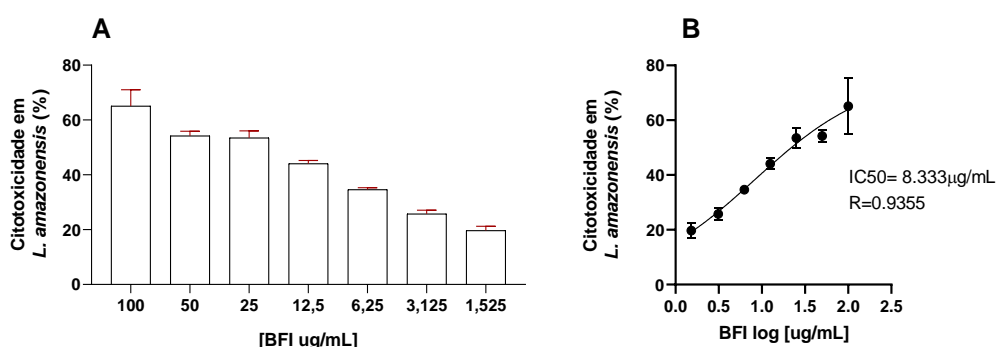


Figura 20. Citotoxicidade do inibidor BFI nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. Foi avaliada a citotoxicidade de várias concentrações do inibidor (100; 50; 25; 12,6; 0,26; 3,126; 1,5625 µg/mL). Também foi analisada a curva dose-resposta (B) inibidor, no qual inibiu 50% da proliferação celular em µg/mL (intervalo de confiança 95%). Os resultados correspondem a (médias ± SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação a pentamidina®.

Em estudo realizado com *L. amazonensis*, foi investigado a ação de três inibidores de serino proteases, de baixo peso molecular, na viabilidade e na morfologia do parasita. Em que os inibidores TPCK e BZA foram mais eficazes na redução da viabilidade do parasita, uma vez que o TPCK na mesma concentração de outro inibidor (TLCK) reduziu cerca de 63% da viabilidade celular após 8 horas, e após 16 e 32 horas seu efeito foi ainda mais potente (SILVA-LÓPEZ *et al.*, 2007).

Sabe-se que as proteases do tipo aspárticas já foram estudadas como alvos terapêuticos para diferentes patologias humanas (VALDIVIESO; DAGGER; RASCÓN, 2007). Em leishmaniose, foi detectada uma atividade lítica capaz de degradar substratos de protease aspártico, atividade essa que foi detectada em *L. amazonensis* e *L. mexicana* (MACHADO *et al.*, 2019; VALDIVIESO; DAGGER; RASCÓN, 2007). E alguns estudos também têm demonstrado a atividade dessa classe de enzimas em

frações solúveis de extratos bruto do parasita (ALVES *et al.*, 2005; VALDIVIESO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010).

5.5.2 Atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. amazonensis*

O extrato (BF-CA) e o inibidor (BFI) reduziram o número de amastigotas de *L. amazonensis* de macrófagos, sendo evidenciado uma redução na taxa de infecção, quando comparadas com o controle (Figura 21).

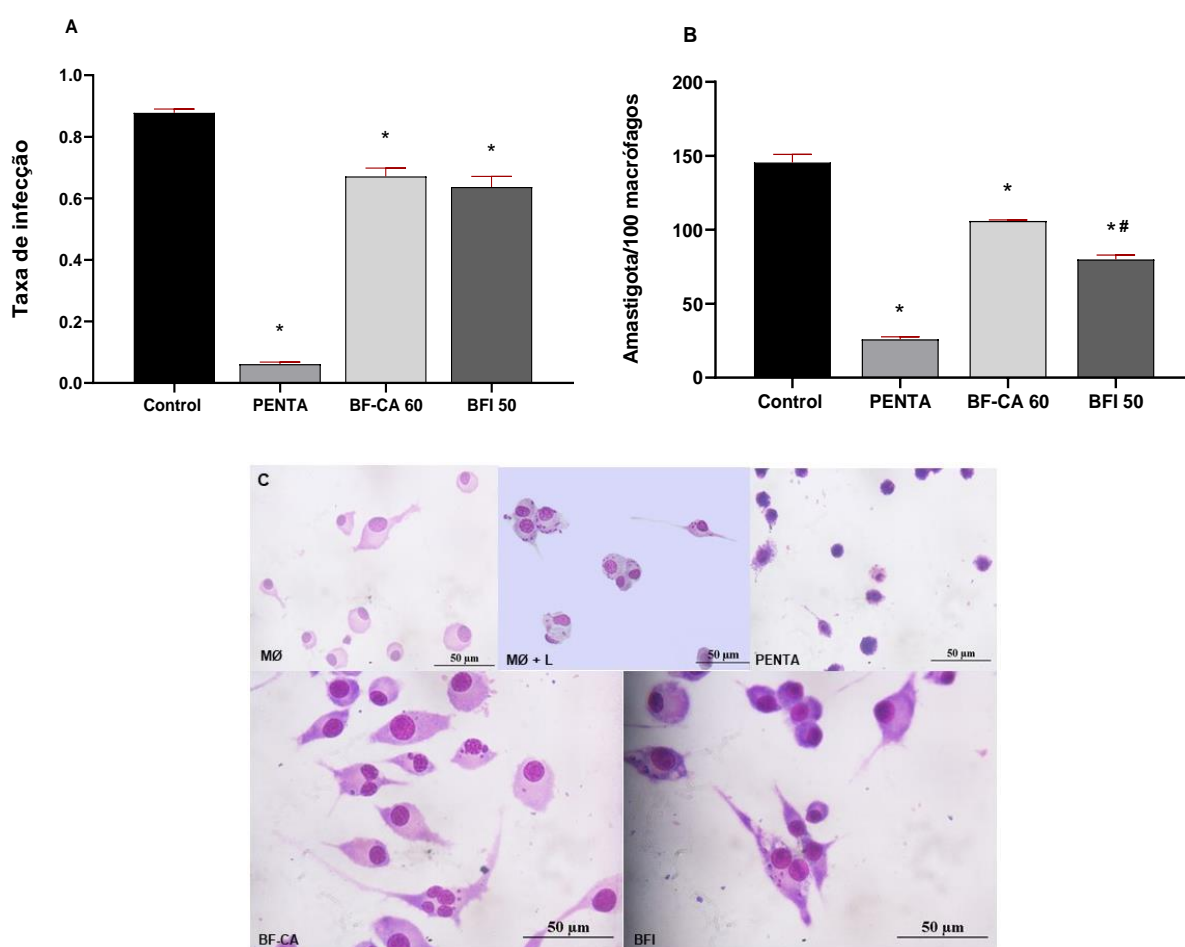


Figura 21. Atividade anti-Leishmania, sobre formas amastigotas de *Leishmania amazonenses*, do BF-CA, BFI e Pentamidina. Taxa de infecção (A); Determinação da porcentagem de amastigotas por macrófagos (B), e imagens por microscopia de luz comum de macrófagos sem leishmania (MØ), macrófagos infectados (MØ + L), tratados com pentamidina (Penta - 5µg/mL), ou extrato (BF-CA) ou com inibidor (BFI). Os resultados correspondem a médias ± EP, de amostras individuais testadas em quintuplicatas. (*) $p < 0,05$, quando comparado com o grupo penta e (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo BF-CA.

A atividade do aspártico protease foi demonstrada tanto em *L. amazonensis* quanto em *L. mexicana*, em que foi realizado o uso combinado de inibidores e substratos cromogênicos e fluorogênicos, específicos para essa classe de enzima (ALVES *et al.*, 2005; VALDIVIESO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2013).

Em outro estudo, foi analisado a atividade de inibidores de aspártico protease do HIV (IPs-HIV) em *L. amazonensis*, em que foi trabalhado moléculas precursoras de síntese dos IPs-HIV, as hidroxietilaminas (HEAs), sendo que de 23 moléculas submetidas à triagem inicial em promastigotas, 15 confirmaram suas atividades sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, todas com IC50 < 5,0 µM (VASCONCELOS, 2015), considerando o inibidor de aspártico protease um potencial alvo contra amastigotas de *L. amazonensis*.

Também foi realizada a quantificação de citocinas, sendo IL-10, IL-6 e TNF-α, IFN-γ e IL-12 e quimiocina MCP-1, não foram identificadas considerações expressivas dessas citocinas, por conseguinte, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8. Dosagem de citocinas (pg/mL) de amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com BF-CA (60 pg/mL), BFI (50pg/mL), Pentamidina (5pg/mL) e controles infectados e não infectados

Grupos	IL-10	IL-6	MCP-1	TNF-α	IFN-γ	IL-12
MØ	0,6 ±0,26	2,4±0,09	0,4±0,17	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
MØ + L	0,7±0,36	2,6±0,04	0,5±0,28	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Penta	1,3±0,01	2,0±0,08	0,3±0,02	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
BF-CA 60	0,8±0,2	2,3±0,40	1,4±0,62	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
BFI 50	0,7±0,2	2,2±0,10	1,8±0,57	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

No presente estudo foram identificados níveis de IL-10 e IL-6 tratados com BF-CA, BFI e Pentamidina, sendo que de acordo com Silva (2018) esse padrão é identificado por macrófagos M1 infectados. Quanto ao fator de necrose tumoral alfa, o mesmo foi detectado apenas em macrófagos não infectados (dados não mostrados).

