

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**

**YASMIN SILVA RIZK**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E BIFLAVONOIDES  
ISOLADOS DE *SELAGINELLA SELLOWII* SOBRE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)  
AMAZONENSIS***

**CAMPO GRANDE**

**2014**

**YASMIN SILVA RIZK**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E BIFLAVONOIDES  
ISOLADOS DE *SELAGINELLA SELLOWII* SOBRE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)  
AMAZONENSIS***

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda.

**CAMPO GRANDE**

**2014**

**YASMIN SILVA RIZK**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E BIFLAVONOIDES  
ISOLADOS DE *SELGINELLA SELLOWII* SOBRE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)  
AMAZONENSIS***

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

---

Dra. Kátia da Silva Calabrese  
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

---

Dr. Carlos Alexandre Carollo  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

*Aos meus pais, pela dedicação e incentivo aos estudos.*

*Às minhas irmãs e Giovanna, pela amizade e companheirismo.*

*A vocês, dedico meu esforço e sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois a fé Nele me sustentou e revigorou e, mesmo nos momentos de dificuldades e até incredulidade, sua força me fez agradecer, aceitar e persistir.

Aos meus pais, Fayez e Claudia, pelo amor e dedicação que me confiam. A paz, apoio e carinho que recebo de vocês me sustentam e encorajam. Exemplos de determinação, resignação e, principalmente, amor. Cada conquista minha devo a vocês. Com muito amor, muito obrigada.

Às minhas irmãs, Mariana e Alomah, minhas companheiras de jornada, minhas amigas. Vocês são a alegria de uma amizade sincera e duradoura e a segurança de um abraço acolhedor. E à Giovanna que, com sua chegada, cheia de vitalidade e pureza, com certeza fez parte do meu amadurecimento como pessoa.

À Carla que, hoje, posso dizer é muito mais que minha orientadora, é uma amiga que tive a benção de encontrar. Seus cuidados foram além dos exigidos pela extenuante jornada científica. Sua dedicação, carinho e alegria tornaram, com certeza, mais leve a caminhada.

Ao professor Carlos Carollo, por incentivar desde o início a continuidade do trabalho na pós-graduação, confiando um projeto tão importante em minhas mãos. Obrigada pela dedicação e orientação.

À professora Maria de Fatima, minha primeira referência no mundo da cultura celular e da pesquisa. Não conseguimos trabalhar diretamente juntas de início, mas que, sua personalidade querida e sempre disposta a ajudar, nos uniu neste novo projeto. Obrigada pelos seus conselhos e amizade.

À professora Mônica Kadri, por suas contribuições na elaboração e execução do projeto, pois foram essenciais para o êxito deste trabalho.

Ao Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, minha segunda família. Monitoria, Iniciação Científica, Monografia, Mestrado, ufa! Passamos momentos que não esquecerei jamais. Quantas palavras amigas escutei nos momentos de desespero e desânimo. Quantas risadas levarei comigo com saudade. Aliás, risadas não faltaram e, por isso, fizeram dos meus dias na Universidade mais leves e alegres. Agradeço a Deus a oportunidade de tê-los em meu caminho. Muito obrigada! Sentirei saudades.

Às minhas queridas companheiras de laboratório, minhas amigas Lauriane, Eduarda e Vanessa. Muito obrigada pela ajuda de vocês, na parceria dos experimentos, na ajuda quando o tempo era nosso vilão, nas palavras amigas e risadas que compartilhamos. Vocês fazem parte disso.

Ao Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que me recebeu para a realização de parte do projeto e em especial à Alice, que desde a Iniciação Científica sempre esteve disposta a me ajudar e ensinar, com dedicação e paciência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FCFRP/USP pelo auxílio nas análises de espectrofotometria de massas.

Aos amigos, que persistiram e me apoiaram nesta trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pela oportunidade de concluir esta etapa na minha vida profissional.

*“(...) Resguarda-te em Deus e persevera no trabalho  
que Deus te confiou.  
Ama sempre, fazendo pelos outros  
o melhor que possas realizar.  
Age auxiliando. Serve sem apego.  
E assim vencerás.”*

*(Emmanuel por Francisco Cândido Xavier)*

## RESUMO

Este trabalho demonstra a atividade antileishmania do extrato hidroetanólico de *Selaginella sellowii* (SSHE) e dos biflavonoides amentoflavona e robustaflavona, isolados pela primeira vez nesta espécie. A atividade foi avaliada sobre formas amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, espécie de grande relevância em saúde pública associada à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). SSHE mostrou alta atividade sobre amastigotas intracelulares ( $CI_{50} = 20,18 \mu\text{g/mL}$ ). O fracionamento do extrato levou ao isolamento de dois biflavonoides com maior atividade. Amentoflavona foi cerca de 170 vezes mais ativa ( $CI_{50} = 0,12 \mu\text{g/mL}$ ) e menos citotóxica ( $CI_{50} = 2,16$  e  $2,97 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, sobre células NIH/3T3 e J774.A1) do que SSHE, com alto índice de seletividade (IS, 18 e 24,75). Robustaflavona também foi ativa ( $CI_{50} = 2,84 \mu\text{g/mL}$ ), porém mais citotóxica, com  $CI_{50} = 25,52 \mu\text{g/mL}$  (IS = 9) sobre células NIH/3T3 e  $CI_{50} = 3,06$  (IS = 1,08) sobre células J774.A1. A produção de óxido nítrico (NO) foi menor nas células tratadas com amentoflavona, sugerindo que a ação leishmanicida pode não se dar por este mecanismo. Em contrapartida, a liberação de NO foi maior após tratamento com robustaflavona. Foi demonstrado que *S. sellowii* apresenta potencial como fonte de biflavonoides, que constituem compostos promissores para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das leishmanioses, em especial a LTA.

**Palavras-chave:** leishmaniose cutânea; amentoflavona; robustaflavona; atividade antileishmania.

## ABSTRACT

This study demonstrates the antileishmanial activity of the hydroethanolic extract from *Selaginella sellowii* (SSHE), as well as of the biflavonoids amentoflavone and robustaflavone, isolated for the first time in this species. These substances' effects were evaluated on intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, a species of great relevance in American cutaneous leishmaniasis (ACL). SSHE presented high activity against intracellular amastigotes (IC<sub>50</sub> value of 20.18 µg/mL). Extract fractionation led to isolation of two bioflavonoids with the highest activity, as follows: amentoflavone was about 170 times more active (IC<sub>50</sub> value of 0.12 µg/mL) and less cytotoxic than SSHE (IC<sub>50</sub> value of 2.16 and 2.97 µg/mL, respectively on NIH/3T3 and J774.A1 cells), with high selectivity index (18 and 24.75); robustaflavone was also active against *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> value of 2.84 µg/mL), but more cytotoxic, with IC<sub>50</sub> = 25.52 µg/mL (SI = 9) on NIH/3T3 cells and IC<sub>50</sub> = 3.06 µg/mL (SI = 1.08) on J774.A1 cells. The production of nitric oxide was lower in cells treated by amentoflavone (suggesting that NO should not be the leishmanicide mechanism in this case), while NO release was higher after treatment with robustaflavone. We demonstrate *S. sellowii* as a potential source of biflavonoids that could provide promising compounds for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** cutaneous leishmaniasis; amentoflavone; robustaflavone; antileishmanial activity.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Leishmanioses .....</b>	<b>12</b>
1.1.1. Epidemiologia .....	12
1.1.2. Agente Etiológico.....	14
1.1.3. Manifestações Clínicas.....	15
1.1.4. Tratamento .....	16
<b>1.2. Produtos naturais.....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Gênero <i>Selaginella</i> .....	20
1.2.2. Extração Acelerada por Solvente .....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>3. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
<b>4. MANUSCRITO EM LÍNGUA PORTUGUESA.....</b>	<b>33</b>
RESUMO.....	33
INTRODUÇÃO .....	34
MATERIAL E MÉTODOS .....	36
<i>Material vegetal</i> .....	36
<i>Extração e isolamento</i> .....	36
<i>Elucidação estrutural</i> .....	37
<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i> .....	38
<i>Parasitas</i> .....	38
<i>Animais</i> .....	39
<i>Atividade antileishmania</i> .....	39
<i>Produção de óxido nítrico (NO)</i> .....	40
<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	40
<i>Análise Estatística</i> .....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
AGRADECIMENTOS .....	48
REFERÊNCIAS.....	48
<b>5. MANUSCRITO EM LÍNGUA INGLESA.....</b>	<b>53</b>
ABSTRACT .....	53
INTRODUCTION.....	54

MATERIALS AND METHODS.....	56
<i>Plant material</i> .....	56
<i>Plant extraction and isolation</i> .....	56
<i>Structural elucidation</i> .....	57
<i>Liquid chromatography</i> .....	58
<i>Parasites</i> .....	58
<i>Animals</i> .....	58
<i>Antileishmanial activity</i> .....	59
<i>Nitric oxide (NO) evaluation</i> .....	60
<i>Cytotoxicity assay</i> .....	60
<i>Statistical analysis</i> .....	61
RESULTS AND DISCUSSION .....	61
ACKNOWLEDGEMENTS.....	68
REFERENCES.....	68
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	<b>73</b>

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. De caráter zoonótico, acometem o homem e seus animais domésticos de maneira secundária (BASANO; CAMARGO, 2004). Por apresentarem características clínicas e epidemiológicas diversas, são distribuídas em duas entidades nosológicas principais: as formas visceral e cutânea.

