



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA- CCSST
CURSO DE MEDICINA

ANA KARINE LOPES VILANOVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTÓXICA DE
STACHYTARPHETA CAYENNENSIS.**

IMPERATRIZ

2019

ANA KARINE LOPES VILANOVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E CITOTÓXICA DE
STACHYTARPHETA CAYENNENSIS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, Campus Imperatriz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof Dr Lucya Alves de Carvalho Silva.

IMPERATRIZ

2019

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

Vilanova, Ana Karine Lopes.

Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica de
Stachytarpheta cayennensis / Ana Karine Lopes Vilanova. -
2019.

26 f.

Orientador(a): Luécya Alves de Carvalho Silva.

Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão,
Imperatriz, 2019.

1. Gervão. 2. Leishmaniose. 3. Plantas medicinais.
I. Silva, Luécya Alves de Carvalho. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
CURSO DE MEDICINA

Candidato: Ana Karine Lopes Vilanova

Título do TCC: **Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica de *Stachytarpheta cayennensis*.**

Orientador: Luecya Alves de Carvalho Silva.

A Banca Julgadora de trabalho de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado

Reprovado

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me iluminado e dado forças pra enfrentar as lutas diárias, à minha família (pai, mãe, irmão, vó) que nunca pouparam esforços pra que eu pudesse seguir meus sonhos e fazer um segundo curso superior sem a necessidade de trabalhar para me manter. Ao meu companheiro Leandro, obrigada por todo o apoio e compreensão sempre. À minha orientadora pela paciência em me nortear no desenvolvimento dessa pesquisa.

RESUMO

Introdução: O uso de plantas no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma prática antiga entre populações de áreas endêmicas, destacando-se a espécie vegetal *Stachytarpheta cayennensis*. Este estudo busca analisar, *in vitro*, o efeito do extrato e frações das partes aéreas de *S. cayennensis* na infecção por *Leishmania amazonensis*. **Metodologia:** Coleta e obtenção do extrato de *S. cayennensis*. Avaliação da atividade antipromastigota e citotoxicidade sobre os macrófagos; além de se avaliar a presença de fenóis e flavonoides no extrato. Por fim foi realizado a análise estatística, onde os valores obtidos foram submetidos à Análise de Variância. **Resultados:** O gervão bruto e frações foram analisados em diferentes concentrações, três concentrações de gervão bruto (100, 50, 25 µg/mL) apresentaram inibição do crescimento da leishmania (CL) de 30%; A fração hexânica (200 µg/mL) apresentou inibição do CL em 38,8%; enquanto a fração clorofórmica (400µg/mL) mostrou efeito inibitório de 47%; e por fim a fração acetato (50 µg/mL) apresentou um efeito inibitório de 38,8%. Quando a citotoxicidade a fração acetato manteve a viabilidade adequada dos macrófagos. Quanto aos fenóis e flavonoides tanto o extrato bruto quanto as apresentaram concentrações bastante elevadas desses compostos químicos. **Conclusão:** É necessário continuar os experimentos para confirmarmos ou refutarmos o potencial antileishmania do gervão, além de sua citotoxicidade bem como levantar quais os outros compostos fenólicos presentes.

Palavras-chave: Leishmaniose. Gervão. Plantas medicinais.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	22

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças crônicas e infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. As diversas formas clínicas estão relacionadas à espécie de *Leishmania*, à carga parasitária na infecção e à condição imunológica do hospedeiro ^{1,2}.

As formas clínicas das leishmanioses podem se apresentar em duas: Leishmaniose Visceral (LV), que atinge os órgãos internos, Leishmaniose Tegumentar (LT), que se subdivide em Leishmaniose Cutânea (LC), que atinge a pele e a Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM), as mucosas e a pele ³.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos por picada de mosquitos flebotomíneos. A forma promastigota é introduzida no hospedeiro vertebrado e fagocitada pelas células no sistema de fagócitos mononucleares, onde se diferenciam em amastigotas, proliferam e estabelecem uma infecção ⁴.

As drogas atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar (LT) são as seguintes: antimoniato de meglumina (primeira escolha), isetionato de pentamidina e anfotericina B (desoxicolato e lipossomal). Todos são de uso exclusivamente parenteral, necessitam de acompanhamento especializado com controle laboratorial rigoroso, seus principais efeitos adversos são alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas que dificultam a adesão ao tratamento. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos ^{5,6}.