Quanto ao aumento de IL-6 durante o processo infeccioso de espécies de *Leishmania*, esse aumento é induzido através de via de degradação da GP63, que é uma das moléculas relacionadas à virulência e mais abundante na superfície celular do parasito (OLIVIER *et al.*, 2012). Essas citocinas tem como função o recrutamento, bem como a quimiocina MCP-1, e também atuam na ativação celular de fagócitos para o sítio inflamatório, o que pode favorecer a infecção de novas células na fase aguda principalmente em modelos *in vivo* (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

CONCLUSÕES

- ✓ O extrato aquoso de caule de *B. forficata* possui cerca de 11,4% de proteína e grande teor dos flavonoides, sendo a quercetina, o mais abundante, seguido de kaempferol.
- ✓ Foi isolado um IP do tipo aspártico protease obtido de BF-CA com 30 kDa, denominado BFI, que inibiu 44,66% da atividade da pepsina protease, e 40% da serino protease secretada por *L. amazonensis*, a LSP III.
- ✓ O BF-CA apresentou baixa toxicidade para eritrócitos de carneiro *in vitro* e no modelo *in vivo* de *Tenebrio molitor*, mas demonstrou toxicidade para macrófagos de linhagem RAW. Contudo, apresentou toxicidade significativa para formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- ✓ O BFI apresentou baixa toxicidade em eritrócitos de carneiro *in vitro*, enquanto que nos macrófagos de linhagem RAW apresentou toxicidade com CC50 de 371,3 µg/mL. Nas formas promastigotas de *L. amazonensis* o BFI exibiu toxicidade em quase todas as concentrações com IC50 de 8,33µg/mL.
- ✓ A quantificação de citocinas não apresentaram resultados expressivos, entretanto, devido a leve detecção de IL-10 e IL-6 verifica-se que esse padrão é característico de macrófago do tipo M1.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.0004349>. Acesso em: 15 de maio de 2021.
- AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J. *et al.* Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, out. 2017. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/=20210518004719>. Acesso em 15 de maio de 2021.
- ALMEIDA, M. S. **Leishmania (Viannia) braziliensis, CEPA MCAN/BR/1998/R619: variabilidade no perfil biológico e expressão gênica de proteases**. 2014. 186 p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Ministério da Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- ALMAAYTAH, A.; TARAZI, S.; ALSHEYAB, F.; AL-BALAS, Q.; MUKATTASH, T. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Mauriporin, a Multifunctional Scorpion Venom Peptide. **Int J Pept Res Ther**, v. 20, n. 4, p. 397-408, 2014.
- ALVES, C. R.; CORTE-REAL, S.; BOURGUIGNON, S. C. *et al.* Leishmania amazonensis: early proteinase activities during promastigote–amastigote differentiation in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 1, p. 38–48, jan. 2005.
- ANDRADE, S. S.; SILVA-LUCCA, R. A.; SANTANA, L. A. *et al.* Biochemical characterization of a cysteine proteinase from Bauhinia forficata leaves and its kininogenase activity. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 572–578, fev. 2011.
- BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRIÁ, J. C. *et al.* The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 4, p. 435–443, abr. 1998.
- BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In: **Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases**. [s.l: s.n.]. v. 244p. 1–15.
- BARROS, L. *et al.* Chemical Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of Lantana camara L. (Verbenaceae) Essential Oil. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 209, 10 fev. 2016. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/209>. Acesso em: 15 de maio de 2021.
- BERMUDEZ, H. *et al.* A programme for computer aided identification of Phlebotomine sandflies of the Americas (CIPA): presentation and check-list of American species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 221–230, jun. 1993. Disponível em: [https://www.scielo.br/pdf/mioc/v88n2/vol88n2\(vol88\(f2\)_047-056.pdf](https://www.scielo.br/pdf/mioc/v88n2/vol88n2(vol88(f2)_047-056.pdf). Acesso em: 15 de maio de 2021.

BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. . Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpiniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 93–99, dez. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v13n2/a05v13n2.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_viscerai.pdf. Acesso em: 17 de maio de 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 741 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 17 de maio de 2021.

BRYCESON, A. Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1–2, p. 81–84, 24 nov. 2001.

CAMARA COELHO, L. I; PAES, M.; GUERRA, J. A. *et al.* Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 671–677, 12 mar. 2011.

CANTON, J.; KIMA, P. E. Interactions of pathogen-containing compartments with the secretory pathway. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 1676–1686, nov. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cmi.12000>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

CARVALHO, S. H.; FRÉZARD, F.; PEREIRA, N. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 19 abr. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tmi.13210>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

CASTEJON, F. V. Taninos e saponinas. **Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação-Universidade Federal de Goiás, Goiânia**, 2011.

CHOUHAN, G.; ISLAMUDDIN, M.; WANT, M. Y. *et al.* Leishmanicidal Activity of *Piper nigrum* Bioactive Fractions is Interceded via Apoptosis In Vitro and Substantiated by Th1 Immunostimulatory Potential In Vivo. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 8 dez. 2015. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01368/full>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

COLARES, L. F. **Detecção de inibidores de proteases em cinco espécies vegetais nos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**. 2016. 58 p. Dissertação (Mestrado Profissional) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Ambiente e Sociedade, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni, 2016.

COLARES, L. F.; NETO, S.; CORDEIRO, I. H. *et al.* Detecção de inibidores de proteases em sementes de *Punica granatum*. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 2709274, 21 nov. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v40n3/0100-4042-qn-40-03-0270.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitology**, v. 114 Suppl, p. S61-80, 1997.

CORREIA, D.; MACEO, V. O.; CARVALHO, E. M. *et al.* Estudo comparativo entre antimoniato de meglumina, isotianato de pentamidina e sulfato de aminosidine, no tratamento de lesões cutâneas primárias causadas por *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 5, p. 447–453, out. 1996.

COTABARREN, J.; LUFRANO, D.; PARISE, M. G. *et al.* Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, v. 292, p. 110398, mar. 2020.

CUNHA, J. C. L.; CARDOSO, A. R. P.; FEIJÃO, E. X. *et al.* Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Ceará, Brasil, no Período de 2007 a 2016. **Cadernos ESP, Ceará**, v. 11, n. 2, p. 10–17, 2017.

CUNHA, L. F. **Plantas do cerrado brasileiro: triagem fitoquímica e de atividades biológicas de espécies nativas do município de Diamantina, região do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais**. 2016. 317 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 8, p. 747–753, ago. 2004.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A.. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current Opinion In Microbiology**, v. 26, p.32-40, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007>.

FERREIRA EC, DE MELO LA, G. C. Leishmanioses do novo mundo. **Cad Tec Vet Zootec**, v. 65, p. 9–27, 2012.

- GALATI, E.A.B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas**. Vol I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo.2019. 132p. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/~egalati/>.
- GASPARETTO, C. M. **Propriedades biológicas e toxicológicas de Bauhinia forficata Link (Fabaceae)**. 2014. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juíz de Fora, Juiz de Fora, 2014.
- HEGNAUER, R.; J. GPAYER-BARKMEIJER, R. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3–16, ago. 1993.
- HELLINGER, R.; GRUBER, C. W. Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 9, p. 1877–1889, set. 2019.
- KAPLAN, A. P. The Bradykinin-Forming Cascade: A Historical Perspective. **Chemical immunology and allergy**, v. 100, p. 205–213, 2014.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604–614, 2011.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- LI, Z.; ZHANG, Y.; SUN, L. *et al.* Simultaneous quantification of hyperin, reynoutrin and guaijaverin in mice plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 7, p. 1124–1130, jul. 2016.
- LIÉVIN-LE MOAL, V.; LOISEAU, P. M. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. **FEBS Journal**, v. 283, n. 4, p. 598–607, fev. 2016. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.13601>. Acesso em: 15 de maio de 2021.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 14–24, 2007. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/78/77>. Acesso em: 15 de maio de 2021.
- LIMA, P. C.; SANTOS, M. G.; CALABRESE, K. S. *et al.* AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS DO CERRADO. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, 2 abr. 2015. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/iptsp/article/download/34800/18551>. Acesso em: 15 de

maio de 2021.

SILVA, Luis Douglas Miranda et al. **Ivestigação do processo de polarização em macrófagos m1 e m2 durante infecção por Leishmania amazonensis**. 2018.

LUNA, E. J. DE A.; CAMPOS, S. R. DE S. L. DA C. O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. suppl 2, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/csp/v36s2/1678-4464-csp-36-s2-e00215720.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

MACHADO, P. DE A.; CARNEIRO, M. P. D.; SOUSA-BATISTA, A. J.; *et al.* Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. **Life Sciences**, v. 219, p. 163–181, fev. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30641084/>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, jun. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22924419/>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F. *et al.* Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de Bauhinia forficata link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517–522, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v35n3/14.pdf>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MATSUMOTO, H.; HANIU, H.; KOMORI, N. **Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE**. In: [s.l: s.n.]. p. 101–105.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S. *et al.* Hypoglycemic activity of two Brazilian Bauhinia species: Bauhinia forficata L. and Bauhinia monandra Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8–13, mar. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a03v17n1.pdf>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

MICELI, N. BUONGIORNO, L. P.; CELI, M. G. *et al.* Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of Bauhinia forficata Link. (Fabaceae) leaves extract. **Natural Product Research**, v. 30, n. 11, p. 1229–1239, 2 jun. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26118983/>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

MORAES, E. A. PÉRICO, E.; REMPEL, C. *et al.* Avaliação do perfil glicêmico de portadores de Diabetes Mellitus tipo II em UBSs que utilizam infusão de folhas de Bauhinia forficata Link. **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 4, p. 569–574, 30 dez. 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237042367>. Acesso em: 17

de maio de 2021.

MORGADO-DIAZ, J. A. *et al.* Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68 kDa in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 377-383, jul. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762005000400007&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 22 de maio de 2021.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A.; DE FILIPPS R. A.; **Medicinal Plants of Brazil**; Reference Publications, Inc.: Algonac, MI, 2000, p. 501.

MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. *In*: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (org). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007. p. 183-207.

MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C. *et al.* The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 2071–2077, set. 2006.

MIYAKE, E. T.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Caracterização farmacognóstica da pata-de-vaca *Bauhinia forficata* Link. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 58–68, 1986.

NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*, 11^a ed, São Paulo, Atheneu, 2005.

OLIVA, M.L.V. **Isolamento e caracterização preliminar de inibidores de proteases de sementes de *Enterobium contotiliguum*, *Torresea cearenses*, *Bauhinia petandra* e *Bauhinia bahinoides***. 1986. Tese (Doutorado). Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

OLIVA, M. L.; MENDES, C. R.; CHAGAS, J. R. *et al.* Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1–3, p. 163–9, dez. 1999.

OLIVEIRA, C. Z.; MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S. *et al.* Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1–2, p. 213–216, abr. 2005.

OLIVEIRA, F. DE; SAITO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2-3–4, p. 170–196, 1989. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbfar/v2-3-4/a13v2-3-4n1.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

OLIVEIRA, R. M.; LIMA, R. A. Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Bauhinia forficata* L. E SEU POTENCIAL CANDIDACIDA. **South American Journal**

of **Basic Education, Technical and Technological** , [S. l.], v. 4, n. 1, 2017. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/1082>. Acesso em: 12 marco. 2021.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Controle de doenças tropicais: as leishmanioses**. Geneva: OMS, 2020. 17 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CTD-ICO-93.2>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2021.

PACHECO, J. S; SILVA-LÓPEZ, R. E. DA. Study of the Proteolytic Activity of the Tropical Legume *Crotalaria spectabilis*. **Z. Naturforsch**, v. 67, n. 15, 2012. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-2012-9-1008/pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

PASSARINI, G. M. **Avaliação da atividade antiplasmodial e leishmanicida in vitro compostos de cascas e flores de *Combretum leprosum***. 2017. 93 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2017.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. D. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 1996.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C. *et al.* Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 7, 8 dez. 2004. Disponível em: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A. A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, n. 11, p. 1294–1300, nov. 2008. Disponível em: <http://kinampark.com/PL/files/Petitti%202008%2C%20Controlled%20release%20of%20drug%20encapsulated%20as%20a%20solid%20core%3ATheoretical%20model%20and%20sensitivity%20analysis.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JÚNIOR, A.; SZPOGANICZ, B. *et al.* Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466–469, ago. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v26n4/16423.pdf>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 7 jan. 2013.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 26^o ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. 1. ed. [s.l.] São Paulo: Editorial premier, 1997.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1076–1082, 1 maio 1998.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, dez. 2014. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/10092/2/andre_roqueejansen_IOC_2014.pdf. Acesso em 15 de maio de 2021.