A falta de investimentos no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica e a precariedade no acesso ao diagnóstico e tratamento da doença tornam a leishmaniose uma das doenças mais negligenciadas no mundo (YAMEY, 2002), tendo fortes e complexas ligações com a pobreza (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Além disso, o amplo espectro clínico observado nos pacientes indica a complexidade da doença, com diversas espécies causadoras, muitos reservatórios e espécies vetoras (REITHINGER et al., 2007).

#### 1.1.1. Epidemiologia

As leishmanioses estão presentes em 98 países e três territórios em cinco continentes. Cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas e 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença. Estima-se que ocorram 1,3 milhões de novos casos anualmente, dos quais 300.000 são de leishmaniose visceral e um milhão da forma cutânea da doença. Predominante em regiões tropicais e subtropicais do globo, 90% dos casos de Leishmaniose Cutânea (LC) ocorrem em poucos países: Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Irã e Síria (Velho Mundo) e Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (Novo Mundo) sendo a forma cutâneo-mucosa mais restrita ainda, com a maioria dos casos no Brasil, Peru e Bolívia. Já em relação à leishmaniose visceral (LV), 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2010, 2013).

No Brasil, as leishmanioses apresentam alta incidência e ampla distribuição geográfica, estando presentes em todas as unidades federadas, sendo os maiores índices encontrados na Região Norte, seguido das regiões Centro-Oeste e Nordeste (BRASIL,

2010). Segundo dados do Sistema Nacional de Agravos de Notificação, no ano de 2012 foram registrados no país 25.647 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e no estado de Mato Grosso do Sul, 166 casos. No mesmo ano, a LV atingiu 3.392 notificações, sendo 220 delas no estado citado. Em Mato Grosso do Sul, a LTA mostra-se em expansão, apresentando, no ano de 2012, casos autóctones em 26 dos 79 municípios do estado (BRASIL, 2014).

As taxas de mortalidade e letalidade da LV são altas e amplamente distribuídas nos estados brasileiros, constituindo um grave problema de saúde pública (MARTINS-MELO et al., 2014). A LTA, apesar de sua menor letalidade, também constitui um sério problema, pois além de ter alta incidência e ampla distribuição, pode causar lesões destrutivas, desfigurantes e algumas vezes incapacitantes, que repercutem no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO; CARVALHO, 2003), além de influenciar a economia do país, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2010).

Conhecidos no Brasil popularmente pelos nomes mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros, os vetores das leishmanioses são insetos flebotomíneos pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae (BRASIL, 2010). De pequeno tamanho, 1 a 3 mm, possuem o corpo revestido por pelos e coloração acastanhada ou cor de palha. São facilmente reconhecidos pelo seu voo característico de pequenos saltos e pouso com asas entreabertas (BRASIL, 2006).

Diferentes de outras espécies transmissoras associadas a doenças tropicais, como *Culex* e *Anopheles*, os flebotomíneos, em sua fase larvária, desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica, sendo as fêmeas adultas hematófagas obrigatórias, realizando repasto sanguíneo em diversos animais vertebrados (BRAZIL; BRAZIL, 2003). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei* (BRASIL, 2010).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana, e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil, foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As principais espécies são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sendo descritas mais recentemente as espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Viannia)*

*shawi*. A espécie causadora da forma visceral é *Leishmania (Leishmania) infantum* (BRASIL, 2010; LAINSON, 2010).

### 1.1.2. Agente Etiológico

As leishmanioses são causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Parasitas digenéticos, assumem a forma amastigota nos hospedeiros vertebrados e promastigotas no hospedeiro invertebrado. As amastigotas são arredondadas e imóveis e se multiplicam obrigatoriamente nas vesículas fagolisossômicas dos macrófagos do hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas são fusiformes, flageladas e vivem no tubo digestivo do inseto vetor. A infecção é transmitida entre os hospedeiros vertebrados pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas.

As fêmeas destes insetos adquirem os parasitos de *Leishmania* quando se alimentam do sangue de um hospedeiro mamífero infectado durante o repasto sanguíneo (BATES, 2007). No intestino médio dos insetos, as amastigotas ingeridas transformam-se em formas flageladas, de movimento fraco, denominadas promastigotas. Este primeiro estágio no vetor dá origem às formas promastigotas procíclicas, formas que se multiplicam no interior do intestino do vetor. Dois a três dias após o repasto, as formas procíclicas tornam-se mais alongadas e rápidas, chamadas de nectomonas, responsáveis pela migração da infecção para o intestino anterior do inseto. Em seguida, as formas promastigotas leptomonas realizam uma nova expansão da população de parasitas no intestino anterior. A última diferenciação ocorre cerca de cinco dias do início da infecção e dá origem às formas metacíclicas no intestino anterior, posição estratégica que permite a transmissão para o hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo do flebotomíneo (BATES; ROGERS, 2004).

Uma vez dentro do hospedeiro, a forma promastigota metacíclica protege-se da lise do complemento, impedindo a ativação do complexo de ataque à membrana (C5b-C9), inativando fatores do complemento, através de fosforilações por enzimas do protozoário e conversão de C3 em C3bi, uma potente opsonina que se liga ao receptor de complemento na membrana do macrófago. A formação desta opsonina é catalisada pela metaloproteinase de superfície gp63 (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998), abundante nestas formas, mas não em promastigotas procíclicas e amastigotas (HANDMAN;

BULLEN, 2002). Além de C3bi, outras moléculas também ajudam as promastigotas a ligarem-se na célula, como a proteína C reativa (PCR) e fibronectinas de membrana. De forma mais direta, gp63 e LPG (lipofosfoglicano) ligam-se a receptores de complemento CR3 e receptores de manose-fucose do macrófago (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998).

Através de fagocitose, estas formas adentram a célula do hospedeiro, ocorrendo a fusão do fagossomo com os lisossomos celulares, originando o fagolisossomo. Uma vez dentro do macrófago, as promastigotas sofrem mudanças bioquímicas e metabólicas resultando na forma intracelular obrigatória amastigota (HANDMAN; BULLEN, 2002). Após a ativação dos macrófagos, inicia-se a produção de enzimas de degradação fagolisossômicas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico ( $\bullet$ NO), gerando um efeito tóxico direto e acidificação do ambiente (ASSCHE et al., 2011).

Vários mecanismos inibem a atividade citotóxica do macrófago, como vias de sinalização intracelular e inibição e ativação de citocinas, que permitem ao protozoário *Leishmania* multiplicar-se no interior do vacúolo fagocítico (STAFFORD; NEUMANN; BELOSEVIC, 2002).

### 1.1.3. Manifestações Clínicas

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo ocorrer o desenvolvimento de lesões ulcerativas na pele no local da picada do flebotomíneo (Leishmaniose cutânea localizada [LCL]); múltiplos nódulos não-ulcerativos (Leishmaniose cutânea difusa [LCD]); inflamação destrutiva da mucosa (Leishmaniose mucosa [LM]) e infecção disseminada visceral (Leishmaniose visceral [LV]) (REITHINGER et al., 2007).

A forma visceral varia de manifestações clínicas discretas a moderadas e graves, que se não tratadas podem levar o paciente à morte (BRASIL, 2006). Os sinais e sintomas são febre, fraqueza, perda de apetite e de peso. A infecção de células do sistema fagocítico mononuclear gera aumento dos linfonodos, fígado e baço, podendo ocorrer anemia e sangramentos (CHAPPUIS et al., 2007).

A LTA é a forma cutânea da doença no Novo Mundo, com manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas localizadas a formas mucosas, incluindo as formas disseminada e difusa. A lesão característica da forma cutânea é normalmente única e desenvolve-se no local da picada do vetor, tem o formato arredondado, ulcerada com

bordas elevadas e fundo granuloso. Indolor, pode causar dor quando associada a infecções bacterianas (BRASIL, 2010). Acompanhada de resposta celular adequada, tende à cura espontânea (GRIMALDI; TESH, 1993).

A forma cutânea disseminada é uma expressão relativamente rara da LT (BRASIL, 2010) e seu desenvolvimento envolve uma complexa interação entre parasita, resposta imunológica do hospedeiro e ambiente (ROSA; MACHADO, 2011). Clinicamente apresenta múltiplas lesões acneiformes, podendo ser acompanhadas de lesões papulares e ulceradas, distribuídas em duas ou mais partes do corpo (CARVALHO et al., 1994; ROSA; MACHADO, 2011). O aparecimento de manifestações sistêmicas, como febre e mal-estar, sugere disseminação do parasito via corrente sanguínea (TURETZ, 2002), e o acometimento mucoso pode ser concomitante (BRASIL, 2010). A resposta celular dos pacientes pode estar comprometida ou não, porém, os níveis séricos de anticorpos são mais elevados que na forma localizada (CARVALHO et al., 1994).

Entre as formas menos comuns de LTA está a forma cutânea-difusa, que no Brasil é causada pela espécie *L. amazonensis* (BRASIL, 2010). Esta forma é progressiva, não-ulcerativa, caracterizada por nódulos ricos em parasitos e, em geral, sem envolvimento mucoso (GRIMALDI; TESH, 1993). Ocorre ausência ou redução da resposta imunológica celular do hospedeiro (BRASIL, 2010) e geralmente há má resposta ao tratamento (REITHINGER et al., 2007).