O uso de plantas no tratamento LTA é uma prática antiga entre as populações das áreas endêmicas, o Município de Buriticupu-MA, área endêmica para LTA, destaca-se nas

preparações vegetais utilizadas pela população no tratamento das úlceras causadas por *Leishmania* sp, uma das mais utilizadas por eles foi o extrato das folhas de *Stachytarpheta cayennensis*⁷.

Stachytarpheta cayennensis (Rich) Vahl, conhecida popularmente como gervão, rinchão e vassourinha-de-botão, pertence à família Verbanaceae é encontrada em várias regiões do mundo. Tem sido utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatória, analgésica, antipirética, hepatoprotetora, laxante e no tratamento de distúrbios gástricos. Sua composição química apresenta alcalóides, glicosídeos, taninos, saponinas, flavonóides, esteróides, quinonas, compostos fenólicos e ácido glicogênico, sendo que alguns destes constituintes químicos também estão contidos em várias espécies vegetais com efeitos leishmanicidas^{8,7}.

Baseado no uso popular e nos constituintes químicos da *S. cayennensis* conclui-se que indicam um potencial efeito anti-*Leishmania*, devido a isso e aos efeitos colaterais do tratamento vigente, observa-se a necessidade de complementar o que já existe hoje de tratamento com o extrato de *Stachytarpheta cayennensis*.

O objetivo do presente estudo foi estudar, *in vitro*, o efeito do extrato, frações das partes aéreas da espécie *S. cayennensis* na infecção por *Leishmania amazonensis*. Analisando sua atividade leishmanicida anti-promastigota, bem como a atividade leishmanicida do extrato em macrófagos infectados com amastigotas *L. amazonensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato de *Stachytarpheta cayennensis* identificação e/ou elucidação de substâncias específicas.

A espécie vegetal *Stachytarpheta cayennensis* foi coletada no município de Caxias-MA (latitude 4°51'32" sul , longitude 43°21'22" oeste, altitude de 66 metro) , identificada no Herbário do Maranhão (MAR) do Departamento de Biologia(CCBS) da Universidade Federal do Maranhão, com a seguinte numeração de tomo: 10.538.

As folhas de *S.cayennensis* foram submetidas à secagem em temperatura ambiente (25 ± 3 °C), por 15 dias. Após a secagem foram pesadas em balança semianalítica dando um total de 332,19g de planta seca. O material seco foi triturado em moinho elétrico (WILLYE TE-648), após trituração o material foi pesado novamente contabilizando 317,84g.

Em seguida o material foi extraído por maceração de exaustão em etanol 70%, na proporção de 1:5 de etanol, onde permaneceu por 7 dias em temperatura ambiente, na semana seguinte o material foi filtrado no sistema a vácuo . O filtrado foi estocado em frascos estéreis em refrigeração. Em seguida o triturado foi novamente diluído em álcool 70% onde permaneceu por 7 dias. O processo foi repedido por 3 semanas, ou seja foram obtidos 6L de extrato em maceração de 21 dias, após isso o extrato permaneceu em refrigeração até se iniciar o processo de concentração através de condensação no rotaevaporador.

Fracionamento

O fracionamento foi realizado pela partição líquido-líquido, ou seja, pela partição sequencial com solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) em balão de separação, a partir de uma solução hidroalcoólica do extrato seco até o líquido extrator não apresentar mais coloração ⁹.

Após a partição cada fração de *S. cayennensis* foi mantida em refrigeração onde individualmente foram submetidas ao rotaevaporador obtendo-se o seguinte: 0,8334g de fração hexânica, 0,301g de fração clorofórmica, 0,2633g de fração acetato e 8,1592 g de fração metanólica. De cada fração, bem como do extrato bruto foram retiradas 20 mg onde se adicionou 1 ml de etanol e se armazenou em eppendorfs para o posterior deslocamento ao Laboratório de Imunofisiologia onde os extratos seriam testados com protozoários de *Leishmania* e células. Além disso, foram preparados outros eppendorfs com 5mg de cada fração e extrato bruto dissolvidas em 1 ml de metanol para posterior análise química no HPLC no Campus de Imperatriz mesmo.