ROYCHOUDHURY, J.; SINHA, R.; ALI, N. Therapy with Sodium Stibogluconate in Stearylamine-Bearing Liposomes Confers Cure against SSG-Resistant Leishmania donovani in BALB/c Mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17376, 10 mar. 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017376>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SABINO, A. C. O. N. E CLÁUDIA V. S. Revisão do Gênero Bauhinia Abordando Aspectos científicos das espécies de *Bauhinia forficata* Link e *Bauhinia variegata* L. de Interesse para a Indústria Farmacêutica. **Revista Fitos**, v. 7, n. 2, p. 77–84, 2012. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/19201/2/6.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; SILVA, M. P. *et al.* Effects of Bauhinia forficata Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/8902954/>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SAMPAIO M.U., SAMPAIO C.A.M., OLIVA M.L.V. Isolation and Characterization of Plant Inhibitors Directed Against Plasma Kallikrein and Factor XII. *In*: ABE, K.;

MORIYA, H.; FUJI, S. *et al.* **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Springer: Boston, 1989.

SANTOS, B. C.; SILVA-LÓPEZ, R. E. **Atividade inibidora de proteases de *bauhinia forficata* com potencial leishmanicida**. 2014. MONOGRAFIA (Pós Graduação em Microbiologia) - Fundação Técnico Educacional Souza Marques, Rio de Janeiro, RJ.

SANTOS, L. O.; MARINHO, F. A.; ALTOÉ, E. F. *et al.* HIV Aspartyl Peptidase Inhibitors Interfere with Cellular Proliferation, Ultrastructure and Macrophage Infection of Leishmania amazonensis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. e4918, 26 mar. 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004918>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SANTOS, L. O.; VITÓRIO, B. S.; BRANQUINHA, M. H. *et al.* Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 348–353, 1 fev. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543121/>. Acesso em 15 de maio de 2021.

SARTORILLI, P.; CORREA, D. S. Constituents of Essential Oil from *Bauhinia forficata* Link. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 5, p. 468–469, set. 2007.

SHANKER, G.; KUMAR, C. K.; GONUGUNTA, C. S. R. *et al.* Formulation and Evaluation of Bioadhesive Buccal Drug Delivery of Tizanidine Hydrochloride Tablets. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 530–539, 8 jun. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690804/>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. DO C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 183–188, mar. 2012. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S001448941200032X?token=295DCBE09CE7973680BF5FB4647FF144C2FE643BBD54835B921C50A38AEC469D5E3D355823801C8BC9DBDF42E3BE1DF0&originRegion=us-east-1&originCreation=20210518010822>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SILVA, K. R. **Avaliação hematológica, bioquímica e clínica do uso de dietilditiocarbamato (DETC) no tratamento in vitro e in vivo da leishmaniose visceral canina natural e experimental**. 2016. 179 p. Tese (Doutorado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

SILVA, A. S.; MACIEL, G. A.; WANDERLEY, L. S. L. *et al.* Indicadores do uso de medicamentos na atenção primária de saúde: uma revisão sistemática. **Rev Panam Salud Publica**, Caruaru, v. 41, n. 132, p. 1-12, 2017. DOI: 10.26633/RPSP.2017.132. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34434/v41e1322017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 17 de maio de 2021.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos**, v. 4, n. 01, p. 108-119, 2009. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/15748/2/11.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SILVA-LOPEZ, R. E.; PINTO COELHO, M. G.; DE SIMONE, S. G. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 85–96, 28 jul. 2005.

SILVA-LÓPEZ, R. E. DA. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o

desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v33n7/a22v33n7.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SILVA-LOPEZ, R. E.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MENNA-BARRETO, R. S. F. *et al.* Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigotes. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1627–1635, 2 out. 2007.

SILVA-LÓPEZ, R. E.; SANTOS, B. C. Bauhinia forficata Link (Fabaceae). **Revista Fitos**, v. 9, n. 3, 2015.

SILVA LOPEZ, R. E. DA; DE SIMONE, S. G. A Serine Protease from a Detergent-soluble Extract of Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 7–8, p. 590–598, 1 ago. 2004.

SILVA, A.; MACIEL, G. A.; WANDERLEY, L. S. L. *et al.* Indicadores do uso de medicamentos na atenção primária de saúde: uma revisão sistemática. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 41, n. 132, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://www.scielosp.org/article/rpsp/2017.v41/e132/>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SILVA, C. C. A. DA. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 24, p. 668–72, 2002. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V71_3/andrade.PDF. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SILVA, K. L. DA; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449–454, maio 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v25n3/9339.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

SILVA, T. A. **Avaliação de Mg, Al HDL como carreador de Sb (V), a partir de antimoniato de meglumina, visando uma alternativa para a quimioterapia da Leishmaniose**. 2017. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal do Alagoas, Maceió, 2016.

SINHORIN, G. T.; SILVA, A. L.; BARRIUNUEVO, L. *et al.* Arritmia causada por uso de antimônio pentavalente. *In: Congresso Regional de Emergências Médicas (CREMED-CO)*. 2020, Várzea Grande. **Anais [...]**. Acre: Centro Universitário de Várzea Grande (UNIVAG), 2020. Disponível em: [file:///C:/Users/Aline%20Santana/Downloads/1466-4526-2-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Aline%20Santana/Downloads/1466-4526-2-PB%20(1).pdf). Acesso em: 17 de maio de 2021.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R. *et al.* Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1352–1364, abr. 2006. Disponível em:

<https://aac.asm.org/content/50/4/1352>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

VALDIVIESO, E.; DAGGER, F.; RASCÓN, A. Leishmania mexicana: Identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 77–82, maio 2007.

VASCONCELOS, M. F. DE. **Atividade de análogos de inibidores de protease do HIV contra Leishmania spp.** [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2015.

VAZ, A.M.S.F. Bauhinia. *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 5, p. 540–557, 2 maio 2020.

VERSTEG, N.; SILVA, C. C.; GIORDANI, C. *et al.* Determinação da citotoxicidade de extratos hidroalcoólicos de plantas da família lamiaceae e fabaceae. *In: Congresso de Iniciação Científica*, 26, 2017, Pelotas. **Anais [...]**. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Pelotas, 2017. Disponível em: https://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2017/CA_04435.pdf. Acesso em: 17 de maio de 2021.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, set. 2004. Disponível em: <https://www.jbc.org/action/showPdf?pii=S0021-9258%2820%2972801-2>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

YASUR-LANDAU, D.; JAFFE, C. L.; DAVID, L. *et al.* Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004341, 6 jan. 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004341>. Acesso em: 15 de maio de 2021.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, nov. 1998.

ZHU, J.-Y.; SANG-ZI, Z.; STANLEY, Z. W. *et al.* Parasitization by scleroderma guani influences expression of superoxide dismutase genes in *Tenebrio molitor*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 40–52, set. 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**. 1996.

APÊNDICE

Artigo submetido à revista Pathogens and Global Health
QUALIS B2

Protease inhibitor activity of plant natural products as leishmanicidal agents

Aline Santana Figueredo^a, Joana Neres Ferreira Assençõ^a, Arthur André Castro da Costa^b, Raquel Elisa da Silva López^c and Mayara Cristina Pinto da Silva^a

^aPrograma de Pós Graduação em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil; ^b Programa de Pós Graduação em Ciência da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil; ^cDepartamento de Produtos Naturais, Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, Rio de Janeiro, Brazil,

ABSTRACT

Objective: Investigate plant natural products with inhibitory activity of *Leishmania* proteases and their growth becomes crucial, because the inhibition of certain parasite proteases induce the parasite death. **Methods:** Descriptive/exploratory study, integrative review type. The search was performed in the following databases: Scientific Electronic Library OnLine (SciELO), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), Latin American and Caribbean Health Science Literature Database (LILACS) and PUBMED. The descriptors were used in combination, from the consultation in the Descriptors in Health Sciences (DECS) and Medical Subject Headings (MeSH), were: (*Leishmania*) AND (Protease Inhibitor) AND (Vegetable extracts); (*Leishmania*) AND (Protease Inhibitor) AND (Plant Extracts). Studies in English and Portuguese, published between 2000 and 2020, were included. Finally, the articles were categorized and analyzed. **Results and discussion:** This review included eight studies, published between 2000 and 2020. There were two publications in 2014, 2017 and 2019, in relation to the language, all eight studies were published in English. Five studies were carried out in India, two in Brazil and one in Iran. Seven of these were found in PUBMED database and one from MEDLINE, all were experimental, comprising *in vitro* research or using mice as animal models. **Conclusions:** Researches about plant extracts with *Leishmania* growth inhibitors and protease inhibitors are relatively recent, and further investigations on the subject are necessary, because protease inhibitors are employed in the treatment of many diseases.

KEYWORDS: plants, natural products; *Leishmania*; proteases; protease inhibitor; Leishmaniasis.

Introduction

Leishmaniasis are chronic infectious diseases caused by species of obligate intracellular protozoa from *Leishmania* genus (Trypanosomatidae family and Kinetoplastida order), which generally, are transmitted by vectors insects to mammalian hosts [1]. The parasite can also be transmitted by transplacental, blood transfusion and through contaminated needles [2]. They are endemic in 92 countries from tropical and subtropical areas in the Old and New World, affecting poor

populations living in precarious sanitary conditions. There are believed to be 68 million people living at risk for these diseases, 12 million infected individuals and an estimated 700,000 to 1 million cases annually. Leishmaniasis is classified as one of the most neglected tropical diseases, with high morbidity and low mortality [3].

Currently, about 54 species of *Leishmania* genus have been reported, and at least 21 of them are pathogenic to humans [4]. Promastigote parasites are transmitted through the bites of infected female sandflies, which feed on blood to produce eggs. Approximately 70 animal species, including canids, rodents, marsupials, mongooses, bats, cats, hyraxes, and humans, have been found as natural reservoir hosts of *Leishmania* parasites, therefore, the disease can be classified as zoonoses, anthroozoonosis or anthroponose, although few species are strictly anthroponotic [5].