Em contrapartida, há a forma mucosa, onde o paciente responde de forma acentuada aos parasitos, causando lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores. No Brasil, o agente etiológico desta forma clínica é a espécie *L. braziliensis*, mas há na literatura casos atribuídos a *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (BRASIL, 2010). O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade ou anos após a cura clínica (GONTIJO; CARVALHO, 2003). As lesões são altamente destrutivas e desfigurantes, além de potencialmente fatais (STRAZZULLA et al., 2013).

#### 1.1.4. Tratamento

As drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, que incluem o antimoniato N-metilglucamina, de nome comercial Glucantime<sup>®</sup> (Aventis) e o estibogluconato de sódio, o Pentostam<sup>®</sup> (GlaxoSmithKleine), não comercializado no Brasil. Antimoniais são empregados há muitos séculos no tratamento de diversas doenças, mas seu uso nas leishmanioses deu-se com a

observação de Gaspar Vianna, em 1912, que utilizou com êxito tártaro emético em pacientes com LTA (D'UTRA; SILVA, 1915; REZENDE, 2009). No entanto, devido aos efeitos tóxicos e graves efeitos indesejáveis, o tártaro emético foi sendo substituído por outros compostos até que, em 1945, foi introduzido o antimonial de N-metilglucamina, um antimonial pentavalente (CROFT; COOMBS, 2003; RATH, 2003).

No entanto, mesmo após anos de uso, ainda não se conhece o mecanismo de ação desse composto. Não é claro se a forma ativa final é a forma pentavalente [Sb(IV)] ou a trivalente [Sb(III)] e três mecanismos são propostos atualmente (HALDAR; SEN; ROY, 2011): modelo de pró-droga, atividade intrínseca da forma pentavalente e atuação do sistema imune. O primeiro sugere que o Sb(IV) sofre redução biológica para uma forma mais tóxica, o Sb(III), com poder leishmanicida. Esta conversão é estágio específica e ocorre apenas em amastigotas e não em promastigotas de *Leishmania* (EPHROS et al., 1998). Macrófagos também realizam esta conversão, sugerindo que o parasito e a célula hospedeira atuem juntos para o aumento da concentração de Sb(III) ativo. O segundo modelo propõe que o próprio Sb(IV) tem ação sobre as formas amastigotas de *Leishmania* e por último, o antimonial seria responsável por ativar a resposta imune inata e específica do hospedeiro, contribuindo para a melhora da infecção e proteção contra recaídas (HALDAR; SEN; ROY, 2011). De fato, Basu e colaboradores (2006) demonstraram que o antimonial sozinho pode induzir tanto ROS e NO, em macrófagos murinos, promovendo a morte de amastigotas de *Leishmania donovani*.

A dose recomendada de antimonial no Brasil, tanto para a forma visceral quanto para a tegumentar da doença variam de 10 a 20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia, por um período de 20 dias seguidos, chegando a 30 dias para o tratamento da forma mucosa (BRASIL, 2006; 2010). Por ser pouco absorvido no trato digestivo, a administração é realizada pela via parenteral (intramuscular ou endovenosa), sendo a escolha determinada pelas condições do paciente, sem interferência da eficácia e segurança da droga (BRASIL, 2010). Na LTA, a administração pode ser por via intralesional, que se torna viável em lesões únicas, além de favorecer a redução dos efeitos adversos (Soto et al., 2013). Oliveira-Neto et al. (1997) encontraram alto índice de cura (80%) em pacientes com LTA, ressaltando não só a diminuição dos efeitos adversos como do custo do tratamento, com grande importância na acessibilidade em áreas rurais.

A absorção é rápida, no entanto, mais de 80% da droga é excretada em sua forma inalterada pelos rins nas primeiras 24h (REES et al., 1980). Por isso, faz-se necessária a

administração de doses elevadas continuamente, garantindo adequado teor de antimônio nos tecidos e consequente eficácia no tratamento (RATH et al., 2003).

Os antimoniais apresentam importante limitação no uso por conta dos seus frequentes efeitos adversos como dores musculoesqueléticas, anorexia, náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, febre, reações alérgicas, entre outros (OLIVEIRA et al., 2011). Além do mais, estas drogas podem gerar alterações cardíacas, pancreáticas e renais, muitas vezes fatais. Com isso, o uso em pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas, deve ser acompanhado de rigorosa avaliação antes e durante o tratamento, considerando-se então a suspensão dos antimoniais e/ou utilização de drogas de segunda escolha (BRASIL, 2010). Mulheres no período da amamentação podem utilizar o antimonial, pois sua eliminação no leite é muito pequena (BRASIL, 2010), mas seu uso na gravidez é desaconselhado já que é demonstrado através de estudos *in vivo* acúmulo de antimônio no feto com riscos teratogênicos (PAUMGARTTEN; CHAHOUD, 2001; MIRANDA et al., 2006)

O tratamento quimioterápico das leishmanioses é complicado e tem variação de eficácia como resultado da variação da sensibilidade intrínseca das diversas espécies de *Leishmania*, resistência adquirida e ausência da resposta imune do hospedeiro (CROFT; COOMBS, 2003). Thakur (1998) mostrou a diminuição de eficácia e aumento da toxicidade dos antimoniais pentavalentes em pacientes com leishmaniose visceral em Bihar, Índia, quando comparados às últimas décadas. Na mesma região, Sundar (2000) encontrou mais de 65% de falha no tratamento da doença com estas drogas e alerta para um possível aumento da resistência em outras regiões endêmicas da doença. Além do mais, a ausência da resposta de células T tem grande impacto no tratamento da forma cutânea difusa em pacientes com coinfeção HIV/LV (ALVAR et al., 1997).

Anfotericina B tem sido usada como droga de segunda escolha no tratamento das leishmanioses desde a década de 1960 (HALDAR; SEN; ROY, 2011) e apresenta excelente atividade contra *Leishmania* spp. É a droga de primeira escolha em gestantes (BRASIL, 2006, 2010; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2004). Porém, a quimioterapia com este antibiótico é limitada por seus efeitos adversos e toxicidade dose-dependente, além de seu uso exclusivo por infusão parenteral lenta (CROFT; COOMBS, 2003; MONZOTE, 2009). Estes efeitos foram reduzidos com o desenvolvimento das formulações lipídicas (anfotericina B lipossomal e anfotericina B coloidal), mas o custo ainda elevado impossibilita seu uso na rotina do serviço de saúde. Sua utilização fica reservada para

pacientes graves de leishmaniose visceral que desenvolveram quadros de toxicidade renal ou cardíaca (BRASIL, 2006).

No Brasil pode-se ainda utilizar pentamidina como segunda escolha nas formas cutânea e visceral da leishmaniose (BRASIL, 2006, 2010). Inicialmente sintetizadas como hipoglicemiante, o uso antileishmania tem sido utilizado desde 1939 (BALAÑA-FOUCE et al., 1998). Além do uso parenteral e diversos efeitos colaterais, a pentamidina tem importantes fatores limitantes como menor eficácia e toxicidade, podendo causar diabetes *mellitus* insulina-dependente de forma irreversível (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006).

Outras drogas estão sendo testadas e utilizadas com êxito principalmente em regiões onde a resistência ao parasito já está presente. Miltefosina é a primeira droga administrada via oral no tratamento da LV com boa eficácia, mas apresenta potencial para teratogenicidade e resistência (HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Atualmente, os medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são muitas vezes inacessíveis aos países com maior número de casos, pois são relativamente caros. Além disso, os medicamentos são produzidos por poucos fabricantes, geralmente de forma exclusiva, gerando problemas de abastecimento e alto custo (WHO, 2014). A elevada toxicidade aliada ao uso parenteral exclusivo, necessitando muitas vezes de internação, representa um sério obstáculo ao tratamento adequado dos casos de LTA (BASANO; CAMARGO, 2004). A pesquisa de compostos isolados de fontes naturais pode oferecer uma solução mais disponível e eficiente no tratamento das leishmanioses (MONZOTE, 2009).

## **1.2. Produtos naturais**

Uma característica importante dos produtos naturais na descoberta de novas drogas é a grande diversidade estrutural ainda não desbravada. No entanto, este potencial é ainda muito pouco explorado, já que apenas 5-15% das plantas terrestres tiveram sua diversidade química estudada e caracterizada. Assim, os produtos naturais constituem uma excelente fonte de novos compostos biologicamente ativos, que podem ser utilizados diretamente ou com modificações estruturais que visam o melhoramento de suas atividades e/ou redução da toxicidade (BRAHMACHARI, 2012).

De fato, mais da metade das novas drogas baseadas em produtos naturais que se encontravam em fase de desenvolvimento no ano de 2008 eram originárias de plantas, a

maioria estudada como agentes anticâncer e anti-infecciosos (HARVEY, 2008), confirmando a soberania desta fonte na busca de novos agentes terapêuticos.

