

Atividade antileishmania de *Annona glabra* L. (Annonaceae)

Antileishmania activity of *Annona glabra* L. (Annonaceae)

Actividad antileishmania de *Annona glabra* L. (Annonaceae)

Heliton Patrick Cordovil Brígido¹, João Victor da Silva e Silva², Mírian Letícia Carmo Bastos³, Juliana Correa-Barbosa¹, Rosana Moura Sarmento¹, Erica Vanessa Souza Costa¹, Andrey Moacir do Rosário Marinho¹, Márlia Regina Coelho-Ferreira⁴, Fernando Tobias Silveira⁵, Maria Fâni Dolabela^{1*}.

RESUMO

Objetivo: Descrever a atividade antileishmania de *Annona glabra*. **Métodos:** Foi realizado um estudo fitoquímico do extrato etanólico (EE) obtido de cascas de *A. glabra* e suas frações, a partir do qual a Rutina foi isolada. A atividade antileishmania frente a *Leishmania amazonensis* foi avaliada através dos ensaios antipromastigota (método do MTT) e anti-amastigota (determinada pela redução da taxa de infecção em macrófagos). A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos (THP-1) através do MTT. **Resultados:** Nos estudos fitoquímicos, o EE e suas frações apresentaram cromatogramas sugestivos de flavonoides. No ensaio antipromastigota, o EE, frações e Rutina, foram considerados inativos ($CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$). Na atividade anti-amastigota, o EE e a Rutina não inibiram a infecção de macrófagos por *Leishmania*, contudo, a Fração de Hexano nas concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ inibiu a infecção de macrófagos em 39,1% e 18,7% respectivamente. No ensaio de viabilidade, nenhuma amostra apresentou citotoxicidade ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$). **Conclusão:** Em síntese, o fracionamento do extrato etanólico favoreceu o aumento da atividade antileishmania, inferindo que as substâncias responsáveis pela ação provavelmente estejam em baixa concentração no extrato e suas frações e que, essa atividade, pode estar associada à presença de flavonoides.

Palavras-chave: Annona, Leishmania, Flavonoides.

ABSTRACT

Objective: the aim of this study was to describe antileishmanial activity of *Annona glabra*. **Methods:** A phytochemical study was performed with the ethanolic extract (EE) and fractions from the bark of *A. glabra*, from which Rutin was isolated. The antileishmanial activity against *Leishmania amazonensis* was evaluated by anti-promastigote (MTT method) and anti-amastigote (determined by the reduction of infection rate in macrophages) assays. Cytotoxicity was assessed in macrophages (THP-1) using MTT. **Results:** In phytochemical studies, EE and its fractions showed chromatograms suggestive of flavonoids. In the anti-promastigote assay, EE, fractions and Rutin were inactive ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$). In anti-amastigote assay, EE and Rutin did not inhibit macrophage infection by *Leishmania*, however, the hexane fraction at concentrations of 250 and 125 $\mu\text{g/mL}$ inhibited macrophage infection by 39.1% and 18.7% respectively. In the feasibility test, samples were not cytotoxic ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$). **Conclusion:** In summary, the fractionation of the ethanolic extract favored the increase of antileishmania activity, inferring that the substances responsible for the action are probably in low concentration in the extract and its fractions and that this activity may be associated with the presence of flavonoids.

Keywords: Annona, Leishmania, Flavonoids.

¹ Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém - PA. *E-mail: fanidolabela20@gmail.com

² Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Rio de Janeiro - RJ.

³ Núcleo de Pesquisa em Educação em Saúde da Amazônia (NUPESA), Tucuruí - PA.

⁴ Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Belém - PA.

⁵ Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua - PA.

RESUMEN

Objetivo: Describir la actividad anti-leishmania de *Annona glabra*. **Métodos:** Estudio fitoquímico del extracto etanólico (EE) obtenido de las cáscaras de *A. glabra* y sus fracciones, de las cuales la rutina fue aislada. La actividad anti-leishmania contra *Leishmania amazonensis* fue evaluado a través de dos ensayos: anti-promastigote (método MTT) y anti-amastigote (determinado por la tasa de infección en macrófagos). La citotoxicidad fue evaluada en macrófagos (THP-1) usando MTT. **Resultados:** En los estudios fitoquímicos, el EE y sus fracciones mostraron cromatogramas sugestivos de flavonoides. En el ensayo anti-promastigote, EE, las fracciones y la rutina se consideraron inactivas ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$). En la actividad anti-amastigote, el EE y la Rutina no inhibieron la infección de macrófagos por *Leishmania*, sin embargo, la fracción de hexano en las concentraciones de 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$ inhibió la infección de macrófagos en un 39.1% y 18.7% respectivamente. En la prueba de viabilidad, ninguna muestra presentó citotoxicidad ($CC_{50} > 500 \mu\text{g / ml}$). **Conclusión:** En resumen, el fraccionamiento del extracto etanólico favoreció el aumento de la actividad antileishmania, infiriendo que las sustancias responsables de la acción están probablemente en baja concentración en el extracto y sus fracciones y que esta actividad puede estar asociada con la presencia de flavonoides.