Atividade anti-promastigota in vitro.

A atividade leishmanicida dos extratos foi avaliada pela inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* cedidos pelo Laboratório de Imunofisiologia. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider suplementado com soro fetal bovino 10% à temperatura ambiente (25°C) ⁶. Antes de cada experimento observou-se ao microscópio a motilidade flagelar dos parasitos. As promastigotas foram lavadas em salina estéril, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 5×10^5 /mL. Para os ensaios, foi adicionado em 980 µL de meio em cada eppendorf, onde se acrescentou 20 µL de extrato com intuito de se obter uma concentração de 400 µg/mL; esse preparo foi realizado tanto no extrato bruto como nas frações. Deste, foram retirados 200 µL e adicionados nas fileiras 1 e 6 da placa, em seguida adicionamos 100 µL do meio nos poços das fileiras 2,3,4,5,7,8,9 e 10. Posteriormente, foi realizada a homogeneização em todas as fileiras. Adicionamos 100 µL de meio nos poços. Em seguida, em cada poço foram então adicionados 150 µL de uma suspensão de promastigotas de *L. amazonensis* contendo $5,5 \cdot 10^7$ leishmania. Após 24h de preparação da placa a mesma foi retirada da câmara B.O.D, em seguida

adicionou-se 10 µL de MTT em cada poço. Após 3h da aplicação do MTT adicionou-se 100 µL de SDS 10% em cada poço com incubação overnight. No dia seguinte, a placa foi lida no espectrofotômetro com absorvância de 540 nm.

Atividade citotóxica de *S. cayennensis* in vitro.

Para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado o método de MTT ¹⁰. Brevemente, 2 x 10⁵ macrófagos/100 µL foram cultivados em placas de 96 poços, fundo chato, na presença do extrato de *S. cayennensis* nas concentrações de 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL. Em alguns poços os macrófagos foram cultivados apenas em meio RPMI completo, sem a presença do extrato, como controle. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi colhido e as placas lavadas cuidadosamente com PBS para retirar todo o extrato. Foram adicionados a cada poço 100µL de meio RPMI completo e ainda 10 µL de MTT (Sigma). Após 3 horas de incubação a 37 °C em estufa úmida e ao abrigo da luz, foram adicionados em cada poço 100 µL de uma solução de SDS (Sigma) 10%/HCL. As placas foram incubadas em temperatura ambiente “overnight” e foram então lidas em leitor de microplacas utilizando filtro de 540 nm. A citotoxicidade foi calculada com base na seguinte fórmula: %c = 100 - (DO Mo + extrato x 100 / DO Mo + meio) ⁷.

Avaliação do teor de fenóis

Preparou-se a solução em estoque (extrato), em uma concentração de 2000 ug/mL, pesando 200mg (0,02g) de extrato seco, em seguida a dissolvendo em etanol/metanol P.A. O segundo foi preparo das diluições em triplicata que consistiu em: 2,8 mL de H₂O + 1 mL Na₂CO₃ (agitar) + 100 uL extrato (agitar) + 100uL Folin, em seguida realizou-se a preparação do branco que consiste em 2,8 mL de H₂O + 1 mL Na₂CO₃ (agitar) + 100uL Folin.

Por fim realizou-se a homogeneização das substâncias, mantendo as amostras em ambiente sem luz por 2 horas, em seguida as amostras foram analisadas em espectrofotômetro (760 nm). Sempre zerando o espectrofotômetro com o branco.

Avaliação do teor de flavonoides

Preparou-se a solução em estoque (extrato), em uma concentração de 2000 µg/mL, pesando 200 mg (0,2 g) de extrato seco, em seguida dissolvendo em etanol/metanol P.A. Em seguida realizou-se o preparo das diluições em triplicata que consiste em 3 mL de etanol + 500 µL solução estoque + 500 µL AlCl₃. Já o preparo do branco consistiu em 3,5 mL de etanol/metanol + 500 µL AlCl₃.

Por fim realizou-se a homogeneização dos tubos, mantendo as amostras em ambiente sem luz por 30 minutos, logo em seguida realizou-se a leitura do espectrofotômetro (424 nm), sempre zerando o branco e anotando a absorvância.