Atualmente, poucas são as drogas existentes para o tratamento de doenças parasitárias. Alcaloides, terpenos e flavonoides são exemplos de classes de compostos naturais que tem apresentado atividade contra protozoários causadores de doenças tropicais, tais como leishmanioses, malária e tripanossomíase americana (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003). Considerando as dificuldades no tratamento atual das leishmanioses, o desenvolvimento e introdução de novos compostos leishmanicidas menos tóxicos e de fácil acesso é sem dúvida desejável. Ao encontro disso, produtos derivados de plantas tem ganhado espaço nos meios de pesquisa por serem de fácil acesso e relativamente baratos (SEN; CHATTERJEE, 2011).

Contudo, produtos naturais contêm uma mistura variável e complexa de substâncias, aumentando o risco de ocorrência de efeitos colaterais, que pode ser minimizado com o isolamento do composto responsável pelo efeito desejado (SNEADER, 2005).

### 1.2.1. Gênero *Selaginella*

*Selaginella* (Selaginellaceae, ordem Selaginellales, classe Lycopsidea) é um gênero de plantas vasculares sem sementes, único sobrevivente dentro de sua família. A família Selaginellaceae, junto com outras do filo Lycophyta, compreendem as mais antigas plantas vasculares do planeta (BANKS, 2009). Hoje, há apenas três famílias existentes de lycophytas: Lycopodiaceae, Isoeteaceae e Selaginellaceae. Membros pertencentes às duas primeiras famílias produzem apenas um tipo de esporo (homosporadas) e os pertencentes à *Selaginellaceae* são heterosporados, ou seja, produzem megásporos e micrósporos. Esta inovação na reprodução é considerada importante na evolução das plantas terrestres no planeta (BATEMAN; DiMICHELE, 1994).

Por ter sido um gênero que resistiu à extinção nos períodos Triássico e Permiano, *Selaginella* tem sido objeto de estudo de botânicos e paleontologistas para elucidação dos mecanismos envolvidos na adaptação das plantas terrestres (WENG; NOEL, 2013). Com este objetivo, Banks e colaboradores (2011) sequenciaram pela primeira vez o genoma de uma planta vascular sem sementes utilizando a espécie *S. moellendorffii*. Foram constatados vários genes associados à síntese de diversos metabólitos secundários,

sugerindo que *Selaginella* não só produz um vasto repertório de metabólitos, como também divide com as angiospermas certo grau de complexidade.

Metabólitos secundários são biossintetizados pelas plantas em resposta a estímulos ambientais ou como consequência do crescimento e desenvolvimento, sendo uma estratégia adaptativa ao ambiente. A quimiodiversidade destes metabólitos espelha a enorme capacidade de adaptação das plantas terrestres com o passar do tempo. (WENG; PHILIPPE; NOEL, 2012).

Muitas espécies de *Selaginella* são de uso popular em diversos países. Na medicina tradicional chinesa, diversas espécies de *Selaginella* são utilizadas no tratamento de hiperglicemia, hemorragias, hepatites virais e doenças virais (CHEN; DUH; CHEN, 2005; ZHENG et al., 2011). *S. bryopteris*, conhecida como 'Sanjeevani', é utilizada há séculos para tratar irregularidades menstruais, queimação no ato de urinar e icterícia na Índia, particularmente em áreas tribais (SAH et al., 2005).

Nas Américas, o uso deste gênero também é relatado. Comunidades indígenas no Panamá utilizam *S. convoluta* para tratar febre, fraqueza e infecções oculares. Na Colômbia, *S. articulata* é usada contra picadas de cobra (OTERO et al., 2000) e no Peru, um grupo de ameríndios chamado Yanasha também utiliza o gênero contra febre, além do tratamento de astenia e hemorragias femininas (BOURDY; VALADEAU; CASTILLO, 2008; CÉLINE et al., 2009).

No Nordeste brasileiro, a espécie *S. convoluta* é utilizada popularmente como afrodisíaco, diurético, tratamento de amenorreia, tosse e aumento da fertilidade feminina (AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007). Santos e colaboradores (2012) destacam o uso popular de *S. conduplicata*, de nome popular samambainha, contra doenças culturais conhecidas como espante, derrame e vento-caído em comunidades ribeirinhas no estado do Amazonas.

Na literatura são descritas várias classes de compostos isolados no gênero *Selaginella*, sendo os mais abundantes os flavonoides, alcaloides e fenilpropanoides (ALMEIDA et al., 2013). Diversos flavonoides já foram identificados (SUN et al., 1997; CHEN; DUH; CHEN, 2005; LIU et al., 2009; TAN et al., 2009; CAO et al., 2010a; CAO et al., 2010b; WEI-SHENG et al., 2011; WU; WANG, 2011; XU et al., 2011; ZHANG et al., 2011; WANG et al., 2011). Muitos destes apresentaram diversos efeitos biológicos, entre eles atividade antifúngica (CAO et al., 2010<sup>a</sup>; JUNG et al., 2006), antiviral (MA et al., 2001; CAO et al., 2010b), antioxidante (CHEN et al., 2005), anticâncer e anti-inflamatória (LEE et al., 1999; MISHRA et al., 2011), antinociceptiva (DE SÁ et al., 2012) e antidiabética

(ZHENG, 2011<sup>a</sup>). Além disso, Kunert et al. (2008) observaram atividade antileishmania nos biflavonoides presentes na espécie *S. bryopteris*.

O gênero *Selaginella* apresenta cerca de 750 espécies, tem distribuição cosmopolita com predomínio em áreas tropicais (KRAMER; GREEN, 1990). No continente americano, a espécie *S. sellowii* (Figura 1) distribui-se do México ao Uruguai, incluindo o Brasil, onde está presente em estados das regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste (ASSIS; LABIAK et al., 2009). No estado de Mato Grosso do Sul, a espécie ocorre de forma abundante na região do Chaco, borda oeste do Pantanal brasileiro, e distingue-se das outras espécies descritas na região por apresentar microfilos monomorfos, arranjados espiraladamente ao redor do caule (ASSIS; LABIAK et al., 2009; POTT et al., 2010). A espécie ainda não apresenta seus constituintes revelados e atividades biológicas testadas, constituindo, portanto, um importante objeto de pesquisas na busca de drogas com potencial antileishmania.

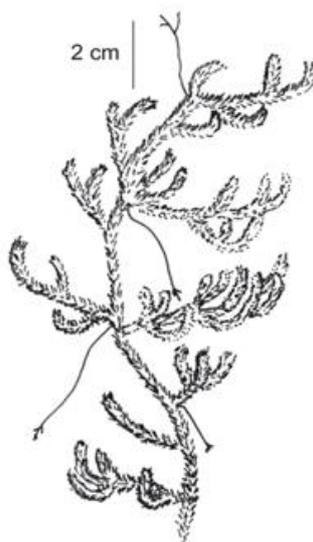


Figura 1. Esquema do ramo da planta *Selaginella sellowii*. Adaptado de: Assis e Labiak (2009)

### 1.2.2. Extração Acelerada por Solvente

A primeira etapa a ser considerada em uma análise qualitativa e quantitativa de uma planta medicinal é a extração, método que separará os compostos a serem analisados da matriz celular. Métodos tradicionais de extração apresentam desvantagens como longo tempo de extração, grande manuseio da amostra e reprodutibilidade

insatisfatória (BENTHIN; DANZ; HAMBURGER, 1999), além do consumo de grandes quantidades de solvente gerando riscos ambientais e ocupacionais (PAWLISZYN, 2003).

Várias técnicas de extração surgiram na tentativa de sobrepor as limitações dos métodos convencionais (RAMOS; KRISTENSON; BRINKMAN, 2002). A extração acelerada por solvente (do inglês “Accelerated Solvent Extraction – ASE”) é um método que combina elevadas temperaturas e pressão com solventes líquidos (RICHTER et al., 1996), técnica também conhecida como extração por líquido pressurizado.

O aumento da temperatura aumenta as taxas de difusão e solubilidade do analito, diminuindo a viscosidade e tensão de superfície dos solventes, melhorando o contato destes com o composto alvo (RICHTER et al., 1996; RAMOS; KRISTENSON; BRINKMAN, 2002). O uso da temperatura elevada, e suas vantagens, não seria permitido sem o aumento da pressão. A pressão adequada mantém os solventes líquidos em temperaturas acima do ponto de ebulição. Além disso, o uso da pressão força o solvente a penetrar melhor nos poros da matriz (RICHTER et al., 1996).

Essas vantagens tornam a extração mais rápida e com menor consumo de solventes quando comparada aos métodos clássicos. Benthin, Danz e Hamburger (1999) compararam métodos de extração descritos na farmacopeia de algumas plantas medicinais com a extração acelerada por solvente e demonstraram que houve menor consumo de solventes, rendimento melhor ou superior aos métodos clássicos e redução do tempo de extração, principalmente em plantas que necessitavam de extração com solventes de polaridade crescente.

Devido ao grande interesse na extração de compostos bioativos de origem natural, torna-se importante o uso de métodos que reúnam a otimização do processo extrativo com a conscientização ambiental. O objetivo da tecnologia “verde” é desenvolver e encorajar a implementação de procedimentos que reduzam ou eliminem o uso e produção de substâncias perigosas, visando limitar a influência negativa do homem nos recursos naturais, preservando assim o meio ambiente. A extração por líquido pressurizado torna-se então uma tecnologia promissora para cumprir esta demanda (MUSTAFA; TURNER, 2011).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antileishmania do extrato hidroetanólico e compostos isolados de *Selaginella sellowii* sobre *Leishmania amazonensis*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* do extrato hidroetanólico obtido de *S. sellowii* sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;
- isolar biflavonoides do extrato hidroetanólico de *S. sellowii*;
- avaliar a atividade antileishmania dos compostos isolados;
- avaliar a citotoxicidade do extrato hidroetanólico e biflavonoides isolados sobre células de mamíferos;
- avaliar a liberação de óxido nítrico de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e tratados *in vitro* com diferentes concentrações do extrato e dos biflavonoides isolados, a fim de investigar seu envolvimento no mecanismo de ação leishmanicida.