Palabras clave: Annona, Leishmania, Flavonoides.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença tropical negligenciada causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* e caracterizada pela formação de úlceras na pele. Está associada à fatores socioeconômicos, tais como pobreza e desnutrição, além de mau funcionamento do sistema imunológico. Possui incidência de 220.000 casos por ano, sendo responsável por afetar mais de 1 milhão de pessoas nos últimos 5 anos. Estima-se que cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas com risco de contrair LC. Entre os países que concentram os maiores números de casos estão Afeganistão, Argélia, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria e Brasil (WHO, 2018).

Apesar do grande número de casos, atingindo proporções mundiais, há muitos fatores a serem discutidos com relação ao tratamento da doença. Atualmente, existem medicamentos de primeira escolha (antimoniais pentavalentes) e de segunda escolha (Anfotericina B e Pentamidina) disponíveis para o tratamento da LC. Entretanto, a utilização desses fármacos apresenta problemáticas. Uma delas está relacionado administração parenteral, que exige colaboração do paciente, resultando muitas vezes no abandono do tratamento. Esses medicamentos também possuem eficácia limitada e variável entre espécies de *Leishmania*, além de apresentarem alto custo e inúmeras reações adversas, podendo causar insuficiência renal e hipotensão.

Aliado a esses fatores, a resistência do parasito aos antimoniais já vem ganhando destaque, resultando em falha do tratamento em até 60% dos pacientes (CROFT S e COOMBS G, 2003; OLIVEIRA RAG, et al., 2005; MATRANGOLO FS, 2013).

Devido à falta de melhores terapias, a identificação de novos medicamentos é urgente, e as plantas medicinais são uma fonte importante de moléculas bioativas que podem suprir essa necessidade (ROCHA FAG, et al. 2013). Relacionado à *Leishmania*, o uso de produtos naturais é uma estratégia alternativa para o tratamento. No Brasil, o gênero *Annona* é o mais representativo da família Annonaceae, pois possui uma grande variedade de espécies, muitas usadas na medicina tradicional para o tratamento da leishmaniose (SAEZ J, et al., 1998; JARAMILLO MC, et al., 2000). Diante disso, realizamos estudo fitoquímico do extrato etanólico (EE) obtido de cascas de *A. glabra*, suas frações e substância isolada com o objetivo de avaliar a atividade leishmanicida dessas amostras contra *Leishmania amazonensis*.

MÉTODOS

Material vegetal e obtenção e fração de extratos

As plantas foram coletadas na cidade de Abaetetuba, Estado do Pará, Brasil (S 01 ° 27 '3.031' ', W 48°26'40.2 "). Uma exsicata (MG176948) foi depositada em um Herbário na cidade de Belém, Pará, Brasil. As cascas foram secas em temperatura ambiente por sete dias. O material foi pulverizado e extraído com etanol. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico (EE).

Os extratos foram submetidos à partição com hexano e metanol: água (9:1), gerando as frações de Hexano (FH) e Metanol (FM). A FM foi então fracionada em uma coluna cromatográfica Sephadex LH20. As subfrações obtidas foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD) e as amostras que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, foram reunidas em grupos em 5 grupos.

O grupo 3 foi submetido a fracionamento através de escala preparativa por cromatografia em camada fina. A mancha amarela resultante (fator de retenção= 0,38) foi extraída com metanol e subsequentemente rastreada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e identificada como o flavonoide Rutina (**Figura 1.J**).

Rutina: RMN ^1H (200 Hz, CDCl_3): δ 7.62 (d, J = 2.1 Hz, H-2'); 7.66 (dd, J = 2.1 and 8.4 Hz, H-6'); 6,87 (d, J = 8.4 Hz, H-5'); 6.36 (d, J = 1.8 Hz, H-8) e 6.19 (d, J = 2.1 Hz, H-6). NMR ^{13}C (50 Hz, CDCl_3): 158.41 (C-2); 135.61 (C-3); 179.31 (C-4); 162.85 (C-5); 99.93 (C-6); 165.95 (C-7); 94.86 (C-8); 159.27 (C-9); 105.54 (C-10); 123.06 (C-1'); 117.69 (C-2'); 145.75 (C-3'); 149.74 (C-4'); 116.02 (C-5'); 123.56 (C-6'), 102.33 (C-1''); 75.69 (C-2''); 78.12 (C-3''); 69.67 (C-4''); 77.12 (C-5''); 68.51 (C-6''); 102.86 (C-1'''); 72.19 (C-2'''); 72.03 (C-3'''); 71.32 (C-4'''); 68.51 (C-5''') e 17.87 (C-6''').