Análise estatística

A partir da obtenção dos dados laboratoriais foi feita a análise estatística e conclusão da pesquisa. Os valores obtidos nos diferentes grupos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste Tukey-Kramer para comparações múltiplas dos dados paramétricos e do teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

RESULTADOS

Em relação à atividade leishmanicida do extrato sobre as formas promastigotas da *Leishmania amazonensis* foi obtido os seguintes resultados:

FIGURA 1: Efeito leishmanicida do gervão (*S.cayennensis*) e de suas frações.

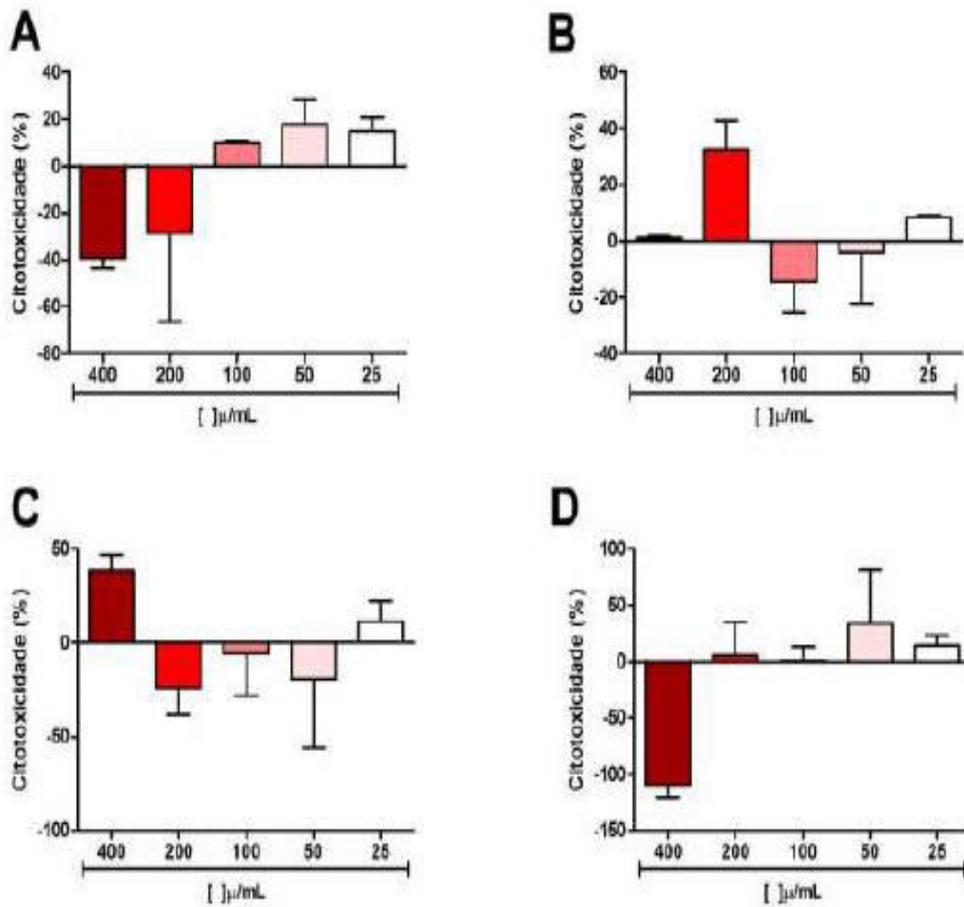


Figura 01- Efeito leishmanicida do gervão (*S.cayennensis*) e de suas frações. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider suplementado com soro fetal bovino 10% à temperatura ambiente (25°C). **Figura A:** GVB- Gervão Bruto; **Figura B:** GVFH- Gervão Fração Hexânica; **Figura C:** GVFC-Gervão Fração Clorofórmica; **Figura D:** GVFA-Gervão Fração Acetato.

O extrato bruto de Gervão (GVB) na concentração de 400 µg/mL e 200 µg/mL estimularam o crescimento da leishmania. Por outro lado, as frações menos concentradas (100,50, 25µg /mL) inibiram o crescimento da leishmania, atingindo um percentual de 30% de inibição ao crescimento.