Protozoan parasites from *Leishmania* genus have a digenetic life cycle. They live alternately into vertebrate hosts and insect vectors (*Psychodidae* family, *Phlebotominae* subfamily, *Phlebotomus* and *Sergentomyia* genera in the Old World and *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, and *Warileya* in the New World), and exhibit two morphological forms: the extracellular promastigote form is motile, elongated with free flagellum and is found into the digestive tract of sandfly, and the amastigotes intracellular form, that is rounded, smaller with non-exteriorized flagellum that infect lysosomal vacuoles in phagocytic cells [6,7]. In the digestive tract of vector, promastigotes transform themselves in the non-dividing, infectious 'metacyclic' promastigotes that are transmitted by sandfly bite. These promastigotes are phagocytosed by phagocytes, such as macrophages, and inside these cells they survive, multiply, cause the lysis of the host cells, releasing amastigotes that infect neighboring macrophages [2].

The clinical manifestations of leishmaniasis range from the self-healing cutaneous (CL), the mucocutaneous skin ulcers (MCL) and the diffuse cutaneous (DCL) in cellular-mediated immune response deficient hosts to the lethal visceral (VL) form (visceral leishmaniasis or kala-azar) and postkala-azar dermal leishmaniasis [8,9]. This clinical spectrum is related to *Leishmania* species that is involved. The epidemiology of these diseases depends on the characteristics of the parasite and sandfly species, the local ecological characteristics of the transmission sites, current and past exposure of the human population to the parasite, and human behaviour [2,9,10].

The leishmaniasis-related disabilities impose a great social burden, and reduce the economic productivity in endemic areas. It has also been observed that infected people with MCL live in isolation because to the social stigma of deformities and disfigurement scars [2]. Furthermore, *Leishmania*–HIV co-infection have been observed in areas where both diseases are endemic, and are associated to high mortality, because the low response to chemotherapy representing an important challenge in the public health [11].

Leishmaniasis treatment

There are no approved and available vaccines for human leishmaniasis. Thus, programs of prevention that include individual protection (protective nets and repellents), vector control (insecticides), and chemotherapy are the main mechanisms to handle this disease [12].

Since 1940s, pentavalent antimony compounds, for example Glucantime and Pentostam, or branded other formulations, have been the mainstays of antileishmanial therapy. Although they have good therapeutic index, their administration is parenteral with high dosages many doses a day, consequently they induce severe side-effects, such as myalgia, abdominal pain, liver, heart and kidney changes, the patients give up the treatment, and drug resistance has also been observed [2,13]. Besides, the parasite persists in the scars of clinically cured patients [14]. The treatment of leishmaniasis is very expensive when compared with other tropical diseases, contributing to the worsening of the disease [15].

In all parts of the world, including in Brazil, Glucantime is the first choice drug, being effective for CL, MCL and LV because the success in regressing the clinical and hematological manifestations of parasite infection [16]. Besides, this drug has fast excretion within 48 hours by the kidneys it is necessary to administer high doses to obtain efficacy in the treatment, but this can induce to the patient's death [17, 18].

The mechanism of pentavalent antimony compounds action is the inhibition of glycolysis and the β -oxidation enzymes of Leishmania. However, antimony is a heavy metal, it is not a selective drug and interfere with other metabolic pathways of parasites and hosts. Furthermore, these drugs can interact with the zinc finger domain of proteins, and many proteins have this motif in their tridimensional structures, explaining the high toxicity of these compounds [2,12,13].

The leishmaniasis second-line drugs are employed in endemic areas with high rates of unresponsiveness to antimonial chemotherapy. They are pentamidine, amphotericin B, allopurinol, and more recently, miltefosine, paramomicine and sitamaquine [19]. However, they are more toxic, expensive, and have low therapeutic index when compared to antimony compounds. Pentamidine and amphotericin B are the most employed. Pentamidine is administered in cases of non-response to antimonials or patients with VL, but it has important restrictions due to the high toxicity, that include hypoglycemia, hypotension, cardiac alterations, nephrotoxicity and even sudden death [20]. Amphotericin B was previously used as an antifungal, but it has been used in the treatment of MCL due to the expressive leishmanicidal effect [21]. However, it induced several adverse effects such as seizures, chills, fever, anemia, anorexia, and decreased kidney function. This antifungal is incorporated into the macrophage, killing the Leishmania [22]. Their toxic effects are caused by the interaction with ergosterol and episterol in parasites membranes, and the binding to cholesterol present in the host's cells plasma membrane [23]. To reduce these side effects, three formulations were developed to be released inside the infected cells: liposomal amphotericin B, lipid complex amphotericin B and colloidal dispersion amphotericin B. Clinical studies for VL treatment demonstrated good tolerability and

no signs of renal and hepatic toxicity [24, 25, 26]. The major disadvantage of these formulations is the high cost, restrict the use in public health services [27].

More recent drugs, as miltefosine showed to be ineffective, and considered harmful to patients due to the gastrointestinal toxicity. Besides, the low sensitivity to some species of *Leishmania* in some geographic regions, restricted its use [28]. Paramomycin when combined with antimonials reduces the duration of therapy, and has the advantage of fighting coinfections, but it can cause nephrotoxicity and damage to the eighth cranial nerve [29].

Leishmania proteases as therapeutic targets

The target identification is one of the most important step in the rational drug development. It should be absent, or different from the host homolog, in order to be exploited as a drug target. *Leishmania* biochemical pathways that guarantee the parasite survival, proliferation, and infection are targets that have been investigated. They are enzymes that regulate or participate in biosynthesis of sterol, hypusine, folate, and glycosylphosphatidylinositol; glycolysis; purine salvage; glyoxalase and trypanothione systems, or special enzymes such as protein kinases, topoisomerases and proteases [2,30].

Proteases or peptidases catalyze the cleavage of peptide bonds in proteins and peptides, originating peptides of various sizes and free amino acid [31]. They are found in all organisms, organs and organelles, and participate in many essential physiological processes, such as amino acid assimilation, cell death, differentiation, digestion of extracellular matrix, growth of tissues and organs, and in microorganisms they are important virulence factors [2,32].

These enzymes are classified according to the catalytic amino acid or a metal in the active site: serine, cysteine, aspartic, treonine, glutamic, asparagine, and metalloproteases [33]. In *Leishmania* were described cysteine, serine, aspartic, treonine, and metalloproteases [34].

Several studies indicated that *Leishmania* proteases are involved in the invasion of host tissues, differentiation in the parasite's life cycle, proliferation and growth, modulation and escape from the host's immune system, nutrition, metabolism of biologically active proteins or peptides, survival within macrophages, signaling, paths of death and sustain the process of infectious diseases, or even in the parasite's resistance to drug therapy. Thus, *Leishmania* proteases are important virulence factors, and potential therapeutic targets for the leishmaniasis treatment [2,12,32].

Cysteine proteases is the best-characterized group enzymes in *Leishmania* and they have their sequences in databases and genes isolated. These enzymes belong to Clan CA and the papain-like protease superfamily. These parasites express a broad range of cysteine proteases (CPs), and the best characterized of which are CPA, CPB, and CPC (CPs A, B, and C). CPA and CPB are cathepsin L-like and show some functional redundancy, while CPC is cathepsin B-like [35]. Inhibitors of *Leishmania*

CPs, indicated that these enzymes are involved in macrophages infection, amastigotes survival in these host cells, as well as they are modulators of the host's immune response, suggesting that these CPs are virulence factors of these parasites [36,37,38].

Many compounds such as, vinyl sulfone, dihydrazide, palladacycle, and organotellurane, have showed success in vivo treatment of CL and VL by CPC inhibition [39], and in vitro assays identified multiple compound classes active against CPB (e.g., semicarbazones, thiosemicarbazones, triazine nitriles [40], and benzophenones [41]). Although CPs inhibitors seems to be promising, the activity of CPA, CPB, and CPC families would be blocked to prevent parasite invasion and replication in host cells. Non-selective inhibitors can also inhibit the host CPs.

Another enzyme already described in *Leishmania* is the metalloprotease, called glycoprotein 63 (gp63) or leishmanolysin, being described as the largest antigen expressed on the surface of the promastigote form of several species. This enzyme is one of the main surface components present in all species of the *Leishmania* genus, especially in the promastigote forms, representing more than 1% of the total parasite proteins [42].

Studies demonstrate that gp63 has a protective activity against *Leishmania* degradation by the phagolysosome. In another study, decreased survival rate of attenuated strains was associated with a 20-50% reduction in *Leishmania* gp63 expression. In another study, it was shown that proteins incorporated in liposomes coated with *L. mexicana* gp63 were protected from the phagocytic action of macrophages. After gp63 denaturation, phagocytic action was observed, thus corroborating the protective action of gp63 in phagocytosis [43, 44].

Therefore, proteases are important virulence factors for the parasite, ensuring the survival and maintenance of infection by the parasite, being those of the serine, metal, aspartic, threonine and cysteine types described in *Leishmania*, and among these, the most studied proteases in *Leishmania* are of the cysteine class. And the inhibition of these proteases by specific inhibitors can interfere with the development of leishmaniasis, thus being a potential therapeutic alternative.

Plant protease inhibitors

Many plants are used by traditional communities, and in many developing countries a large part of the population depends on the use of plants to treat their diseases [47]. Based on this knowledge of popular use, studies are carried out with plant extracts from different families or with metabolites from the most diverse chemical classes isolated from these extracts, among these classes, many perform anti-*Leishmania* activity, such as protease inhibitors.

Proteases and protease inhibitors (PIs) are a class of proteins participating in the biochemical duel between plants, phytopathogenic microorganisms and insect pests [47, 40]. They act as regulatory agents for proteolysis in several organisms and

in plants in particular, constituting important defense strategies against predators and pathogens, since plants do not have an immune system [48].

In plants, the first report on a protease inhibitor was made by Read and Haas, in 1938 [49]. The first works were related to animal nutrition. Due to the deleterious effects of this category of proteins found in many plants used in the diet of animals for slaughter, they initially became known as anti-nutritional factors [43].

The first well-characterized inhibitor was soybean trypsin (KUNITZ, 1947) [50], which was isolated, crystallized and complexed with pig trypsin, being the first classical methodological model for the biochemistry of protease inhibitors. Shortly thereafter, the first study of plant protease inhibitors was done by Borchers and Ackerson (1947) [51, 52].

Until 1976, only one highly specific inhibitor for a microbial protease had been well isolated from plants, the subtilisin inhibitor, from barley. In the same year, it was observed that trypsin and chymotrypsin inhibitors present in soybean and bean seeds and also in potatoes were able to suppress the activity of proteases secreted by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. [53].

Similar results were later obtained on the action of other PIs on extracellular enzymes, growth and development of phytopathogenic microorganisms [40].

Therefore, PIs in plants may be able to suppress the enzymatic activity of phytopathogenic microorganisms. These inhibitors can also be synthesized constitutively or the synthesis induced in response to attack by external agents [47]. Thus, the present work aimed to raise information about plant extracts active against *Leishmania* proteases [30, 54, 55].