Atividade antileishmania

Ensaio antipromastigota

O parasita utilizado foi *Leishmania* (L.) *amazonensis*, isolado de um caso humano de Ulianópolis, estado do Pará (MHOM/BR/2009/M26361) obtidos no Instituto Evandro Chagas, Ananindeua-PA, Brasil. As promastigotas de *L. amazonensis* foram obtidas após isolamento primário nas encostas do sangue NNN. Em seguida, as cepas foram cultivadas e adaptadas ao meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640). O parasita foi cultivado a 26°C em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado pelo calor a 10% (Gibco®, Grand Island, NY, EUA), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL; MOTA EF, et al., 2015).

A cultura de promastigotas reunida em fase logarítmica de crescimento foi ajustada para 5×10^6 parasitas/100 µL. A determinação do teste de sensibilidade foi realizada em placas de 96 poços. O extrato suas frações (FH e FM) e a Rutina foram analisadas em triplicatas, em um gradiente de concentração (3,125-200 µg/mL).

Para controle negativo, usou-se apenas parasitas e o meio de incubação. Como controle positivo usou-se Anfotericina B (0,3906-25 µg/mL). Após 24 h de incubação a 26°C sob atmosfera úmida a 5% de CO_2 . Depois, foram adicionados a cada poço 10 µL de solução de sal brometo (5 mg/mL, MTT), e os parasitas foram quantificados em um leitor de microplaca de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (MOTA EF, et al., 2015; DA SILVA e SILVA JV, et al., 2019). A Concentração inibitória (CI_{50}) foi determinado por regressão linear (Graph Pad Prism versão 5.04). A atividade antipromastigota foi avaliada usando os seguintes requisitos: ativo ($\text{CI}_{50} \leq 100$ µg/mL); moderadamente ativo (CI_{50} entre 101 e 199 µg/mL); inativo ($\text{CI}_{50} \geq 200$ µg/mL) (MOTA EF, et al. 2015; DA SILVA e SILVA JV, et al., 2019).

Ensaio antimastigota

Para esse ensaio foram usadas células de leucemia monocítica aguda (THP-1) modificadas (4×10^5 células/mL). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich®, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino, mantido em úmida a 5% de CO_2 a 37 °C.

Para o teste, as células (2×10^5 células/mL) foram adicionadas às placas de 24 poços contendo lamínulas circulares no fundo de seus poços. Em seguida foi adicionado éster de forbol como agente indutor para processo de diferenciação. Após a adesão das células às lamínulas, foram adicionadas as formas promastigotas de *L. amazonensis* (5×10^6 parasitas/mL). O tratamento com as amostras foi realizado utilizando concentrações de 62,5, 125 e 250 µg/mL por 24h. As lamínulas foram removidas e coradas com Giemsa. Então, a taxa de infecção de macrófagos foi determinada.

Ensaio de viabilidade celular e índice de seletividade

A atividade citotóxica foi verificada através do ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiltrazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio] (MOSMAN T, 1983). As células modificadas THP-1 (4×10^5 células/mL) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich®, EUA), suplementado com 5% de soro fetal de bovino, mantido em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

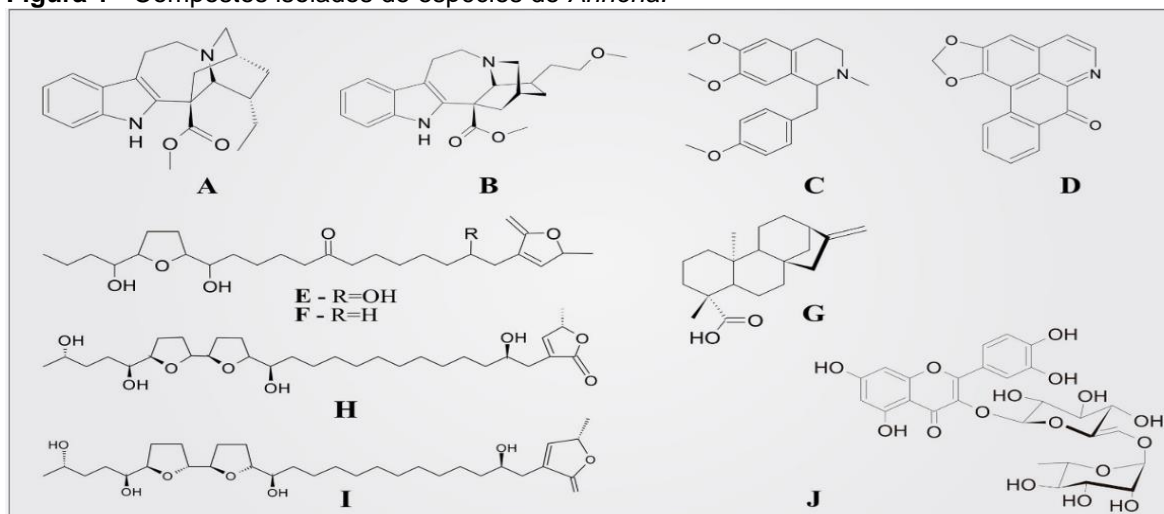
Para avaliação da atividade, as células foram tratadas com o extrato, as frações (FH e FM) e a Rutina em diferentes concentrações (25-500 µg/mL). Após 24 horas de incubação, foi adicionado o MTT (5,0 mg/mL). A placa foi incubada a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 4 h. Depois adicionou-se dimetilsulfóxido a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A densidade óptica foi determinada a 490 nm (leitor de microplacas Stat Fax 2100, Awareness Technology, Inc, EUA). A viabilidade celular foi expressa como uma porcentagem da absorbância de controle nas células não tratadas após a subtração do fundo apropriado. A concentração citotóxica (CC₅₀) foi determinada por regressão linear (NGURE PK, et al., 2009).