Já a fração Hexânica (GVFH) nas concentrações maiores, principalmente de 200µg/mL, apresentou uma inibição do crescimento da Leishmania em 38,8%; contudo as frações intermediárias 100 µg/mL, 50 µg/mL favoreceram o crescimento da leishmania, enquanto a menor concentração (25 µg/mL) apresentou um efeito inibitório ao crescimento da leishmania de 10%.

A fração clorofórmica (GVFC) é a que melhor apresenta um efeito inibitório na concentração de 400 µg/mL, 47%. As concentrações de 200,100,50 µg/mL estimularam o crescimento da leishmania, já a de 25µg /mL teve um efeito inibitório de cerca de 18%

No GVFA, que representa a fração acetato, observamos que essa fração em sua maior concentração 400 µg/mL, estimulou o crescimento da leishmania em 119%; Contudo a concentração de gervão 50 µg/mL apresentou um efeito inibitório da leishmania em torno de 47%.

Quanto a avaliação da atividade citotóxica do extrato e suas frações foram encontrados os dados abaixo apresentados:

FIGURA 2: Citotoxicidade do gervão (*S.cayennensis*) e suas frações.

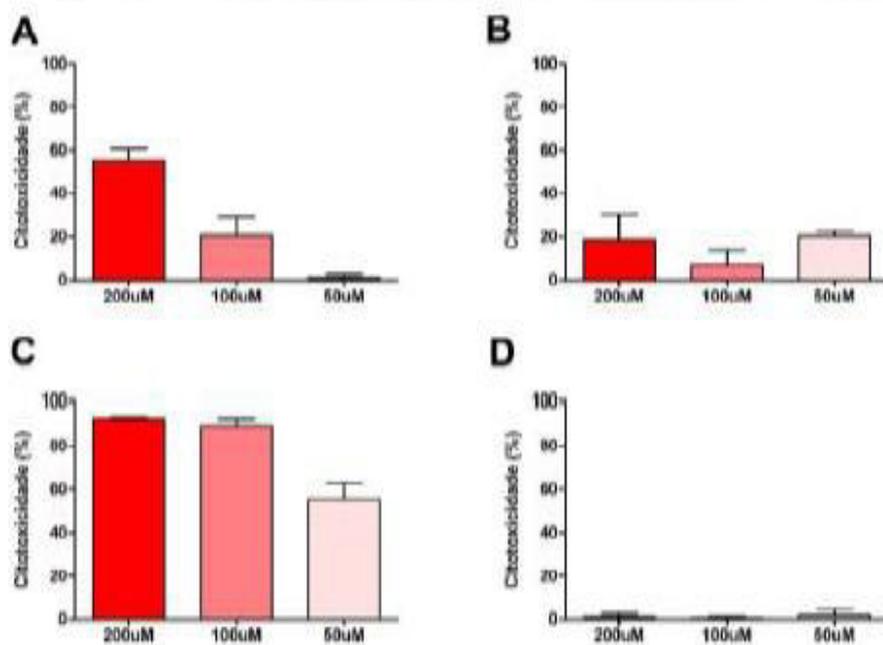


Figura 02- Citotoxicidade do gervão (*S.cayennensis*) e suas frações. Para o ensaio de citotoxicidade foi utilizado o método de MTT, macrófagos cultivados em placas de 96 poços, com extrato de *S. cayennensis* em diferentes concentrações. Em alguns poços os macrófagos foram cultivados apenas em meio RPMI completo, como controle. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (A)- Gervão Bruto; (B)- Gervão Fração Hexânica; (C)- Gervão Fração Clorofórmica; (D)- Gervão Fração Acetato.

Em a relação a citotoxicidade a única fração que apresenta níveis quase irrisórios de citotoxicidade aos macrófagos é a fração acetato (D), a fração gervão bruto (A) na concentração de 50 µg/mL apresenta citotoxicidade menor que 1%, ao contrário das concentrações maiores que já apresentam porcentagens bem elevadas de citotoxicidade. A fração hexânica (B) apresenta citotoxicidade em todas as concentrações embora menores que a bruta, já a clorofórmica (C) chega ao nível de citotoxicidade de praticamente 100% na maior concentração, contudo a fração acetato mostrou resultados promissores com menos de 1% de

citotoxicidade em todas as concentrações. Quanto as concentrações dos compostos químicos fenóis e flavonoides os dados são apresentados na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1: Concentração de Fenóis Totais e Flavonoides da *Stachytarpheta cayennensis*