Methods

This research is a descriptive/exploratory study, of the integrative review type. Therefore, the present review was organized following the Prisma recommendation (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), with the elaboration of a four-step flowchart, which are described below and illustrated in Figure 1. The Prisma recommendation consists of a checklist with 27 items and a four-step flowchart, allowing both to improve the reporting of systematic reviews and meta-analyses and to assist in the critique of published systematic reviews [56].

Step 1 – the search for articles was performed in the following databases: Scientific Electronic Library OnLine (SciELO), Online Medical Literature Analysis and Retrieval System (MEDLINE), Latin American and Caribbean Health Science Literature Database (LILACS) and PUBMED. The descriptors were used in combination, from the consultation in the Descriptors in Health Sciences (DECS) and Medical Subject Headings (MeSH), were: (Leishmania) AND (Protease Inhibitor) AND (Vegetable extracts); (Leishmania) AND (Protease Inhibitor) AND (Plant Extracts).

Step 2 - was read the titles to check overlapping of studies between the lifts of the four databases and for deletion of articles prior to 2000.

Step 3 – Articles in English, Portuguese and Spanish, published between 2000 and 2021, in article format and available in full, were included. Which obeyed the following guiding question: "Which plant extracts are active against leishmania proteases?"

Previous articles, theses, dissertations, technical reports, reviews, book chapters, editorials, letters to the editor and newspaper articles were excluded.

Step 4 – finally, the selected articles were read in full for further categorization and analysis by year, journal, database, language and location of the study, after having applied all the eligibility criteria.

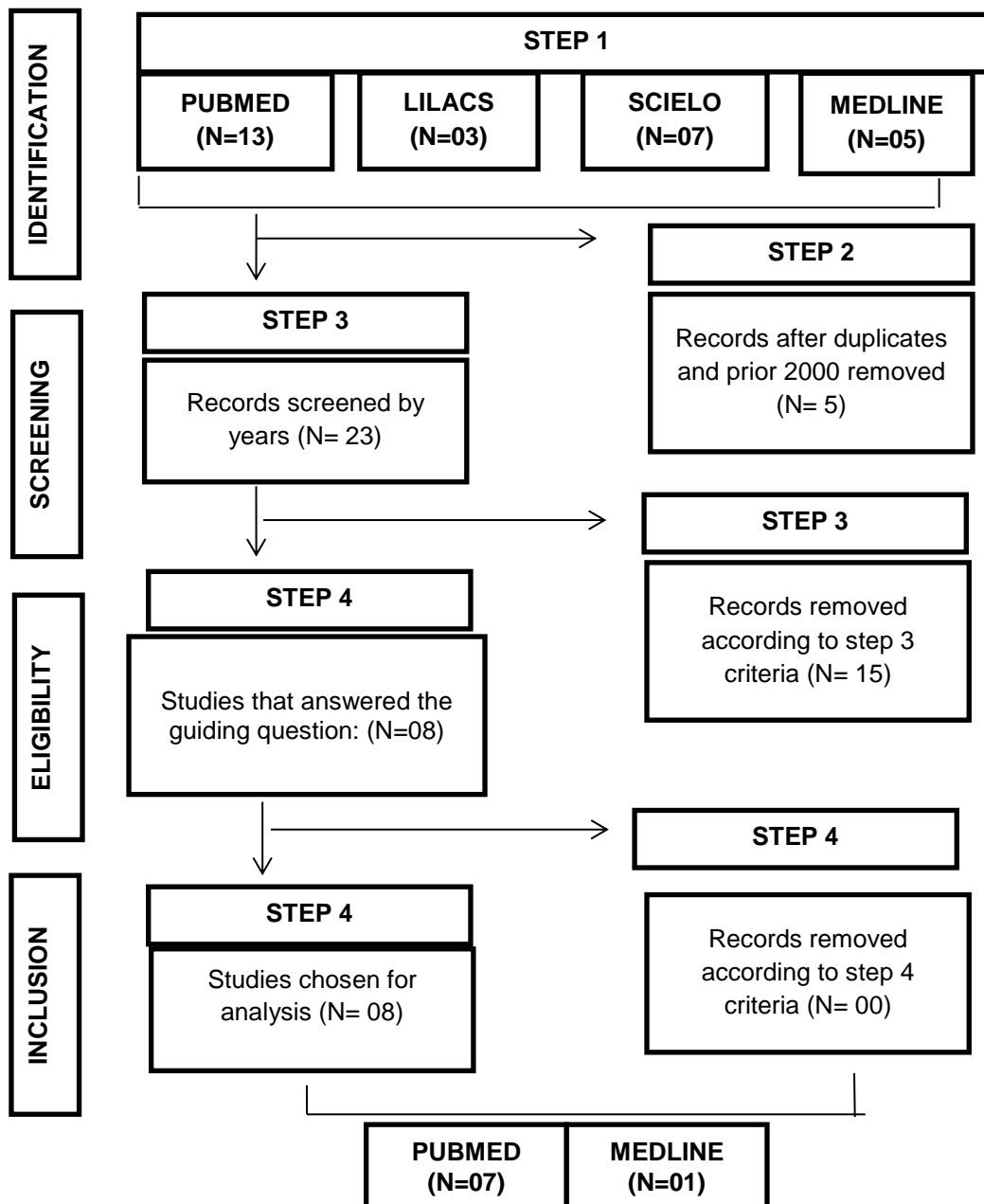


Figure 1. Flowchart of article selection, according to the PRISMA method, 2020.

Results and discussion

Eight studies were included, published between 2000 and 2020. With more publications in 2019 and 2014, with two publications each, all studies were in English, five studies were carried out in India and two in Brazil and one in Iran, as the basis of data, seven studies were from PUBMED and one from MEDLINE, all experimental studies, in vitro or in vivo (Table 1). The synthesis of the studies was also carried out, regarding the objective, type of Leishmania, evolutionary form, plant/plant part, type of extract and type of protease inhibitor in Leishmania (Table 2).

Table 1. Description of the articles used in this study, according to the journal, year, databases, languages, places of study and types of study.

Journal	Year	Data base	Country
Experimental Parasitology	2017	PubMed	India
Biomedicina & Pharmacotherapy	2019	PubMed	India
Journal of Global Antimicrobial Resistance	2019	PubMed	Iran
International Immuno-pharmacology	2020	PubMed	India
Journal of Medicinal Food	2011	PubMed	Brazil
Experimental Parasitology	2014	Pubmed	India
Current microbiology	2017	Pubmed	India

Table 2: Synthesis of studies according to Objective; *Leishmania* species; Evolutionary form; Plant/plant part; Type of extract; and Target enzyme.

Reference	Objective	<i>Leishmania</i> species	Evolutionary form	Plant/ Vegetable Part	Extract	Target enzyme
Rodrigues et al., (2014) [67]	To evaluate the anti- <i>Leishmania</i> effects of the hexanic extract of <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot leaves	<i>L. amazonensis</i> <i>L. infantum</i>	Promastigote	<i>Arrabidaea chica</i> (HBK) Verlot (leaves)	Hexanic	Peptidase
Inácio Filho (2018) [69]	To study the effect of EGCG (epigallocatechin-3-gallate) <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> , its associations and molecular mechanism of action in <i>Leishmania infantum</i>	<i>L. infantum</i>	Promastigote Amastigote	Green tea (epigallocatechin-3-gallate)	Ethanolic	Trypanothione Reductase
Paik et al., (2014) [62]	To evaluate the anti- <i>Leishmania</i> potential of the fraction of crude extract from <i>Solanum tuberosum</i> (L.), rich in serine protease inhibitors, targeting <i>Leishmania</i> serine proteases	<i>L. donovani</i>	Promastigote	Tuber of <i>Solanum tuberosum</i> (L.)	Ethanolic	Serine protease
Pereira et al., (2011) [58]	To evaluation of <i>Leishmania</i> protease inhibitory activity of hexanic, ethyl acetate and ethanol extracts; and bioflavonoid fukugetin, from the pericarp of the fruit of <i>Garcinia brasiliensis</i> (Mart).	<i>L. amazonensis</i>	Amastigote	<i>Garcinia brasiliensis</i> (pericarp)	Ethyl acetate	Protease
Das et al., (2015) [76]	To evaluate the anti- <i>Leishmania</i> activity <i>in vitro</i> of Cg-Ex, targeting the <i>Leishmania donovani</i> serine protease(s).	<i>L. donovani</i>	Promastigote	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt (leaves)	Ethanolic	Serine protease
Paik et al., (2016) [63]	To determine the anti- <i>Leishmania</i> potential of the serine protease inhibitor obtained from the crude potato tuber extract in an <i>in vivo</i> model	<i>L. donovani</i>	Amastigote	Tuber of <i>Solanum tuberosum</i> (L.)	Ethanolic	Serine protease
Pramanik et al., (2017) [80]	To investigate and characterize the anti- <i>Leishmania</i> efficacy of <i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt leaf extract (Cg-Ex) with its immunomodulatory property against <i>Leishmania donovani</i> in an <i>in vitro</i> experimental model.	<i>L. donovani</i>	Promastigote	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt (leaves)	Ethanolic	Serine protease
Dutta et al., (2007) [84]	To evaluate the supposed leishmanicidal action mechanism of <i>Aloe vera</i> (L.).	<i>Leishmania donovani</i>	Promastigote	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f. (leaves)	Ethanolic	Serine protease

***Garcinia brasiliensis* Mart.**

Garcinia brasiliensis Mart., also known as *Rheedia brasiliensis* Planch & Triana, is cultivated throughout the Brazilian territory, being popularly known as bacuri, bacupari, porocó and bacuripari in Brazil, and as guapomo in Bolivia. It is a species native to Brazil, Paraguay and northern Argentina [57].

In a study by Pereira (2009) [55], the leishmanicidal action of the hexanic extract of *G. brasiliensis* was investigated, and the extract presented IC50 values of 1.43 µg/mL and 10.66 µg/mL in promastigotes and amastigotes in infected macrophages, respectively.

Pereira et al., (2011) [58] used the compound fukugetin, a bioflavonoid, which was purified from the extract of ethyl acetate from the pericarp of the fruit of *G. brasiliensis*. The purification method was established by Derogis et al (2008) [59].

After isolated, the bioflavonoid fukugetin was tested against *Leishmania* proteases, which were obtained from *L. amazonensis* amastigotes, which were isolated from infected rats. The cells were washed and centrifuged, after the parasite lysates, the samples went through the ultrasonication process, were again centrifuged and the supernatants containing the proteases were used in the test [58].

And, after evaluating this bioflavonoid against *Leishmania* proteases, it showed a greater inhibitory effect than ethyl acetate extract, with an IC50 of 5.2 - 0.5 µM / mL (Table 3).