Os resultados da citotoxicidade foram expressos em citotóxico (CC₅₀ ≤ 100 µg/mL); moderadamente citotóxico (CC₅₀ entre 101 e 500 µg/mL); não citotóxico (CC₅₀ ≥ 500 µg/mL) (DA SILVA e SILVA JV, et al., 2019). O índice de seletividade (IS) foi calculado com base na razão entre os valores da CC₅₀ das células e CI₅₀ dos protozoários (NAKAMURA CV, et al., 2006).

RESULTADOS

Diferentes espécies de *Annona* já demonstraram atividade antileishmania quando avaliadas *in vitro* (TEMPONE AG, et al., 2005; COSTA EV, et al., 2009; VILA-NOVA NS, et al., 2011). Dentre os alcaloides isolados da espécie do gênero que já demonstraram atividade antileishmania estão a coronaridina (**Figura 1.A**), a 18-metoxicoronaridina (**Figura 1.B**), O-metilarmepavina (**Figura 1.C**), e liriodenina (**Figura 1.D**) (DELORENZI JC, et al., 2002; COSTA EV, et al., 2009; VILA-NOVA NS, et al., 2011). Além disso, acetogeninas anonacinona (**Figura 1.E**) e corossolona (**Figura 1.F**) também foram promissoras como leishmanicidas (VILA-NOVA NS, et al., 2011). Dentre os terpenos, o ácido caurenóico (**Figura 1.G**) mostrou atividade frente a *Trypanosoma cruzi* e ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), além de mostrar atividade antimicrobiana (ALVES TM, et al., 1995; PADMAJA V, et al., 1995; VIEIRA HS, et al., 2002).

Figura 1 - Compostos isolados de espécies de *Annona*.



Legenda: A-Coronaridina, B-18-Metoxicoronaridina, C-O-metilarmepavina, D-Liriodenina, E-Corossolona, F-Annonacinona, G-Ácido caurenóico, H-Annoglaxina, I-27-hidroxiullatacina, J-Rutina. **Fonte:** Brigido HPC, et al., 2020.

Entre espécies de *Annona* que, até o momento, não possuem abordagem quanto ao efeito leishmanicida está a *Annona glabra*, conhecida popularmente como “araticum”, “araticum-do-rio”, “araticu-panã”, uma árvore tropical encontrada na Ásia, África e América do Sul, que chega a 10 metros de altura (PONTES AF, et al.,

2004). As folhas de *A. glabra* são amplamente usadas para bronquite crônica, câncer e também como inseticida (PADMAJA V, et al., 1995; LI CM, et al., 1998). Ressalta-se que dessa espécie já foram isolados os seguintes constituintes: ácido caurenóico, anogloxina e 27-hidroxibullatacina (**Figura 1.H e 1.I**) (HSIEH TJ, et al., 2004; CRUZ PEO, et al., 2011; VILA-NOVA NS, et al., 2011). E a atividade anticâncer já foi relatada contra carcinoma de nasofaringe (WARTHEN D, et al., 1969). Tais aspectos mostram o potencial da planta para estudos.

Para realizar a análise da atividade antileishmania, inicialmente realizamos o estudo fitoquímico de *A. glabra* para obtenção das amostras testadas. O extrato etanólico foi submetido a particionamento, produzindo fração de hexano (FH; 8,7%) e fração metanol-água (FM; 88,1%). As análises cromatográficas do extrato e frações (FH e FM) apresentaram dois picos principais que se repetiram em cada amostra, o primeiro com tempo de retenção 38.442 minutos (UV λ de 256 e 356) e o segundo com tempo de retenção de 44.691 minutos (UV λ 256 nm e 310,6 nm). Os espectros de UV sugerem que essas substâncias são flavonoides. A Rutina foi isolada da subfração (grupo 3) obtida do fracionamento da fração de metanol.