### 3. REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383–95, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P. DE; MEDEIROS, P. M. DE; ALMEIDA, A. L. S. DE; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. DE F. L.; MELO, J.G. DE; SANTOS, J. P. DOS. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–54, 2007.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 298–319, 1997.

ALVAR J., YACTAYO S., BERN C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-57, 2006.

ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 337–51, 2011.

ASSIS, E. L. M.; LABIAK, P. H. Lycophyta da borda oeste do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 3, p. 703-12, 2009.

BENTHIN, B.; DANZ, H.; HAMBURGER M. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, v. 837, p. 211–19, 1999.

BRAHMACHARI G. Natural products in drug discovery: Impacts and opportunities - An assessment. In: Brahmachari, G. **Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**. 1. ed. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2011, cap.1, p.1-199.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–43, 1998.

BANKS, J. A. *Selaginella* and 400 million years of separation. **Annual Review of Plant Biology**, v.60, p. 223–38, 2009.

BANKS, J. A. The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. **Science**, v. 332, p. 960-63, 2011.

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

BASU, J. M.; MOOKERJEE, A.; SEN, P.; BHAUMIK, S.; SEN, P.; BANERJEE, S.; NASKAR, K.; CHOUDHURI, S. K.; SAHA, B.; RAHA, S.; ROY, S. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via Phosphoinositide 3-Kinase and Mitogen-Activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 1788–97, 2006.

BATEMAN, R. M.; DiMICHELE, W. A. Heterospory: the most iterative key innovation in the evolutionary history of the plant kingdom. **Biological Reviews**, v.69, p. 345-417, 1994.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v.4, p. 601-609, 2004.

BATES P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097–1106, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 13 jul. 2014.

BRAZIL, R. P; BRAZIL, B. G. Biologia de Flebotomíneos Neotropicais. In: RANGEL, E.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2003, p. 257-274.

BOGDAN, C.; RIILLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 121-34, 1998.

BOURDY, G.; VALADEAU, C.; CASTILLO, J. A. **Yato' ramuesh: plantas medicinales yaneshas**. 1 ed. Lima: Institut de Recherche pour le Développement, 2008.

CAO, Y.; CHEN, J.; TAN, N.; OBERER, L.; WAGNER, T.; WUD, Y.; et al. Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 2456–60, 2010a.

CAO, Y.; TAN, N. H.; CHEN, J. J.; ZENG, G. Z.; MAB, Y. B.; WU, Y. P.; YAN, H.; YANG, J.; LU, L. F.; WANG, Q. Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron. **Fitoterapia**, v. 81, p. 253–58, 2010b.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315-25, 1994.

CÉLINE, V.; ADRIANAC, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A–C.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L. F.; et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 413-22, 2009.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.

CHEN, K.; PLUMB, G. W.; BENNETT, R. N.; BAO, Y. Antioxidant activities of extracts from five anti-viral medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 201–5, 2005.

CHEN, J. J.; DUH, C. Y.; CHEN, J. F. New cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. **Planta Medica**, v. 71, p. 659-65, 2005.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-08, 2003.

DE SÁ, P. G. S.; NUNES, X. P.; LIMA, J. T.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; SIQUEIRA, J. S.; et al. Antinociceptive effect of ethanolic extract of *Selaginella convoluta* in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 187, 2012.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.

D'UTRA E SILVA, O. Sobre a Leishmaniose Tegumentar e seu tratamento. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.7, p. 213-48, 1915.

EPHROS, M.; BITNUN, A.; SHAKED, P.; WALDMAN, E.; ZILBERSTEIN, D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 278-82, 1999.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GRIMALDI JR., G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-50, 1993.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; DUARTE, G.; EL-BEITUNE, P.; QUINTANA, S. M.; MAIA, T. L. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 12, p. 31-40, 2004.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; S. ROY. Use of antimony in the treatment of Leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, p. 1-23, 2011.

HANDMAN, E.; BULLEN D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332-34, 2002.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

JUNG, H. J.; SUNG, W. S.; YEO, S-H.; KIM, H. S.; LEE, I-S.; WOO, E-R.; et al. Antifungal Effect of Amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 9, p. 746-51, 2006.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, p. S55–S62, 2003.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LEE, I-S.; NISHIKAWA, A.; FURUKAWA, F.; KASAHARA, K-I.; KIM, S-U. Effects of *Selaginella tamariscina* on *in vitro* tumor cell growth, p53 expression, G1 arrest and *in vivo* gastric cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 144, p. 93-9, 1999.

LIU, J. F.; XU, K. P.; JIANG, D. J.; LI, F. S.; SHEN, J.; ZHOU, Y. J.; et al. A new flavonoid from *Selaginella tamariscina*. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 595–7, 2009.

MA, S-C.; BUT, P. P-H.; OOI, V. E-C.; HE, Y-H.; LEE, S. H-S.; LEE, S-F.; LIN, R-C. Antiviral amentoflavone from *Selaginella sinensis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 311-12, 2001.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. DA S.; RAMOS JR., A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality and case fatality due to Visceral Leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **Plos One**, v. 9, 2014.

MIRANDA, E. S.; MIEKELEY, N.; DE-CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 292–300, 2006.

MISHRA, P. K.; RAGHURAM, G. V.; BHARGAVA, A.; AHIRWAR, A.; SAMARTH, R.; UPADHYAYA, R.; JAIN, S. K.; PATHAK, N. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the anticarcinogenic and cancer chemopreventive potential of a flavonoid-rich fraction from a traditional Indian herb *Selaginella bryopteris*. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 1154-68, 2011.

MONZOTE, L. Current treatment of Leishmaniasis: a review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, p. 9-19, 2009.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, p. 8-18, 2011.

OLIVEIRA, L. F. O.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. O.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, p. 87-96, 2011.

OLIVEIRA-NETO M. P.; SCHUBACH A.; MATTOS M.; DA COSTA S. C.; PIRMEZ C. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazilian area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. **International Journal of Dermatology**, v. 36, n. 6, p. 463-8, 1997.

OTERO, R.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; NÚÑEZ, V.; EVANS, N.; ALZATE, S. P.; GARCÍA, M. E.; SALDARRIAGA, M.; DEL VALLE, G.; OSORIO, R. G.; DÍAZ, A.; VALDERRAMA, R.; DUQUE, A.; VÉLEZ, H. N.. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 493–504, 2000.

PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2543-58, 2003.

POTT, A.; OLIVEIRA, A. K. M.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; SILVA, J. S. V. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 265-73, 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. de; MARZAL, P. C.; JUNIOR, H. F. A.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-5, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. D.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 581-96, 2007.

#### RENAL CLEARANCE OF PENTAVALENT ANTIMONY (SODIUM STIBOGLUCONATE)

REES, P. H.; KAGER, P. A.; KEATING, M. I.; HOCKMEYER, W. T. Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). **Lancet**, v. 2, p. 226-29, 1980.

REZENDE, J. M. Gaspar Vianna, mártir da ciência e benfeitor da humanidade. In: REZENDE, J. M. **À sombra do plátano: crônicas de história da medicina**. São Paulo: Editora Unifesp, 2009. p. 359-62.

RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 3-29, 2002.

RICHTER, B. E.; JONES, B. A.; EZZELL, J. L.; PORTER, N. L. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1033-39, 1996.

ROSA, M. E. A.; MACHADO, P. R. L. Disseminated Leishmaniasis: clinical, immunological, and therapeutic aspects. **Drug Development Research**, v. 72, p. 437-41, 2011.

SAH, N. K.; SINGH, S. N. P.; SAHDEV, S.; BANERJI, S.; JHA, V.; KHAN, Z.; et al. Indian herb 'Sanjeevani' (*Selaginella bryopteris*) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultra violet and oxidative stress. **Journal of Biosciences**, v. 30, p. 499–505, 2005.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056-69, 2011.

SNEADER, W. **Drug Discovery: a history**. 1 ed. Chichester: John Wiley and Sons, 2005.

SOTO, J.; ROJAS, E.; GUZMAN, M.; VERDUGUEZ, A.; NENA, W.; MALDONADO, M.; CRUZ, M.; GRACIA, L.; VILLARROEL, D.; ALAVI, I.; TOLEDO, J.; BERMAN, J. Intralesional antimony for single lesions of bolivian Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 9, p. 1255-60, 2013.

STAFFORD, J. L.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002.

STRAZZULLA, A.; COCUZZA, S.; PINZONE, M. R.; POSTORINO, M. C.; COSENTINO, S.; SERRA, A.; CACOPARDO, B.; NUNNARI, G. Mucosal Leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **BioMed Research International**, 2013.

SUN, C-M.; SYU, W-J.; HUANG, Y-T.; CHEN, C-C.; OU, J-C. Selective Cytotoxicity of Ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 382-4, 1997.

SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C. K.; MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in Visceral Leishmaniasis in India: report from the center of the indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. 1104-07, 2000.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 345-52, 2006.

Tan, G-S.; Xu, K-P.; Li, F-S.; Wang, C-J.; Li, T-Y.; Hu, C-P. Selaginellin C, a new natural pigment from *Selaginella pulvinata* Maxim (Hook et Grev.). **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 12, p. 1001-4, 2009.

THAKUR, C. P. Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 92, n. 5, p. 561-69, 1998.

TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A. I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R. P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON Jr., W. D.; CARVALHO, E.M.. Disseminated Leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1829-34, 2002.

WANG, H-S.; SUN, L.; WANG, Y-H.; SHI, Y-N.; TANG, G-H.; ZHAO, F-W. Carboxymethyl flavonoids and a monoterpene glucoside from *Selaginella moellendorffii*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 8, p. 1283-88, 2011.

WENG, J-K.; PHILIPPE, R. N.; NOEL, J. P. The rise of chemodiversity in plants. **Science**, v. 336, p. 1667-70, 2012.

WENG, J-K.; NOEL, J. P. Chemodiversity in *Selaginella*: a reference system for parallel and convergent metabolic evolution in terrestrial plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013.

WHO. World Health Organization. WHO technical report series. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: World Health Organization, 2010.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**: Burden and distribution. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acesso em 16 jun. 2013.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**: Access to essential antileishmanial medicines and treatment. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acesso em: 23 maio 2014.

WU, B.; WANG, J. Phenolic compounds from *Selaginella moellendorffii*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 1735-47, 2011.

XU, K-P.; ZOU, H.; TAN, Q.; LI, F-S.; LIU, J-F.; XIANG, H-L.; et al. Selaginellins I and J, two new alkynyl phenols, from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, n. 2, p. 93-6, 2011.

YAMEY, G. The world's most neglected diseases: ignored by the pharmaceutical industry and by public-private partnerships. **British Medical Journal**, v. 325, p. 176–7, 2002.

ZHANG, Y-X.; LI, Q-Y.; YAN, L-L.; SHI, Y. Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 2173-86, 2011.

ZHENG, X-K.; LI, Y-J.; ZHANG, L.; FENG, W-S.; ZHANG, X. Antihyperglycemic activity of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 531-37, 2011.

#### 4. MANUSCRITO EM LÍNGUA PORTUGUESA

ATIVIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROETANÓLICO E BIFLAVONOIDES  
ISOLADOS DE *SELAGINELLA SELLOWII* SOBRE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*  
*AMAZONENSIS*

Yasmin Silva Rizk<sup>1</sup>, Alice Fischer<sup>2</sup>, Marillin de Castro Cunha<sup>3</sup>, Patrik Oening Rodrigues<sup>4</sup>,  
Maria Carolina Silva Marques<sup>5</sup>, Maria de Fátima Cepa Matos<sup>3</sup>, Mônica Cristina Toffoli  
Kadri<sup>6</sup>, Carlos Alexandre Carollo<sup>2</sup>, Carla Cardozo Pinto de Arruda<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia Humana, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>6</sup>Laboratório de Biofisiofarmacologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

\* (55) 67 33457369, carla.arruda@ufms.br

#### RESUMO

Este trabalho demonstra a atividade antileishmania do extrato hidroetanólico de *Selaginella sellowii* (SSHE) e dos biflavonoides amentoflavona e robustaflavona, isolados pela primeira vez nesta espécie. A atividade foi avaliada sobre formas amastigotas

intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, espécie de grande relevância em saúde pública associada à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). SSHE mostrou alta atividade sobre amastigotas intracelulares ( $CI_{50} = 20,18 \mu\text{g/mL}$ ). O fracionamento do extrato levou ao isolamento de dois biflavonoides com maior atividade. Amentoflavona foi cerca de 170 vezes mais ativa ( $CI_{50} = 0,12 \mu\text{g/mL}$ ) e menos citotóxica ( $CI_{50} = 2,16$  e  $2,97 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, sobre células NIH/3T3 e J774.A1) do que SSHE, com alto índice de seletividade (IS, 18 e 24,75). Robustaflavona também foi ativa ( $CI_{50} = 2,84 \mu\text{g/mL}$ ), porém mais citotóxica, com  $CI_{50} = 25,52 \mu\text{g/mL}$  (IS = 9) sobre células NIH/3T3 e  $CI_{50} = 3,06$  (IS = 1,08) sobre células J774.A1. A produção de óxido nítrico (NO) foi menor nas células tratadas com amentoflavona, sugerindo que a ação leishmanicida pode não se dar por este mecanismo. Em contrapartida, a liberação de NO foi maior após tratamento com robustaflavona. Foi demonstrado que *S. sellowii* apresenta potencial como fonte de biflavonoides, que constituem compostos promissores para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das leishmanioses, em especial a LTA.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea; amentoflavona; robustaflavona; atividade antileishmania.

## INTRODUÇÃO

Leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de insetos flebotomíneos. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é a forma cutânea da doença no Novo Mundo, com manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas localizadas a formas mucosas, incluindo as formas disseminada e difusa (Reithinger et al. 2007, Gontijo &

Carvalho 2003). A forma cutâneo-difusa está associada, no Brasil, à *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, onde indivíduos anérgicos desenvolvem numerosos nódulos, ricos em parasitos. Inicialmente desenvolve-se uma lesão no local da picada do inseto vetor, que evolui de forma lenta, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas em grandes extensões cutâneas, geralmente com má resposta ao tratamento (Grimaldi & Tesh 1993).

As drogas utilizadas ainda hoje no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ). Anfotericina B e pentamidina são utilizadas como segunda escolha. No entanto, elas apresentam importante limitação quanto à segurança terapêutica por apresentarem elevada toxicidade e alta frequência de efeitos adversos (Croft & Coombs 2003, Sundar & Chatterjee 2006, Oliveira et al. 2011). Os antimoniais ainda exigem administração parenteral e longo período de tratamento, ocasionando falhas no tratamento e resistência do parasito (Sundar et al. 2000). A somatória destes problemas evidencia a urgente necessidade de novos agentes terapêuticos.

Recentemente, vários esforços tem sido realizados em busca de novas alternativas terapêuticas para a leishmaniose, com o desenvolvimento de compostos de origem natural e sintética (Monzote 2009). Assim, os produtos naturais constituem uma excelente fonte de novos compostos biologicamente ativos que podem ser utilizados diretamente ou com modificações estruturais que visam o melhoramento de suas atividades e/ou redução da toxicidade (Brahmachari 2011).

O gênero *Selaginella* (Selaginellaceae) apresenta cerca de 750 espécies, predominantemente distribuídas em áreas tropicais (Kramer & Green 1990), sendo várias delas utilizadas na medicina popular em países como Índia, China e Brasil (Sah et al. 2005, Zheng et al. 2011, Santos et al. 2012). Diversos metabólitos já foram isolados no gênero, como alcaloides (Wang et al. 2009), lignanas (Lin et al. 1994), fenilpropanoides

(Lin et al. 1994) e principalmente biflavonoides (Setyawan 2011). Estudos têm explorado as atividades biológicas de compostos presentes em espécies do gênero, tais como anticâncer (Mishra et al. 2011), antifúngica (Mishra et al. 2011) e antiviral (Ma et al. 2001). Kunert et al. (2008) observaram atividade antileishmania nos biflavonoides presentes na espécie *S. bryopteris*.

A espécie *S. sellowii*, encontrada no Pantanal brasileiro (Assis & Labiak 2009), não apresenta descrições sobre seus compostos e atividades biológicas na literatura. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do extrato hidroetanólico de *S. sellowii* e seus compostos isolados sobre formas amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

Os espécimes de *S. sellowii* Hieron. foram coletados em Corumbá, estado de Mato Grosso do Sul (MS), Brasil, em junho de 2009. As plantas foram identificadas pelo Dr. Arnildo Pott, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e depositadas no herbário Campo Grande/UFMS sob o número 27218 (licença CGEN/MMA no. 010273/2013-1).

### *Extração e isolamento*

A planta inteira, pulverizada e tamisada, foi submetida ao extrator de fluido pressurizado Dionex, modelo ASE 150, equipado com um cartucho de extração de 100 mL, sendo que o processo descrito a seguir foi repetido por três vezes. Para a extração,

foram utilizados os seguintes parâmetros: temperatura 130°C, pressão 1500 psi, tempo de extração estático quatro minutos, três ciclos de extração e 150% de volume de lavagem. A planta (90g) foi inicialmente extraída com Diclorometano, para remoção de compostos apolares, em seguida foi extraída com uma mistura de Acetato de etila:metanol (8:2) e então submetida à extração com etanol:água (7:3). Os produtos obtidos das extrações com a última mistura de solvente foram reunidos e concentrados em rotaevaporador para obtenção do extrato hidroetanólico (SSHE) (9,0 g). O SSHE (2,0 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica Sephadex LH-20 e eluído com MeOH. Foram coletadas 102 frações de 20 mL cada. As frações obtidas foram agrupadas após Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placas de sílica gel 60 (Merck) eluídas com clorofórmio:metanol (9:1) e (8,5:1,5) e revelação com NP/PEG. As frações 52-63 (14,8 mg) foram agrupadas, obtendo-se o composto amentoflavona (**1**). As frações 64-101 (1 mg) foram identificadas como sendo a robustaflavona (**2**) (Fig. 1).