Extrato e frações	Rendimento (%)	Fenóis totais (mg/g) ^{a,b}	Flavonoides totais (mg/g) ^{a,c}
GVB	28,89% ±	156,90± 0,004	18,06±0,02
GVFH	0,262%	55,19±0,009	9,94±0,01
GVFC	0,094%	231,75±0,024	42,94±0,03
GVFA	0,082%	383,16±0,022	32,57±0,03
GVFM	2,5%	116,22±0,065	13,23±0,01

GVB: gervão bruto, GVFH: fração hexânica, GVFC: fração clorofórmica; GVFA: fração acetato, GVFM: fração metanólica; ^aResultados representam médias equivalentes ± desvio padrão (n= 3); ^b miligramas equivalente de ácido gálico por grama de extrato; ^c miligramas equivalente de quercetina por grama de extrato.

Foi encontrado no gervão bruto (GVB) 156,9 mg/g de fenóis totais bem como 18,06 mg/g de flavonoides. Na fração hexânica (GVFH) obteve-se 55,19 mg/g de fenóis totais e 9,94 mg/g de flavonoides. A clorofórmica (GVFC) apresentou 231,75 mg/g de fenóis totais com 42,94 mg/g de flavonoides. Em relação a acetato (GVFA) obteve-se 383,16 mg/g de fenóis totais, 32,57 mg/g de flavonoides. Por fim a fração metanólica (GVFM) apresentou os seguintes resultados 116,22 mg/g fenóis totais, 13,23 mg/g flavonoides.

DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as espécies vegetais são a maior fonte de fármacos para humanidade. Considerando isto diversos estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas ^{11,12}.

Diversos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida e/ou anti-Leishmania ^{13,14,15,16,17}.

Em um levantamento sobre o uso de plantas medicinais nas feridas da leishmania no município de Buriticupu, interior do Maranhão, ficou notório a utilização de várias espécies vegetais, dentre elas a *Stachytarpheta cayennensis* (gervão), demonstrando a atividade anti-leishmania do extrato alcóolico das folhas de gervão nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ¹⁸.

Já em outro estudo também realizado no município de Buriticupu-MA trabalhou com essa mesma espécie vegetal, apresenta uma diferença em relação ao nosso quanto à coleta e a maceração. Nele a maceração do vegetal foi em 6 dias além do fato de a coleta do espécime ser realizada em fevereiro, o que diferente da nossa maceração de 21 dias e coleta em novembro, isso pode ter levado alguma mudança no extrato⁷. Além disto a coleta foi realizada em cidades diferentes, a saber, Buriticupu sudoeste Maranhense e Caxias leste maranhense. Devido às modificações do método extrativo, da época do ano, e do local de coleta, levantamos que essas mudanças possam ter trazidos os dados não tão fidedignos ao que já se havia reportado na literatura.

Este estudo obteve um rendimento de 28,89% do vegetal em relação às folhas secas, vários fatores podem influenciar no rendimento de um extrato. Os principais são o método extrativo, o tipo de solvente, parte do material vegetal utilizada, a proporção solvente/amostra e o tempo de preparo¹⁹.

Moreira também relata que obteve melhores resultados com *L.braziliensis*, espécie com a qual não trabalhamos, ele cita que esta diferença se refletiu na CI₅₀, uma vez que foi observado que a concentração do extrato necessária para matar 50% das formas promastigotas de *L. braziliensis* foi de 73,7 µg/mL, enquanto a requerida para matar *L. amazonensis* foi de 382,5 µg/mL.

O que observamos em nosso estudo é que de fato em algumas concentrações do gervão possuem potencial anti-leishmania. Além disso, a fração hexânica e acetato foram as que apresentaram melhor efeito. Contudo, outras frações, a exemplo da metanólica, podem apresentar melhor efeito antileishmania.

Também podemos inferir que não obtivemos melhores resultados devido às baixas concentrações testadas, pois Moreira e colaboradores relatam que só obtiveram resultados leishmanicidas contra *L. amazonensis*, numa concentração bem maior de extrato que a *L.brasiliensis*.