As amostras obtidas de *A. glabra* (EE, FH, FM e Rutina) foram avaliados quanto à atividade antipromastigota e citotoxicidade. A tabela 1 mostra que nenhuma das amostras foi considerada ativa na forma promastigota de *L. amazonensis*. Também não foram consideradas tóxicas para células THP-1 que foram submetidas a processo de indução (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Atividade antipromastigota e citotoxicidade de *Annona glabra*.

Amostras	<i>L. amazonensis</i> CI ₅₀ (µg/mL)	Macrófago (THP-1) CC ₅₀ (µg/mL)	IS
Extrato etanólico	>200.0	>500.0	>2,5
Fração de Hexano	>200.0	>500.0	>2,5
Fração de Metanol	>200.0	>500.0	>2,5
Rutina	>200.0	>500.0	>2,5
Anfotericina B	0,1699 ± 0,0004	>100.0	>588,581

Legenda: CI₅₀: concentração inibitória de 50% de parasitos; CC₅₀: concentração citotóxica de 50% de células; IS: índice de seletividade.

Fonte: Brigido HPC, et al., 2020.

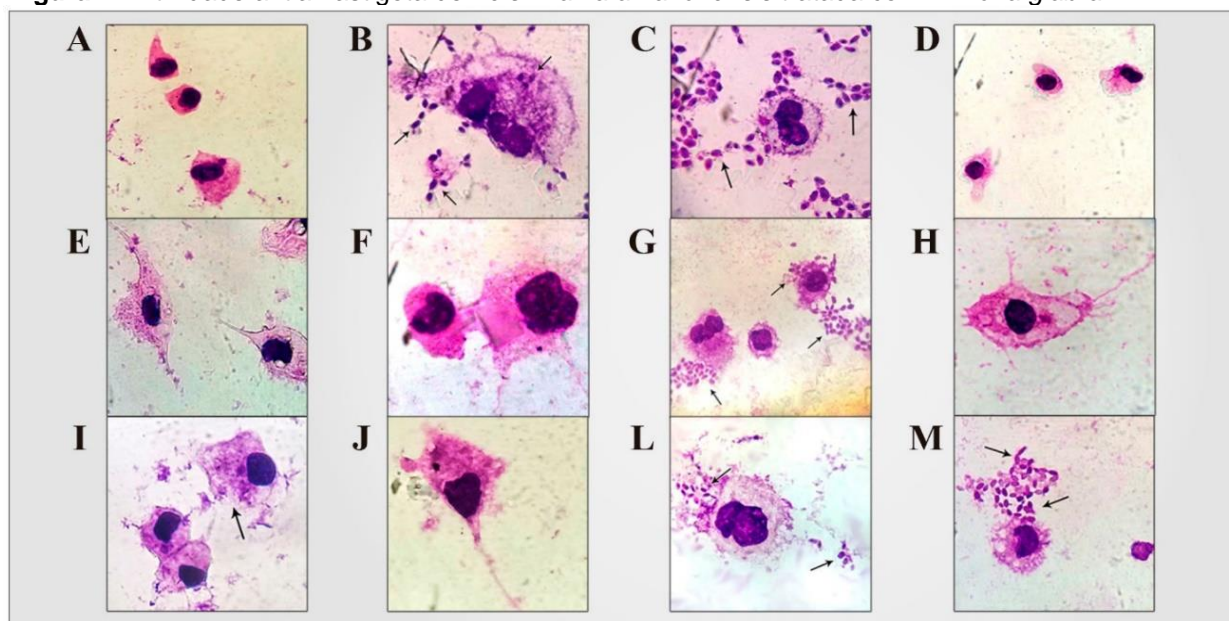
Todas as amostras foram submetidas à avaliação de atividade contra a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* (**Tabela 2**). Embora o extrato etanólico, a FM e a Rutina não tenham reduzido a taxa de infecção em macrófagos, a FH reduziu a infecção de maneira dependente da dose (250 µg/mL = 39,1%; 125 µg/mL = 18,7% e 62,5 µg/mL = 4,6%) (**Tabela 2; Figura 2**).

Tabela 2 - Avaliação da atividade anti-amastigota de *Leishmania amazonensis* tratada com *Annona glabra*.

Amostras	Concentração testada	% inibição
Extrato etanólico	250 µg/mL	0
Fração de Hexano	250, 125 e 62,5 µg/mL	39,1; 18,7; 4,6
Fração de Metanol	250µg/mL	0
Rutina	250µg/mL	0
Anfotericina B	50, 25 e 12,5 µg/mL	86,7; 81,5; 79,9

Legenda: ND: Não determinado. **Fonte:** Brigido HPC, et al., 2020.