Table 3. Inhibitory concentration of the compound fukugetin from *G. brasiliensis* against proteases from *L. amazonensis*

Author	Type of study	IC50* (µM/mL)
Pereira et al., (2011) [58]	<i>In vitro</i>	5,2 ± 0,5

*IC50: Concentration that inhibits 50% of protease activity

These data indicate that fukugetin is a potent protease inhibitor of *L. amazonensis*, and that it also did not cause toxicity in mammals or in mammalian cells *in vitro*, thus, the study by Pereira et al., (2011) [58] points out new perspectives on the development of drugs with leishmanicidal action, obtained from natural products that target the parasite's proteases.

***Solanum tuberosum* (Tuber from potato)**

Solanum tuberosum L. is a valuable plant, non-toxic and highly nutritious consumable [60]. This plant has animal pancreatic proteinase inhibitors and potato tuber soluble proteins have a mixture of chymotrypsin, trypsin, elastase and carboxypeptide inhibitors [60, 61].

Paik et al., (2014) [62] isolated a fraction rich in serine protease inhibitors obtained from potato tuber, through the reverse zymography method, used for serine protease inhibitors, standardized by Hanspal et al (1983).

For the isolation of proteases, the *L. donovani* metacyclic promastigotes were centrifuged, then lysed using a protocol with several cycles of freezing and thawing, after which the lysate was centrifuged and the supernatant was collected and dialyzed, and centrifuged again, and had its enzymatic activity evaluated through the gelatin zymogram. The gel electrophoresis of the substrate was performed, and after that the gel was incubated in the presence and absence of potato tuber serine protease inhibitor and aprotinin, used as a positive control [62].

The results of Paik et al (2014) [62] showed that the activity of the serine protease from *L. donovani* was inhibited by the rich fraction of potato tuber inhibitors (0 – 2.5 mg/mL), in a dose-dependent manner. The same inhibitor was tested at a higher concentration, and it significantly inhibited the *Leishmania* serine protease activity when compared to the classic serine protease inhibitor, aprotinin.

When the assay was performed using the substrates BApNA and BTpNA, it was shown that the activity of commercial proteases trypsin and chymotrypsin, and *Leishmania* protease, the activity of these enzymes was reduced according to the increase in the concentration of potato turbulent inhibitor, however, this inhibitor exhibited stronger inhibition against commercial trypsin and serine protease from *Leishmania*.

The inhibitor was also tested in promastigotes through the in vitro MTT assay. The inhibitor showed significant inhibitory activity in *L. donovani* promastigotes and amastigotes incubated with variable concentration (0–2.5 mg/ml) for 48 h, and inhibitory concentration (IC₅₀) of 312.5±0.1 µg/mL and IC₅₀ 82.3 ± 0.2 µg/mL, respectively (Table 4) [62].

Table 4. Inhibitory concentration of the serine protease inhibitor-rich fraction obtained from potato tuber against *L. donovani*.

Author	Type of study	IC50* ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
Paik et al., (2014) [62]	Amastigota <i>in vitro</i>	82,3 \pm 0,2
	Promastigota <i>in vitro</i>	312,5 \pm 0,1

*IC50: Concentration that inhibits 50% of the viability of forms of *Leishmania donovani*.

In 2016, Paik et al., (2016) [63] analyzed this same rich fraction in serine protease inhibitors, isolated from the ethyl acetate fraction of potato tuber extract in an *in vivo* model. And to verify the anti-*Leishmania* action, BALB/c mice were treated for thirty days with the potato tuber inhibitor, orally, divided into two groups, at dosages of 12.5 mg/kg (Group 1) and 25 mg /kg (Group 2). When analyzing the liver smears, it was noted that a marked decrease in the parasite load of the treated animals. The parasite load in Group 1 showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the number of amastigotes, reducing 86.9% in the liver and 88.7% in the spleen, when compared to the infected controls.

In another study, also carried out by Paik et al., (2020) [64], the fraction rich in serine protease inhibitor obtained from potato was analyzed by sephadex column chromatography and the fractions with higher absorbances were collected (PTF1, PTF2 and PTF3), and the inhibitors identified by reverse zymography.

The three fractions (PTF1, PTF2 and PTF3) were tested against *L. donovani* serine protease, through the MTT method, to determine the inhibitory concentration of 50% of the parasites. When analyzing the IC50, the PTF1 and PTF3 fraction showed IC50 of $382.6 \pm 1.2 \mu\text{g} / \text{ml}$ and $143.5 \pm 2.4 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectively ($p < 0.05$), and the PTF2 fraction was considered less efficient in killing promastigotes. And when comparing the PTF1 and PTF3 fractions, it was found that there was 90% growth inhibition by PTF3, being more effective than the PTF1 fraction. The authors also analyzed the morphology of the parasites treated with the PTF3 fraction, compared to the parasites treated with miltefosine, which showed irregularity in morphology, similar to that of the parasites treated with miltefosine.

The PTF3 fraction was also evaluated in murine macrophages, and exhibited minimal cytotoxicity of 11.3%, and when analyzing the selectivity index, the selectivity of the PTF3 fraction was very high compared to the other fractions (PTF1 and PTF2). And when the parasite load was evaluated, it was reduced to $82.3 \pm 0.9\%$, at a concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$, in 24 hours, and after 48 hours the PTF3 fraction showed a reduction of $94.1 \pm 0.8 \%$ of the parasite load.

Data from Paik et al., (2020) [64] indicate that the PTF3 fraction is effective in reducing the parasite. It was also evidenced that the PTF3 fraction significantly inhibited the serine protease of *L. donovani*, at the concentration of 0.5 mg/ml. And when incubated with PTF3 and aprotinin, there was a decrease of $83.1 \pm 1.7\%$ in the infection rate.

And when tested in BALB/c mice, at a dose of 23 mg/kg, the PTF3 fraction almost eradicated the infection, decreasing the parasite load in the liver and spleen by $89.3 \pm 0.1\%$ and $88.5 \pm 0.5\%$, respectively.

The studies by Paik et al., (2014; 2016; 2020) [62, 63, 64] showed a potential leishmanicidal effect of the serine protease inhibitor in both in vitro and in vivo models. And as this inhibitor was considered less toxic to host cells, it is interesting to be studied as a potential therapeutic agent against leishmaniasis.

***Arrabidaea chica* Verlot**

Arrabidaea chica Verlot, popularly known as pariri, belongs to the Bignoniaceae family. It is endemic in almost all over Brazilian territory, being found most frequently in the Amazon rainforest, where it is used to treat skin diseases, anemia, jaundice and inflammatory reactions [45, 65].

In a study carried out with the crude extract of *A. chica* leaves against *L. amazonensis* promastigotes, the IC₅₀ was determined at a concentration of 155.9 $\mu\text{g/mL}$. The cytotoxicity test was also performed on macrophages of the J774.G8 lineage, over a period of 24 hours, and the concentration that demonstrated toxicity in 50% of the cells was 189.9 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to CC₅₀ [65].

The extract of *A. chica* was also fractionated in silica column chromatography, resulting in five fractions (B1, B2, B3, B4 and B5), and when tested on the parasite,

the B2 fraction was more active with IC50 of 37.2 and 18.6 $\mu\text{g/mL}$ against peptidases from *L. infantum* and *L. amazonensis*, respectively (Table 5).

Table 5. Inhibitory concentration of B2 fraction of *A. chica* against peptidases from *L. amazonensis* and *L. infantum* promastigotes

Author	Type of <i>Leishmania</i>	Type of study	IC50* ($\mu\text{M/mL}$)
Rodrigues et al., (2014) [67]	<i>L. amazonensis</i>	<i>In vitro</i>	37,2
	<i>L. infantum</i>	<i>In vivo</i>	18,6

*IC50: Concentration that inhibits 50% of peptidase activity

To perform the *L. amazonensis* and *L. infantum* peptidase inhibition assay, the promastigotes were washed and centrifuged, going through several cycles of freezing and thawing, and then the cell extracts were centrifuged and the supernatants were preserved. And to analyze the peptidase activity (gelatinase), was used the protocol described by Cedrola et al., (2012) [66].

Rodrigues et al., (2014) [67] also evaluated the effect of the B2 fraction on metalloproteinases from *L. infantum* and *L. amazonensis* lysates, however, even with the decrease in enzymatic activity, the results showed that the B2 fraction was less effective against this class of enzymes.

Furthermore, the study evidenced that the B2 fraction completely inhibited the activity of promastigotes, thus, the results indicate that the use of *A. chica* is an interesting source of *Leishmania* protease inhibitors, since studies have also shown that the compounds extracted from the leaves of *A. chica* are potential leishmanicidal agents, in non-cytotoxic concentrations [65, 67].

Green Tea

Green tea is a type of tea made from the infusion of the *Camellia sinensis* plant, which belongs to the Theaceae family (Ternstroemiaceae), and is popularly known as tea from India, tea tree or tea tree. Green tea contains biologically active compounds such as polyphenols, methylxanthines and essential oils. Most of its biological actions,

such as the reduction of plasma lipid levels, anti-inflammatory effects, antimicrobial, antineoplastic and antioxidant activities, are related to the polyphenol fraction, especially catechins [68].

In a study carried out with Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a compound present in green tea, the *in vitro* and *in vivo* effect and the molecular mechanism of action with the involvement of trypanothione reductase (TR) in *Leishmania infantum* were analyzed [68]. TR is a flavoenzyme that is mainly present in the Trypanosomatidae family. This is a key molecule for redox metabolism in trypanosomatids, providing adequate conditions for the survival of the parasite.

Inácio Filho (2018) [69] demonstrated that EGCG has anti-promastigote activity with an IC₅₀ of 162.0 μM, and IC₉₀ of 262.5 μM and anti-amastigote activity with an IC₅₀ of 3.8 μM with a 90% inhibition in the concentration of 24μM. As for the *in vivo* result, the compound significantly reduced the number of parasites by 92% at the highest dose administered (50mg/kg/day), demonstrating ED₅₀ and ED₉₀ values of 7mg/kg and 9.9mg/kg, respectively [68] (Table 6).

Tablea 6. Inhibitory concentration and effective dose of the green tea compound against *L. infantum* parasites

Autor		Type of study	IC ₅₀ * (μM/mL)	IC ₉₀ ** (μM/mL)
Inácio Filho (2018) [69]	Promastigotes	<i>In vitro</i>	162,0 ±6,6	262,5±11,1
	Amastigotes	<i>In vitro</i>	3,8	-
		Type of study	ED ₅₀ †(mg/kg)	ED ₉₀ ‡‡ (mg/kg)
	Infected mice	<i>In vivo</i>	7,0	9,9

*IC₅₀: Concentration that inhibits 50% of parasites.