Em um estudo que avaliou a citotoxicidade de *S. cayennensis*, obteve-se um resultado promissor em menores concentrações, o que difere deste estudo, pois o gervão foi bastante citotóxico, tanto no bruto quanto nas frações em todas as concentrações. No nosso experimento apenas a fração bruta de 50 µg/mL e a fração acetato que apresentaram pequena atividade citotóxica, mas isso abre espaço para novos testes com concentrações menores⁷. O fato de a fração acetato e menor concentração de gervão bruto serem menos citotóxicas nos

respalda a utilizar essas concentrações no teste dos macrófagos infectados com a forma amastigota.

A presença de fenóis e flavonoides no extrato de *S.cayennensis* corresponde com o que já foi descrito para a família Verbenaceae pela fitoquímica. Dentre as constatações já descritas podem ser citados: alcaloides, flavonóides e saponinas²⁰, polamida iridóides²¹, glicosídeos fenilpropanóides^{21, 22}, flavonóides, cardioativos, antracenosídeos, saponinas hemolíticas, taninos, catéquicos, carotenoides, óleos voláteis, cumarinas e mucilagens²³.

Estes componentes químicos fundamentam as aplicações na medicina popular de *S. cayennensis* que há tempos vem sendo utilizada por suas ações terapêuticas tais como: antimalárica²⁴, antiinflamatória e antiúlcera²⁵, efeito leishmanicida⁷ e redução de hipertensão e acidentes vasculares²⁶.

Alguns estudos que trabalham com frações específicas de polifenóis e flavonoides já levantaram outros efeitos terapêuticos para eles como: imunomodulador, antimicrobiano²⁷, antifúngicos²⁸, antiviral²⁹, antibacteriano^{30, 31, 32,33}, com importante inibição na formação de biofilmes³⁴ além de ativação de linfócitos T (CD8) e células NK citotóxicas³⁵.

Também é importante ressaltar que dentro dos compostos fenólicos uma característica relevante dos flavonoides é a presença de certos grupos funcionais que lhe conferem maior atividade antioxidante³⁶.

Nosso estudo corrobora com a literatura vigente quanto encontra compostos fenólicos e flavonoides no extrato e frações da *S.cayennensis* e tendo em vista a ação desses compostos nas mais diversas funções, eles são de extrema relevância na área médica. Contudo estudo precisa ainda analisar quais os outros fenóis, além de flavonoides que se encontram no extrato e suas frações.

Dado o exposto, existe a necessidade de continuação dos experimentos para confirmarmos ou refutarmos o potencial antileishmania do gervão, além de sua citotoxicidade sobre o macrófago, além de levantar quais os outros compostos fenólicos presentes.

Referências

1. WHO. Diagnosis,detection and surveillance . WHO. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/en/>.
2. Croft SL, Yardley V, Kendrick, H. Drug sensitivity of Leishmania species: some unresolved problems. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002; 96(1): 127-9.
3. Silva TF, Oliveira AB de. Plantas leishmanicidas da Amazônia Brasileira: uma revisão .Revista Fitos.2016; 10(3): 220-372.
4. Martins ALGP, Barreto JA, Lauris JRP, Martins ACGP. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. An Bras Dermatol. 2014; 89(1): 52-8.
5. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. Ed. Atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.180 p.
6. Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM *et al*. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16(Supl.): 631-7.
7. Moreira RCR, Costa GC, Lopes TC, Bezerra JL, Guerra RNM, Rebêlo JMM *et al* . Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.)Vahl (Verbenaceae). Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(1): 59-63.
8. Olayiwola G, Ukponmwan O, Olawode D. Sedative and anxiolytic effects of the extracts of the leaves of *Stachytarpheta cayennensis* in mice. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013; 10 (6): 568-579.