Figura 2 - Atividade anti-amastigota de *Leishmania amazonensis* tratada com *Annona glabra*.



Legenda: A- Macrófagos não infectados; B-Control negativo; C-Control do solvente ; D-Anfotericina B na concentração 50 µg/mL, E-anfotericina B na concentração 25 µg/mL e F-anfotericina B na concentração 12,5 µg/mL; G: Extrato etanólico na concentração de 250 µg/mL; H-Fração de hexano na concentração de 250 µg/mL; I-Fração de hexano na concentração de 125 µg/mL; J-Fração de hexano na concentração de 62,5 µg/mL; L-Fração de metanol na concentração de 250 µg/mL; M-Rutina na concentração de 250 µg/mL. Presença de amastigotas indicada por setas.

Fonte: Brigido HPC, et al., 2020.

DISCUSSÃO

O potencial dos produtos naturais e seu uso na medicina tradicional para o tratamento de doenças os torna alvo de pesquisas para novos fármacos (ROCHA FAG, et al. 2013). Relacionado a doenças parasitárias, essa questão não é diferente. Diversos estudos têm demonstrado que espécies da família Annonaceae são fontes de metabólitos secundários com atividade antileishmania, além disso, o uso dessas espécies é abrangente na medicina popular (SAEZ J, et al., 1998; JARAMILLO MC, et al., 2000; COSTA EV, et al., 2009; VILA-NOVA NS, et al., 2011). Nesse sentido, buscamos avaliar o comportamento de umas das espécies do gênero descrito, *A. glabra*, com a premissa de que encontraríamos evidências de atividade antileishmania em tal espécie.

Após análise do cromatograma do extrato etanólico obtido das cascas de *A. glabra*, verificou-se que este apresenta compostos com polaridades baixa, média e alta. Dois principais sinais de maior intensidade foram identificados com tempo de retenção de 38,422 min. e 44,691 min., com espectros em UV de λ de 256 e 356 nm para o primeiro sinal e UV λ 256 nm e 310,6 nm para o segundo sinal. Segundo Alonso-Salces RM et al. (2004), o pico em 256 é sugestivo do da banda II (anel A, porção benzoil), já o pico em 356 nm e 310,6 nm pode estar relacionado com a banda I (anel B, porção cinamoil) do flavonoide.

De forma semelhante ao extrato etanólico, o cromatograma das frações de hexano (FH) e de metanol (FM), apresentaram sinais com tempo de retenção de 38,422 e 44,691 min., sendo seus espectros em UV iguais aos do extrato. Logo, a FH e FM também devem conter flavonoides (ALONSO-SALCES RM, et al., 2004). A partir do fracionamento da FM, foi possível identificar por RMN, pela primeira vez na espécie, um flavonoide conhecido como Rutina.

Estudos com outras espécies de *Annona*, conseguiram isolar vários flavonoides, a exemplo da *Annona muricata* que identificou a Rutina e a Quercetina-3-glucosídeo. A partir do extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* foram isolados os flavonoides Quercetina-3-O-b-D-glicopiranosil (1-6) -O-a-L-arabinosídeo e Quercetina-3-O-a-L-arabinosídeo (PIMENTA LPS, 1995). Além desses, também foi relatado o isolamento

de alcaloides e acetogeninas (PIMENTA LPS, 1995; COSTA EV, et al., 2009; VILA-NOVA NS, et al., 2011). No entanto, no presente estudo essas substâncias não foram detectadas no extrato e suas frações de *A. glabra*.

Uma hipótese para a ausência dessas substâncias pode estar relacionada com o desvio de rota metabólica. Há evidências de que os fungos, em particular os basidiomicetos, são de grande importância na conversão de compostos aromáticos de plantas devido à sua capacidade de degradar a lignina. No entanto, os monômeros aromáticos liberados pela lignina e outros compostos aromáticos são tóxicos para a maioria dos fungos, e a conversão desses compostos em metabólitos menos tóxicos é essencial (MÄKELÄ MR, et al., 2015). Muitos alcaloides têm propriedades fungicidas e sua rota metabólica pode ter sido desviada para a síntese de flavonoides (PÉREZ-LAÍNEZ D, et al., 2008; LI Z, et al., 2015). Talvez os fungos encontrados nas cascas de *A. glabra*, observados durante sua coleta, estejam relacionados à ausência de alcaloides e acetogeninas.

Ao analisar os resultados da atividade antileishmania das amostras de *A. glabra* frente a forma promastigota de *L. amazonensis*, observa-se inatividade nas amostras do presente estudo, embora a literatura mostre que outras espécies de *Annona* já apresentaram alto potencial antileishmania. O extrato etanólico obtido de cascas das raízes, cascas dos caules e madeira dos caules de *Annona crassiflora* mostraram-se ativos contra promastigotas de *L. donovani*, apresentando valores de CI_{50} entre 3,7 a 12,4 $\mu\text{g/mL}$ (MESQUITA ML, et al., 2005).