**IC₉₀: Concentration that inhibits 90% of parasites.

†ED₅₀: Effective Dose that inhibits 50% of the activity of the parasite load.

‡‡ED₉₀: Effective Dose that inhibits 90% of the activity of the parasite load.

To analyze the ability of EGCG inhibition against trypanothione reductase, an enzymatic assay was performed based on the Elman method (HAMILTON et al., 2003)

[70] which is based on the reduction of DTNB [5,5'-dithio acid -bis-(2-nitrobenzoic)] to 2TNB (2-nitro-5-thiobenzoic acid) by reduced trypanothione [T(SH)₂], leading to oxidized trypanothione [T(S)₂] which will be regenerated to T(SH)₂ by TR [71]; and also through molecular docking.

In the trypanothione reductase (TR) inhibition assay, EGCG significantly inhibited TR, demonstrating a dose-dependent profile, with an inhibition of approximately 65% compared to the untreated control. This result may be related to the production of reactive oxygen species, since the author states that the compound may have inhibited the key enzyme in the redox balance of these parasites, thus decreasing the TR activity [69]. Furthermore, several works report the inhibition of TR as the main cause of death of protozoa members of the Trypanosomatidae family [72, 73, 74, 75].

***Coccinia grandis* (L.) Voigt**

Coccinia grandis (L.) Voigt popularly known as “Ivy gourd” is a tropical plant belonging to the Cucurbitaceae family. The roots, stems and leaves are used to treat jaundice, bronchitis, rashes, burns, insect bites, fever, indigestion, nausea, eye infections, allergy, syphilis, gonorrhoea, etc. (Kirthikar and Basu, 1987; Wasantwisut and Viriyapanich, 2003).

Furthermore, in the study by Das et al., (2015) [76], a crude inhibitor preparation was obtained, which was extracted from fresh leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt with phosphate buffer. To detect inhibitor activity, the reverse zymography method was used.

To prepare the proteinases, the *L. donovani* cell lysate was prepared according to the protocol by Choudhury et al., (2009) [77].

In the study by Das et al., (2015) [76] it was shown that serine protease inhibitors extracted from *C. grandis* leaves (Cg-Ex) exhibited antiproteolytic activity against *Leishmania* serine protease, with an IC₅₀ of 308,0 ± 2.42 µg/mL, as well as in vitro anti-*Leishmania* activity against *L. donovani*, with an insignificant cytotoxic effect on mammalian macrophages (Table 7).

Table 7. Inhibitory concentration of protease inhibitors extracted from *C. grandis* leaves against *L. donovani* serine protease.

Author	Type of study	IC50* ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
Das et al., (2015) [76]	<i>In vitro</i>	308,0 \pm 2,42

*IC50: Concentration that inhibits 50% of the viability of *L. donovani* promastigotes

In the study by Satheesh and Murugan (2011) [78], the serine protease inhibitor extracted from *C. grandis* demonstrated greater inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin, as well as exhibiting antimicrobial and antifungal activity. It was also observed that the serine protease inhibitor of *C. grandis* has demonstrated activity against Leishmania, without producing toxic effect against macrophages [79].

Pramanik et al., (2017) [80] also demonstrated that the use of the extract from the leaves of *C. grandis* triggered promastigotes and amastigotes death, through the inhibition of a serine protease, which showed no toxic effect on cells mammals.

In another study, was shown the anti-Leishmania activity of the leaf extract of *C. grandis* (L.) Voigt (Cg-Ex), which was supplemented with three serine protease inhibitors (64.8, 55.8 and 15.3 kDa), where the Leishmania intracellular serine protease inhibitor (58 kDa, LD-SP) was inhibited by Cg-Ex without showing any toxicity in murine macrophages. The present study revealed that Cg-Ex exerts anti-Leishmania activity in a mouse visceral Leishmania model, reducing the parasite growth [80]. Therefore, a significant reduction in the parasite load on macrophages by the Cg-Ex treatment indicates a restriction of the parasite development in the host cell.

***Aloe vera* (L) Burm F.**

Aloe vera (L) Burm. f. belongs to the Aloaceae family which includes about 15 genera and 800 species. This species is mainly composed of anthracene derivatives, being the aloins (barbaloin and isobarbaloin) the best known [81, 82]. Studies show that it has anti-inflammatory, healing, antineoplastic and anti-hypoglycemic activity [82, 83].

Regarding the leishmanicidal effect, Dutta et al., (2007) [84], reported that the extract of dried leaves of *A. vera* presented direct effect on axenic promastigotes and

amastigotes, and this extract modulated the immune function of murine peritoneal macrophages, causing an increase in reactive oxygen species.

In another study, it was shown that *A. vera* induced programmed death of *L. donovani* promastigotes through a caspase and protease-independent signaling pathway, involving changes in mitochondrial membrane potential and cytochrome C release from hypopolarized mitochondria, resulting in the fragmentation of *L. donovani* DNA.[84].

Conclusions

Given what has been shown, note the importance of further studies involving *Leishmania* sp proteases as pharmacological targets. Some of these important molecules have already been identified and are characterized as potential candidates for new drugs. Thus, studies with protease inhibitors can lead to the development of new molecules with leishmanicidal activity

When analyzing the studies, it was noted that they use similar protocols for the isolation of protease inhibitor from plant species (affinity chromatography) and proteases from *Leishmania* sp. (cell lysis and protein precipitation and affinity chromatography). Another method used to evaluate the activity of protease inhibitors from plant extracts and also to that of *Leishmania* proteases was reverse zymography, which is the most suitable method for the detection and quantification of the enzymatic activity, as it is capable of detect active and latent forms. This method has a high sensitivity to several classes of enzymes.

However, research involving *Leishmania* protease inhibitors are still scarce, requiring further studies on the subject, since the understanding of the functioning of these molecules has much to contribute to the development of new therapeutic targets.

Acknowledgments

The authors would like to thank

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia [UID/Multi/04413/2013 (GHTM)]; Fundação para a Ciência e a Tecnologia [SFRH/BD/78062/2011]; Fundação para a Ciência e a Tecnologia [IF/00743/2015]; CAPES [001]; CNPq [301357/2019-7]; FAPESP [18/07585-1].

ORCID

Aline Santana Figueredo <https://orcid.org/0000-0002-5996-5179>

Joana Neres Ferreira Assençõ <http://orcid.org/0000-0002-4688-2438>

Arthur André Castro da Costa <https://orcid.org/0000-0001-5798-4213>

Raquel Elisa da Silva López <http://orcid.org/0000-0003-2744-7884>

Mayara Cristina Pinto da Silva <http://orcid.org/0000-0002-1868-6931>

References

1. Luke Maxfield L, Crane JS. Leishmaniasis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.PMID: 30285351Bookshelf ID: NBK531456.
2. Silva-López, R.E. Immunocytochemistry of proteases in the study of Leishmania physiology and host-parasite interaction in applications of immunocytochemistry In: Dehghani H (Ed.) Applications of immunocytochemistry, InTech, Rijeka, 2012: 267-296.
3. WHO Leishmaniasis. 2021 [cited 2021 Jun 11]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis-lifecycle>. Experimental parasitology. 2018; 184, 67-81.
4. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay, P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. PLoS neglected tropical diseases, 2016; 10(3), e0004349.
5. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. Molecular Aspects of Medicine, 2017; 57, 1-29.
6. Kaye P, Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol., 2011; v. 9, n. 8, p. 604–614.
7. Ready PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. Annual Review of Entomology, 2013; v. 58, n. 1, p. 227–250.
8. Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: clinical perspectives. J Am Acad Dermatol. 2015 ;73(6):897-908; doi: 10.1016/j.jaad.2014.08.051.
9. Bi K, Chen Y, Zhao S, Kuang Y, John Wu CH. Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study. Biomed Res Int.2018;9872095. doi: 10.1155/2018/9872095.
10. Silva AS, de Alcântara Maciel G, de Lima Wanderley LS, Wanderley AG. Drug use indicators in primary health care: a systematic review/Indicadores do uso de medicamentos na atenção primária de saúde: uma revisão sistemática/Indicadores del uso de medicamentos en la atención primaria de salud: una revisión sistemática. Revista Panamericana de Salud Pública, 2017; 41(8). DOI: 10.26633/RPSP.2017.132.
11. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. PLoS Negl Trop Dis. 2014 ;8(8): e3021. doi: 10.1371/journal.pntd.0003021.

12. Almeida Machado P, Carneiro MPD, de Jesus Sousa-Batista A, Lopes FJP, de Araujo Lima APC, Chaves SP, et al. Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. *Life sciences*, 2019; 219, 163-181.
13. Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology* 2018 145(4):464-480. doi: 10.1017/S0031182016002523.
14. Mendonça MG, de Brito MEF, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath F. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. *The Journal of infectious diseases*, 2004 189(6), 1018-1023.
15. Okwor I, Uzonna J. Social and economic burden of human leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 94(3):489-93. doi: 10.4269/ajtmh.15-0408.
16. Rath S, Trivelin AL, Imbrunite RT, Tomazela MD, De- Jesús NM, MarzaL CP. Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. *Quim. Nova*, 2003; Vol. 26, No. 4, 550-555.
17. Limongi JP. Em *Farmacodinâmica*; Corbett, C. E., ed.; Livraria Editora Artes Médicas: São Paulo, 1973, cap. 61.
18. Marsden PD. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1985; 18(3), 187-198.
19. Almeida OLS, Santos JB. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais brasileiros de dermatologia*, 2011, 86(3), 497-506.
20. Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* 1998 Apr;30(4):435-43. doi: 10.1016/s0306-3623(97)00268-1. PMID: 9580315.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: MS, 2003. 122p.:il
22. Roberts WL. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexam and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;126:129-42.
23. Ramos H, Valdivieso E, Gamargo M, Dagger F, Cohen BE. Amphotericin B kills unicellular *Leishmania* by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The Journal Membrane Biology*, 1996; 152: 65-75.
24. Herwaldt BL. Leishmaniasis. – *The Lancet*, 2; 354 (9185): 1191-9
25. Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, 2001; 190:89-92.
26. Sievers TM, Kubak BM, Bering AW. Safety and efficacy of Intralipid emulsions of Amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1996; 38:333-347.
27. Bryneceton A. Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*. 2001; 190:81-84
28. Monzote L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 2009; v.1, p.9-19.
29. Sundar S, Jha TK, Thakur CP. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine*, 2007; 356: 2571-81.
30. Das P, et al. Protease inhibitors in potential drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, India, v. 50, p. 363-376, 2013.
31. López-Otín C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nature reviews molecular cell biology*, 2002, 3(7), 509-519.
32. Teixeira EMGF, Silva-López RE, Da Silva BRA, Fontão APGA, Sampaio ALF Cajanus Cajan (I.) Millsp Aqueous Extracts against Melanoma Cell Line and their Proteases. *European Journal of Medicinal Plants* 32(2): 1-14, 2021;
33. Silva-López RE, Pinto Coelho MG, De Simone SG. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology.* 2005 131:85-96
34. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Res.* 46 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>.
35. Grewal JS. Evaluation of clan CD C11 peptidase PNT1 and Other *Leishmania mexicana* cysteine peptidases as potential drug targets. *Biochimie*, v. 166, p. 150-160, 2019.
36. Silva-López RE. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010. Acesso em 15 de maio de 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/qn/v33n7/a22v33n7.pdf>.