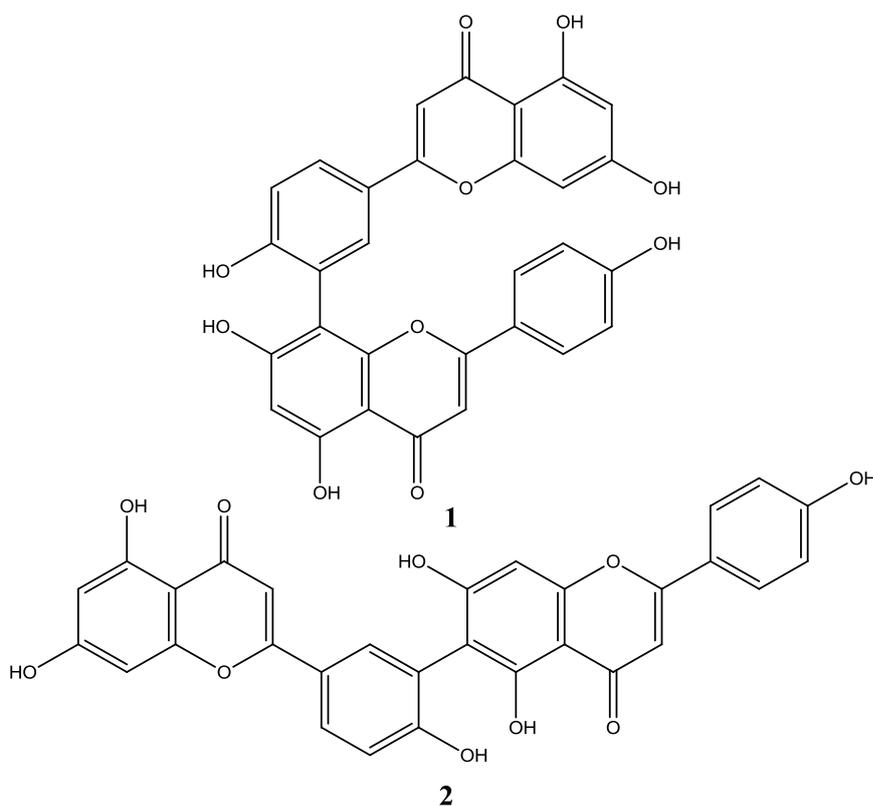


Fig. 1: Compostos isolados de *Selaginella sellowii*: amentoflavona (**1**) e robustaflavona (**2**).

### *Elucidação estrutural*

Os compostos foram identificados através de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135°, Bruker (300/75 MHz) DPX-300, diluídas em DMSO deuterado (Merck, Darmstadt, Alemanha) e dados de MS e MS/MS foram obtidos em alta resolução (microTOF II-ESI TOF - Bruker Daltonics) com modo de ionização positiva. Os dados obtidos foram confirmados por comparação com espectros da literatura (Agrawal & Bansal, 1989).

### *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

SSHE foi analisado quantitativamente (500  $\mu\text{g/mL}$ ) por CLAE-DAD utilizando um cromatógrafo líquido modelo LC-20AD, acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A (Shimadzu) e injetor manual com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ , operando em comprimento de onda de 325 nm. Para a separação, coluna de fase reversa Shimadzu octadecil Shim-pack PREP-ODS (H) KIT (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna (4 cm x 3 mm) com a mesma fase estacionária foram utilizadas. A fase móvel consistiu de A ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e B (MeOH), ambas com 1% de ácido acético, usando o sistema de gradiente linear: 0.01-10 min (25% B), 10 - 25 min (100% B), 25-30 min (100% B) e 30-45 min (25% B). O fluxo foi de 0,8 mL/min. Os dados cromatográficos foram analisados em um sistema operacional computadorizado com software Lcsolution (Shimadzu). Os solventes utilizados foram de grau de pureza CLAE (Vetec) e água Milli-Q (Millipore Inc.).

### *Parasitos*

A cepa padrão IFLA/BR/1967/PH8 de *L. amazonensis* foi utilizada para os ensaios *in vitro*. Amastigotas foram rotineiramente isoladas de lesões de camundongos BALB/c e

mantidas como formas promastigotas em *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich) e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) a 26°C.

### *Animais*

Camundongos BALB/c fêmeas de seis semanas de idade foram utilizados para obter os macrófagos peritoneais residentes usados nos ensaios *in vitro*. Os animais foram obtidos no Biotério Central (CCBS/UFMS) em boas condições de saúde, livres de infecções ou parasitoses comuns aos roedores. Os animais foram mantidos em mini-isoladores acoplados a rack ventilado (Alesco®), em boas condições de higiene, sendo alimentados com ração balanceada comercial e hidratados com água *ad libitum*. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS, sob Parecer 431/2012.

### *Atividade antileishmania*

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram isolados após lavagem com meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) e semeados ( $1 \times 10^5$  células/poço) em placas de 24 poços em meio RPMI-1640 suplementado com SFB a 10% (Cultilab) e 140 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich). Após uma hora de incubação a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>, as células foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária ( $1 \times 10^6$  células/poço) e incubadas a 35°C, em 5% CO<sub>2</sub> por 4h. SSHE foi adicionado nas concentrações de 50 a 12,5 µg/mL. As células foram incubadas a 35°C em 5% CO<sub>2</sub>, fixadas e coradas com Giemsa depois de 24, 48 e 72h. Amentoflavona (0,375 a 3 µg/mL) e robustaflavona (1,56 a 12,5 µg/mL) foram adicionadas em diferentes concentrações e as

células coradas após 72h de tratamento. Células não tratadas foram usadas como controle negativo. Anfotericina B (Sigma-Aldrich) foi usada como controle positivo e analisada após 24h de tratamento. A porcentagem de macrófagos infectados e o número total de amastigotas foram determinados pela contagem de 200 células em sextuplicatas. O índice de infecção foi determinado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos que possuíam ao menos um parasito intracelular pela média de amastigotas por macrófago, como descrito por Paladi et al. (2012). A concentração inibitória para reduzir em 50% o total de amastigotas ( $CI_{50}$ ) foi calculada através de curva dose-resposta de regressão não-linear.

#### *Produção de óxido nítrico (NO)*

Foi avaliada a produção de óxido nítrico pelas células infectadas com *L. amazonensis* tratadas como descrito no item anterior. Cem microlitros do sobrenadante das culturas foram coletados e incubados com igual volume de Reagente de Griess (sulfanilamida 1%/ 0,1% naftiletilenodiamina em ácido fosfórico 5%) por 10 minutos a temperatura ambiente. O acúmulo de nitrito foi quantificado segundo Ding et al. (1988). Absorbância foi determinada a 540 nm, que foi convertida para  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$  por meio da comparação das amostras com uma curva padrão obtida com concentrações conhecidas (1-10  $\mu\text{M}$ ) de nitrito de sódio diluído em meio RPMI.

#### *Ensaio de citotoxicidade*

Macrófagos murinos (J774.A1) e fibroblastos (NIH/3T3), obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil), foram semeados em placas de 96 poços ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) e incubados com SSHE, amentoflavona ou robustaflavona a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  por 48h, nas concentrações de 0,25 a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para estimar a  $CI_{50}$ . Anfotericina B (Sigma-Aldrich)

foi utilizada como droga de referência nas mesmas concentrações. O crescimento celular foi avaliado através do método colorimétrico de sulforodamina B (SRB) (Skehan et al. 1990). Dimetilsulfóxido de sódio (DMSO, Vetec) foi utilizado como controle negativo na concentração utilizada para solubilizar a maior concentração dos compostos teste e não interferiu na viabilidade das células. A porcentagem de crescimento de cada amostra-teste foi calculada conforme indicado por Monks et al. (1991). A  $CI_{50}$  foi determinada por regressão não-linear (Microcal Origin Versão 6.0) e Microsoft Office Excel 2007. O índice de seletividade (IS) foi calculado de acordo com Medeiros et al. (2011).

### *Análise Estatística*

Os resultados da produção de óxido nítrico e do índice de infecção foram expressos como média e desvio-padrão. Os dados foram analisados pelo teste *t*-Student e considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo descreve pela primeira vez a atividade antileishmania associada a um extrato obtido da espécie *S. sellowii*. O extrato hidroetanólico (SSHE) foi testado contra formas amastigotas intracelulares, avaliando-se a cinética de infecção nos tempos de 24, 48 e 72h. Nossos resultados demonstraram o aumento dose-dependente da inibição da multiplicação das amastigotas, obtendo-se a melhor atividade 72h após a adição do extrato. Neste ponto, o índice de infecção apresentou redução variando de 51,36% a 96,5%, da menor para a maior concentração testada, quando comparado ao controle de células infectadas não tratadas (Fig. 2). SSHE mostrou alta atividade contra *L.*

*amazonensis* (CI<sub>50</sub> de 20,18 µg/mL) e não foi citotóxico para células de mamíferos (Tab. I).