O óleo volátil de *Annona foetida* apresentou atividade contra promastigotas de *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* com CI_{50} respectivamente de 4,1 $\mu\text{g/mL}$, 9,9 $\mu\text{g/mL}$, 16,2 $\mu\text{g/mL}$ e 27,2 $\mu\text{g/mL}$, no entanto, apresentou citotoxicidade em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos da linhagem BALB/c (COSTA EV, et al., 2009).

Extratos obtidos das folhas e ramos de *Annona senegalensis* mostraram atividade contra promastigotas de *L. Donovanii* com CI_{50} de 10,8 $\mu\text{g/mL}$ e 27,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, no entanto, as duas amostras foram moderadamente citotóxicas para células T humanas de leucemia aguda com CC_{50} de 273,49 $\mu\text{g/mL}$ e 127,95 $\mu\text{g/mL}$ (OHASHI M, et al., 2018). Tais atividades foram associadas a presença de alcaloides e acetogeninas isoladas destas espécies (TEMPONEAG, et al., 2005; COSTA EV, et al., 2009; VILA-NOVA NS, et al., 2011).

Dos estudos disponíveis na literatura referente a atividade antileishmania de espécies de *Annona*, verifica-se uma carência de pesquisas que avaliem a atividade contra a forma intracelular (amastigota). Um dos poucos estudos, demonstrou que extratos obtidos da *Annona mucosa* foram testados em *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. A maioria dos extratos apresentou atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* ($CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$), e não foi observada redução significativa na taxa de infecção de macrófagos por amastigotas (LIMA JPS, et al., 2012).

Quanto ao possível mecanismo de ação para redução da taxa de infecção ocasionada pela FH rica em compostos fenólicos, estudos comprovaram que os flavonoides estão envolvidos na via biosintética da poliamina, uma via essencial para o crescimento de *Leishmania* que é vital para a produção de tripanotona, o composto antioxidante Trypanosomatidae (COLOTTI G, ILARI A, 2011; DA SILVA ER, et al., 2012).

Sabe-se que a inibição da arginase pela quercetina pode diminuir a produção de tripanotona, aumentando o efeito terapêutico de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzida pela célula hospedeira (DA SILVA ER, et al., 2012; DA SILVA ER, et al., 2019).

Outro estudo demonstrou que os dímeros de flavonoides apresentam atividade antipromastigota (CI_{50} : 0,19 a 0,69 μM) e anti-amastigota (CI_{50} : 0,17 a 2,2 μM) contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. major* (WONG IL, et al., 2014). Além disso, os dímeros sintéticos de flavonoides podem inibir a atividade de bombeamento dos transportadores de cassetes de ligação ao ATP (ABC), resultando em aumento da concentração intracelular de fármacos e reversão da resistência dos parasitas aos medicamentos em *Leishmania* (WONG IL, et al., 2014). Da mesma forma, a rutina não possui atividade antiparasitária, no entanto, assim como ocorre com outros flavonoides, ao ser associada à Pentamidina, pode produzir um efeito sinérgico. Esse sinergismo pode estar relacionado à inibição da atividade de bombeamento dos transportadores de cassete de ligação ao ATP (ABC), resultando no aumento da concentração intracelular de

fármacos. Nesse sentido, investigação minuciosa sobre tal mecanismo de ação é imprescindível, principalmente porque um dos problemas relacionados à terapia medicamentosa da LC é a resistência dos parasitas aos medicamentos disponíveis (SUNDAR S, et al., 2012; FREZARD F, et al., 2014)