37. Siqueira-Neto JL, Debnath A, McCall LI, Bernatchez JA, Ndao M, Reed SL, Rosenthal PJ. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases* | <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512> August 23, 2018
38. Mottram JC., et al. The Multiple cpb Cysteine Proteinase Genes of *Leishmania mexicana* Encode Isoenzymes That Differ in Their Stage Regulation and Substrate Preferences. *The Journal of Biological Chemistry*, Estados Unidos da América, v. 272, n. 22, p. 14285-14293, 1997.
39. Mundodi V, Kucknoor AS, Gedamu L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Molecular Biology*, v. 6, p. 3, 2005.
40. Tremacoldi CR. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Embrapa Amazônia Oriental-Docmentos (INFOTECA-E), 2009.
41. Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem*. 2003; 278:25120–32.
42. Jaffe CL, Dwyer DM. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitol Res*. 2003 91: 229-237.
43. Ham WE, Sandstedt RM. A Proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 154, p. 505-506, 1945. (Letters to the Editors)
44. Klose AA, Hill B, Fevold HL. Presence of a growth inhibiting substance in raw soybeans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 62, p. 10-12, 1946.
45. Gentry AH. Uma sinopse da etnobotânica Bignoniaceae e botânica econômica. *Ann Missouri Bot Gard*. 1992; 79: 53–64.
46. Westfall RJ, Hauge SM. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. *The Journal of Nutrition*, v. 35, p. 374-389, 1948.
47. Silva-Lopez RE, et al. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. *Revista Fitos Vol.4(1)*, 2009.
48. Zhang Y, Kouzuma Y, Miyaji T, Yoneku-ra M. Purification, characterization, and cDNA cloning of a Bowman-Birk type trypsin inhibitor from *Apios americana* Medikus tubers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.72, p.171-178, 2008.
49. Read JW, Haas L. The baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. *Cereal Chemistry*, v. 15, p. 59-68, 1938.
50. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. general properties. *Journal of Genetic and Physiology*, v. 30, p. 291-310, 1947.
51. Rodrigues FP. Caracterização de derivados da vanilina e aminofenilidrazina na inibição da atividade de cisteíno proteases de *Leishmania mexicana*. *Revista Científica UMC*, v. 3, n. 3, 2018.
52. Barbosa WLR, Pinto LND, Quignard E, Vieira JMDS, Silva Jr JOC And Albuquerque S. "Arrabidaea chica (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, no. 4, pp. 544–548, 2008.
53. Mosolov VV, Loginova MD, Fedurkina NV, Benken II. The Biological significance of proteinase-inhibitors in plants. *Plant Science Letters*, v. 7, p. 77-80, 1976.
54. Satheesh LS, Murugan K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt, *Indian J. Exp. Biol.* 49 (2011) 366–374, <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1151-1154>.
55. Pereira IO, et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart fruits. *Phytomedicine*, v.17, p.339-45, 2010.
56. Galvão TF, Pansani TSA. Principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análises: A recomendação Prisma. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 2015 24(2), 335-342.
57. Morton J. Fruits of warm climate. Miami: Julia F. Morton, 1987, p. 309-310.
58. Pereira I, et al. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors. *Journal of medicinal food*, v. 14, n. 6, p. 557-562, 2011.
59. Derogis PBMC, Martins FT, DE Souza TC, et al.: Complete assignment of the 1H and 13C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. *Magn Reson Chem* 2008;46:278–282.
60. Povreau L, Gruppen H, Piersma SR, Van Den Broek LA, Van Koningsveld GA, Voragem AG. Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv, Elkana. *J. Agric. Food Chem.* 49 2001 2864–2874.
61. Ryan CA, Santarius K. Immunological similarities of proteinase inhibitors from potatoes. *Plant physiology*, 1976 58(5), 683-685.

62. Paik D, et al. In vitro anti-leishmanial efficacy of potato tuber extract (PTEx): leishmanial serine protease (s) as putative target. *Experimental parasitology*, v. 146, p. 11-19, 2014.
63. Paik D, Das P, De T, Chakraborti T. Protective inflammatory response against visceral leishmaniasis with potato tuber extract: A new approach of successful therapy, *Biomed. Pharmacother.* 83 (2016) 1295–1302.
64. Paik D, Pramanik PK, Chakraborti T. Curative efficacy of purified serine protease inhibitor PTF3 from potato tuber in experimental visceral leishmaniasis. *International Immunopharmacology*, v. 85, p. 106623, 2020.
65. Cortez de Sá J, Almeida-Souza F, Mondêgo-Oliveira R, et al. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. *BMC Complement Altern Med* 16, 1 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0973-0>.
66. Cedrola SML, Melo ACN, Mazotto AM, et al., “Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 3, pp. 1259–1269, 2012.
67. Rodrigues IA, Azevedo M, Chaves F, Alviano CS, Alviano DS, Vermelho AB. *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. *BioMed research international*, 2014.
68. Kan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Research*, v. 66, n. 5, p. 2500–2505, 2006.
69. Inácio Filho JD. Estudo do efeito da EGCG in vitro e in vivo, suas associações e mecanismo molecular de ação em *Leishmania infantum*. Diss. 2018.
70. Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. Ellman’s-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochemical Journal*, v. 369, n. 3, p. 529–537, 2003.
71. Richardson JL, Net IRE, Jones DC, Abdille MH, Gilbert IH, Fairlamb AG. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. *ChemMedChem*, v. 4, n. 8, p.95 1333–1340, 2009
72. Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO Journal*, v. 16, n. 10, p. 2590–2598, 1997.
73. Castro-Piinto DB, Echevarria A, Genestra MS, Cysnefinkelstein L, Leon LL. Trypanothione reductase activity prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 1, p. 57–63, 2004.
74. Baiocco P, Pode G, Anfonzo S, Coccozza M, Porretta GC, Colotti G, Biava M, Moraca F, Botta M, Yardley V, Fiorillo A, Lantella A, Malatesta F, Ilari A. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by azole-based compounds: A comparative analysis with its physiological substrate by x-ray crystallography. *ChemMedChem*, v. 8, n. 7, p. 1175–1183, 2013.
75. Rodrigues RF, Castro-Pinto D, Echevarria A, dos Reis CM, Del Cistia CN, Sant’ana CMR, Teixeira F, castro H, Cantocavalheiro M, Leon LL, Tomás A. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 5, p. 1760–1766, 2012.
76. Das P, Paik D, Pramanik AA, Chakraborti T. Antiproteolytic and leishmanicidal activity of *Coccinia grandis* (L.) Voigt leaf extract against *Leishmania donovani* promastigotes, *Indian J. Exp. Biol.* 53 (2015) 740–746.
77. Choudhury R, Bhaumik SK, De T & Chakraborti T, Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem*, 320 (2009).
78. Satheesh LS, Murugan K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt, *Indian J. Exp. Biol.* 49 (2011) 366–374, <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1151-1154>.
79. Alves CR, et al. Understanding serine proteases implications on *Leishmania* spp lifecycle. *Experimental parasitology*, v. 184, p. 67-81, 2018.
80. Pramanik A, et al. *Coccinia grandis* (L.) Voigt leaf extract exhibits antileishmanial effect through pro-inflammatory response: An in vitro study. *Current microbiology*, v. 74, n. 1, p. 59-67, 2017.
81. World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants, vol. 1. Geneva: WHO Publications. 1999
82. Zhang I, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology*, v.35, p.119-28, 1996.

83. Tanaka M, et al. Identification of five phytosterols from aloe vera gel as anti-diabetic compounds. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.29, n.7, p.1418-22, 2006.
84. Dutta A, et al. Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 629-636, 2007.

ANEXO

NORMAS DA REVISTA

Preparing Your Paper

1. Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

2. Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

3. Format-Free Submission

Authors may submit their paper in any scholarly format or layout. Manuscripts may be supplied as single or multiple files. These can be Word, rich text format (rtf), open document format (odt), or PDF files. Figures and tables can be placed within the text or submitted as separate documents. Figures should be of sufficient resolution to enable refereeing.

- There are no strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the essential elements needed to evaluate a manuscript: abstract, author affiliation, figures, tables, funder information, and references. Further details may be requested upon acceptance.
- References can be in any style or format, so long as a consistent scholarly citation format is applied. Author name(s), journal or book title, article or chapter title, year of publication, volume and issue (where appropriate) and page numbers are essential. All bibliographic entries must contain a corresponding in-text citation. The addition of DOI (Digital Object Identifier) numbers is recommended but not essential.

- The journal reference style will be applied to the paper post-acceptance by Taylor & Francis.
- Spelling can be US or UK English so long as usage is consistent.

Note that, regardless of the file format of the original submission, an editable version of the article must be supplied at the revision stage.

4. Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

5. Checklist: What to Include

1. **Author details.** All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. Should contain an unstructured abstract of 250 words.
3. **Graphical abstract** (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .tiff. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.

4. You can opt to include a **video abstract** with your article. Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.
5. Between 5 and 6 **keywords**. Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization.
6. **Funding details.** Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows: *For single agency grants* This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx]. *For multiple agency grants* This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
7. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.
8. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). Templates are also available to support authors.
9. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a recognized data repository prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
10. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about supplemental material and how to submit it with your article.
11. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, TIFF, or Microsoft Word (DOC or DOCX) files are acceptable for figures that have been drawn in Word. For information relating to other file types, please consult our Submission of electronic artwork document.

12. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.

13. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations](#).

14. **Units.** Please use [SI units](#) (non-italicized).

ii. **Using Third-Party Material in your Paper**

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

iii. **Submitting Your Paper**

This journal uses Editorial Manager to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in Editorial Manager. Please read the guidelines above and then submit your paper in [the relevant Author Centre](#), where you will find user guides and a helpdesk.

Please note that *Pathogens and Global Health* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Pathogens and Global Health* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

iv. Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

v. Publication Charges

There are no submission fees, publication fees or page charges for this journal. Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply. Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

vi. Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements.](#)

vii. Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

viii. My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues. We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

ix. Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. You can also [order print copies of the journal issue in which your article appears](#).

x. Queries

Should you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).