9. Reis AS, Rios CEP, Melo LP, Costa GC, Silva LA, Patrício FJB *et al.* Atividade Leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. Rev Ciênc Saúde. 2012; 14 (2): 119-126.
10. Mosmann ,T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal Immunol Methods. 1983; 65(1-2): 55-63.
11. França F, Cuba CA, Moreira EA, Almeida M, Virgens ML, Marsden PD. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentales*) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 1993; 26 (3):151-5.
12. França F, Lago EL, Marsden PD. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29 (3): 229-32.
13. Moreira RCR, Rebêlo JMM, Gama MEA, Costa JML. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pub. 2002;18 (1): 187-195.
14. Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. Parasitol Today.1994;10 (2): 65-8.
15. Queiroz EF, Roblot F, Cave A. Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. J Nat Prod. 1996; 59 (4): 438-40.
16. Kam TS, Sim KM, Koyana T, Toyoshima M, Hayash M, Komiyama K. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. J Nat Prod. 1998; 61(11): 1332-6.

17. Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*.2005; 12 (6-7) : 514-535.
18. Moreira RCR, Costa JML, Saldanha AC, Silva AR. Projeto Buriticupu Maranhão II. Plantas usadas como terapêutica da leishmaniose tegumentar americana na região de Buriticupu-Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31 (1): 126-8.
19. Oliveira VB, Zuchetto M, Oliveira CF, Paula CS, Duarte AFS, Miguel MD et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clacidad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. *Rev. Bras. Pl. Med*. 2016; 18 (1): 230-239.
20. Ali R, Houghton P, Raman A, Hoult J. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of extracts and constituents of *Oroxylum indicum*. *Phytomedicine*.1998; 5: 375-81.
21. Rodriguez S.M, Castro O. Evaluación y química farmacológica de *Stachytarpheta jamaicensis* (Verbenaceae). *Revista Biologia Tropical*. 1996, 44(2A):353-359.
22. Ferreira JLP. Isolation of verbascoside from *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.2001, 13: 13-24.
23. Souza TJT, Manfron MP, Zanetti GD, Hoelzel S SM, Pagliarin VP . Análise morfo-histológica e fitoquímica de *Verbena litoralis* Kunth. *Acta Farmaceutica Bonaerense*.2005, 24 (2) : 209-214.
24. Froelich S. Phenylethanoide glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a tradicinoal antimalarial plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2008, 18 (4): 517-520.

25. Penido C, Costa KA, Futuro DO, Paiva SR, Kaplan MAC, Figueiredo MR *et al* .Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich.) Vahl. *Journal Ethnopharmacology*.2006,104: 225-233.
26. Chigozie IJ, Eloghosa OB, Augusta O. The hypocholesterolemic effect of *Stachytarpheta cayennensis* tea: implications for the management of obesity and hypertension. *Asian Journal of Biochemistry*.2008, 3(4) :267-270.
27. Matsuda MM, Rambert J, Malvy D, Boisseau HL, Daulouéde S, Thiolat, D *et al*. Quercetin Induces Apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and Decreases the Proinflammatory Response of Human Macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, 48(3): 924 – 929.
28. Salas PM, Céliz G, Geronazzo H, Daz M, Resnik SL. Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*.2011, 124: 1411 – 1415.
29. Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol.Nutr. Food Res*.2007, 51: 116 – 134.
30. Alcaráz LE, Blanco SE, Puig ON, Tomás F, Ferreti FH. Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicilin – resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. theor. Biol*. 2000, 205: 231 – 240.
31. Ávila PH, Smânia E.A, Monache FD, Júnior A S. Structure – activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2008,16: 9790 – 9794.
32. Li Y, Luo Y, Hu Y, Zhu DD, Zhang S, Liu ZJ *et al* . Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.2012, 20: 4316 – 4322.

33. Sato M, Tsuchiya H, Miyazaki T, Fujiwara S, Yamaguchi R, Kureshiro H *et al.* Antibacterial activity of hydroxychalcone against methicilin – resistance *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents, 1996, 6: 227 – 231.
34. Lee JH, Regmi SC, Kim JA, Cho MH, Yun H, Lee CS *et al.* . Apple Flavonoid Phloretin Inhibits Escherichia coli O157:H7 Biofilm Formation and Ameliorates Colon Inflammation in Rats. Infection and Immunity. 2011, 79(12): 4819 – 4827.
35. Havensteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics. 2002, 96: 67 – 202.
36. Pietta P, Mauri P. Analysis of Flavonoids in Medicinal Plants. In: Abelson, J.N., Simon, M.I. (Ed.). Methods in Enzymology. California, P., California Institute of Technology. 2001 : 26 – 45.