Nesse aspecto, evidenciamos a importância dos estudos em espécies de plantas da Amazônia relacionada às doenças que afetam seus nativos, especialmente de gêneros usados na medicina tradicional. Apesar de, inicialmente, os resultados não se apresentarem em acordo com a premissa inicial do trabalho, deve-se investigar sobre a ação de *A. glabra*, especialmente da FH, ademais, este é o primeiro relato de estudo com enfoque na espécie, relacionada à avaliação de atividade antileishmaniana, servindo de parâmetro inicial para novas pesquisas envolvendo a planta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espécies do gênero *Annona* são promissoras para o tratamento da leishmaniose, tendo em vista a importância do fracionamento do extrato e do isolamento de alcaloides, acetogeninas ou flavonoides, uma vez que muitos destes compostos possuem atividade antiparasitária. Vale ressaltar que, os flavonoides podem ser uma ferramenta importante para o tratamento da leishmaniose, pois além de diminuir a produção de tripanotona do protozoário e aumentar o efeito terapêutico das células hospedeiras, podem ser uma alternativa para parasitas resistentes a medicamentos. No entanto, a atividade inibitória dos flavonoides nos transportadores de fita de ligação ao ATP precisa ser melhor investigada.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Bolsa DT 310608 / 2013-9; Universal 483894 / 2012-5) e à Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA; PPSUS 2009) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. ALVES TM, et al. A Diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 1995; 61: 85-87.
2. ALONSO-SALCES RM, et al. Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *J Agr Food Chem*, 2004; 52(10), 2938-2952.
3. COLOTTI G, ILARI A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione, *Amino Acids*, 2011; 40: 269-285.
4. COSTA EV, et al. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Quim. Nova.*, 2009; 32: 78-81.
5. CROFT S, COOMBS G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.*, 2003; 19: 502-508.
6. CRUZ PEO, et al. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 2011; 39: 872-875.
7. DA SILVA ER, et al. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase, *Exp. Parasitol.*, 2012; 130: 183-188.
8. DA SILVA ER, et al. Dietary polyphenols rutin, taxifolin and quercetin related compounds target *Leishmania amazonensis* arginase. *Food & function*, 2019; 10(6): 3172-3180.
9. DA SILVA E SILVA JV. et al. Flavopereirine-An Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*-Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. *Molecules*, 2019; 24(4): 785.
10. DELORENZI JC, et al. In vitro activities of iboga alkaloid congeners Coronaridina na 18-methoxycoronaridina against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002; 46(7): 2111-2115.
11. FREZARD F, et al. Antimony transport mechanisms in resistant *Leishmania* parasite. *Biophysical Reviews*, 2014; 6(1): 119-132.
12. HSIEH TJ, et al. Chemical Constituents from *Annona glabra*. *J Chin Chem Soc.* 2004; 51: 869-876.
13. JARAMILLO MC, et al. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, 2000; 71: 183-186.
14. LI CM, et al. Cyclopeptides from the seeds of *Annona glabra*, *Phytochemistry*; 1998; 47: 1291-1296.
15. LI Z, et al. Synthesis and Fungicidal Activity of β -carboline Alkaloids and their derivatives. *Molecules*, 2015; 20(8): 13941-13957.
16. LIMA JPS, et al. In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.*, 2012; 4: 692-702.
17. MÄKELÄ MR, et al. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. *Advances in Applied Microbiology*, 2015; 91: 63-137.

18. MATRANGOLO FS, et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol Biochem Parasitol.*, 2013; 190(2): 63-75.
19. MESQUITA ML, et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005; 100 (7): 783-787.
20. MOSMAN T. Rapid colorimetry assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol methods*, 1983; 65(1-2): 55-63.
21. MOTA EF, et al. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. *Pharmacogn.*, 2015; 11: 601-606.
22. NAKAMURA CV, et al. "Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2006; 16(1): 61-66.
23. NGURE PK, et al. In vitro antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009; 3(2): 61-66.
24. OHASHI M, et al. In vitro antiprotozoan activity and mechanisms of action of selected Ghanaian medicinal plants against *Trypanosoma*, *Leishmania*, and *Plasmodium* parasites. *Phytotherapy Research.*, 2018; 32(8): 1617.
25. OLIVEIRA RAG, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev. bras. Farmacogn.*, 2005; 16: 77-82.
26. PADMAJA V, et al. Biological activities of *Annona glabra*, *J Ethnopharmacol.*, 1995; 48: 21-24.
27. PÉREZ-LAÍNEZ D, et al. Bactericidal and fungicidal activities of *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Z Naturforsch C.*, 2008; 63(9-10): 653-7.
28. PIMENTA LPS. Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas. Tese (Doutorado em Química) -Departamento de Química. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.
29. PONTES AF, et al. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. *Acta bot. bras.*, 2004; 18(2): 281-293.
30. ROCHA FAG, et al. Características do comércio informal de plantas medicinais no município de Lagoa Nova/RN. *Holos.*, 2013; 5: 264-281.
31. SAEZ J, et al. Leishmanicidal activity of *Annona aff. spraguei* seeds. *Fitoterapia.*, 1998; 69: 478-479.
32. SUNDAR S, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clinical Infections Diseases*. 2012; 55(4): 543-550.
33. TEMPONE AG, et al. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, 2005; 12: 382-390.
34. VIEIRA HS, et al. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16,betaH-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. *J Agric Food Chem.*, 2002; 50: 3704-3707.
35. VILA-NOVA NS, et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2011; 44: 567-571.
36. WARTHEN D, et al. Tumor inhibitors: Liriiodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. *J Pharm Sci.*, 1969; 58:637-638.
37. WHO, Leishmaniasis, WHO, 2018, Available: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/> Accessed January 25, 2020.
38. WONG IL, et al. In Vitro and In Vivo Efficacy of Novel Flavonoid Dimers against Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6): 3379–3388.