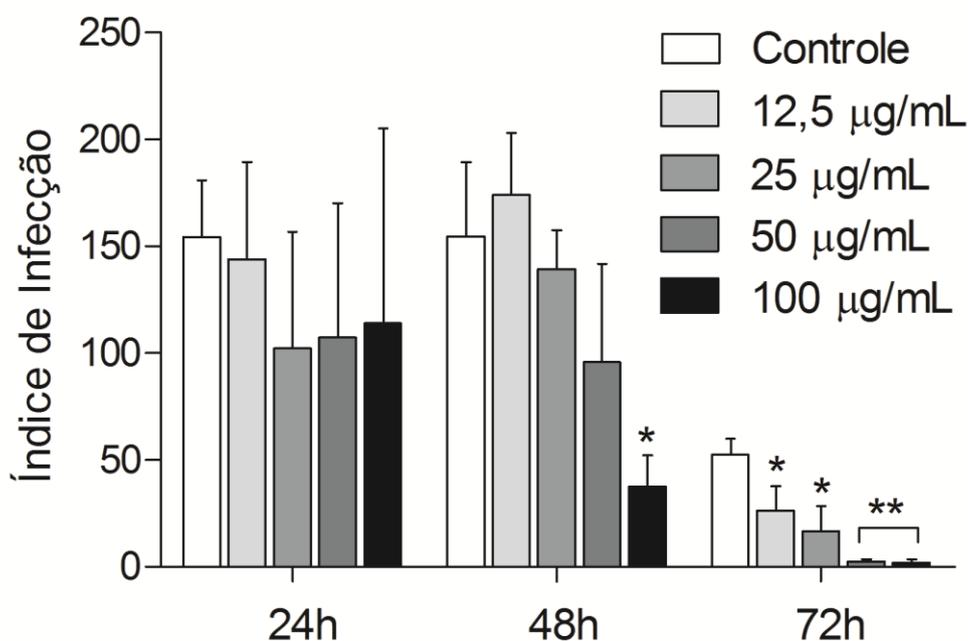


Fig. 2: Atividade antileishmania do extrato hidroetanólico de *S. sellowii* (SSHE) sobre amastigotas intracelulares. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações de SSHE. O índice de infecção foi calculado 24, 48 e 72h após tratamento. Barras representam a média ± DP de sextuplicatas. \*  $p < 0,01$  e \*\*  $p < 0,0001$ , para as diferentes concentrações em relação às células não tratadas (controle) (teste *t*-Student).

Tabela I  
Atividade antileishmania e citotoxicidade do extrato hidroetanólico (SSHE) e compostos isolados de *Selaginella sellowii*.

Amostra-teste	Amastigotas intracelulares	NIH/3T3		J774.A1	
	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	IS	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	IS
SSHE	20,18	246,42	12,21	166,29	8,24
Amentoflavona	0,12 (0,23)	2,16 (4)	18	2,97 (5,51)	24,75
Robustaflavona	2,84 (5,27)	25,52 (47,4)	9	3,06 (5,7)	1,08
Anfotericina B	0,03 (0,029)	2,19 (2,19)	73	4,32 (4,67)	144

CI<sub>50</sub> = Concentração Inibitória 50%

IS (índice de seletividade) = CI<sub>50</sub> célula de mamífero/CI<sub>50</sub> amastigota (µg/mL)

SSHE foi considerado com ótima atividade antileishmania ( $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ) de acordo com os critérios de Claudino et al. (2013) e por isso buscou-se caracterizar seus constituintes a fim de se identificar os compostos responsáveis pela atividade. Anfotericina B foi utilizada como droga controle, resultando em uma  $CI_{50}$  de  $0,03 \mu\text{g/mL}$  contra *L. amazonensis* (Tab. I). Apesar de sua alta atividade, o tratamento clínico com esta droga apresenta elevada toxicidade, alto custo e casos de resistência (Freitas-Júnior et al. 2012), tornando fundamental a busca por um novo agente leishmanicida.

A análise dos espectros de UV dos picos apresentados no CLAE-DAD para SSHE revelou a presença de fenilpropanoides (Silverstein et al. 2007) e biflavonoides (Mabry et al. 1970) (Fig. 3). O fracionamento do SSHE levou ao isolamento de dois biflavonoides descritos no gênero *Selaginella*, amentoflavona (Ma et al. 2001, Zhang et al. 2011) e robustaflavona (Lin et al. 2000, Zhang et al. 2011). Perfis  $^{13}\text{C}$  RMN dos compostos (1) e (2) foram consistentes com os previamente reportados para amentoflavona e robustaflavona, respectivamente (Agrawal 1989). O espectro de massas de (1) exibiu  $m/z$  539,0973  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ , e fragmentos que incluíram  $m/z$  497, 403, 347, 335, 283, 153 e 121, característicos de amentoflavona (Zhang et al. 2011). O espectro de massas do composto (2), com  $m/z$  539,0956  $[\text{M}^+\text{H}]^+$  e fragmentos  $m/z$  521, 465, 387, 283, 270, 153, 121, foram característicos de robustaflavona (Zhang et al. 2011). Este é o primeiro relato de biflavonoides isolados na espécie *S. sellowii*.

Amentoflavona apresenta diversas atividades biológicas, como antiviral (Ma et al. 2001), antifúngica (Jung et al. 2006), antioxidante (Sakthivel & Guruvayoorappan 2013) e anti-inflamatória (Oh et al. 2013). Robustaflavona é descrita como um potente inibidor da replicação do vírus HBV (Zembower et al. 1998). Além disso, os dois biflavonoides são ainda apontados como promissores no desenvolvimento de drogas antidengue (Coulerie et al. 2013) e antielastase (Xu et al. 2009).

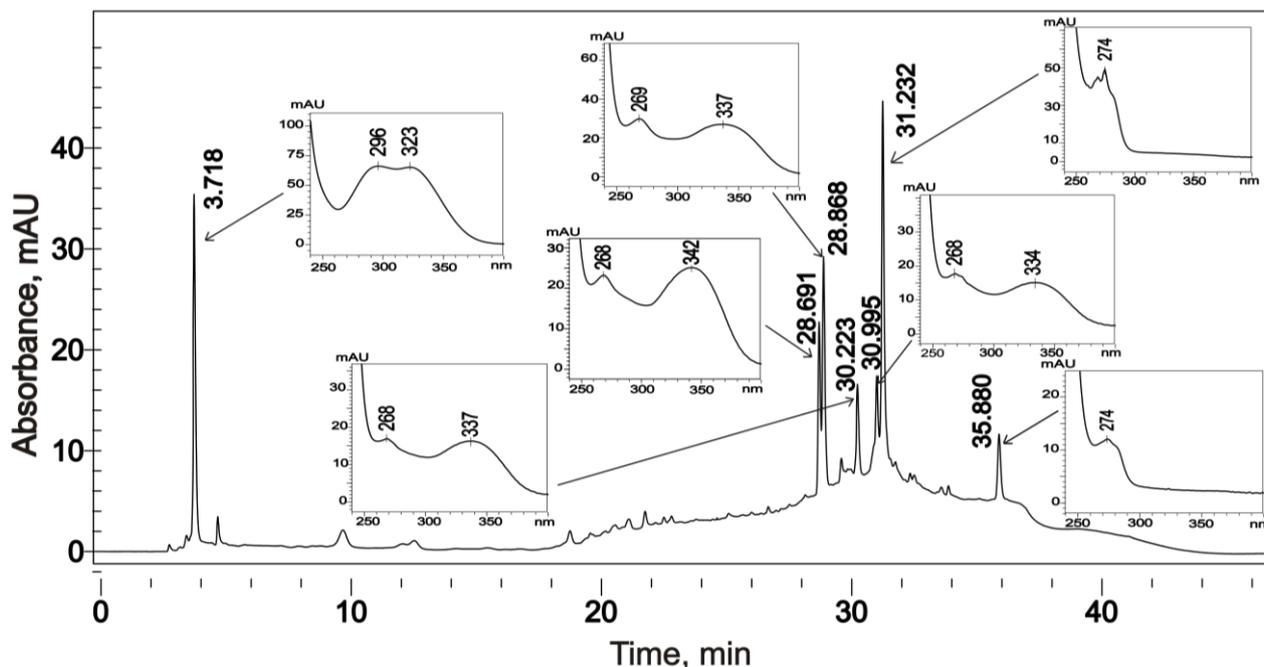


Fig. 3: Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico de *Selaginella sellowii* a 270 nm e espectros de absorção de UV (240 – 400 nm).

Uma vez que a maior atividade leishmanicida foi encontrada 72h após o tratamento com SSHE, os isolados foram avaliados neste mesmo período. O fracionamento do extrato resultou em compostos isolados mais ativos. O tratamento de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* com todas as concentrações testadas de amentoflavona causou uma diminuição significativa ( $p < 0,0001$ ) no índice de infecção quando comparado ao controle, com índices de redução maiores que 90,6%, chegando a quase 100% na maior concentração (3  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 4A). Amentoflavona foi cerca de 170 vezes mais potente do que SSHE ( $\text{CI}_{50} = 0,12 \mu\text{g/mL}$ ). A excelente atividade antileishmania da amentoflavona obtida em nosso estudo alinha-se com os resultados obtidos por Oubada et al. (2014), que observaram atividade da mesma substância após 48h de tratamento sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Uma vez que não foi observada atividade da amentoflavona sobre amastigotas axênicas de *Leishmania donovani* (Weniger et al. 2006, Kunert et al. 2008) e fraca atividade sobre promastigotas desta

mesma espécie (Camacho et al. 2000), sugere-se que a ação antileishmania deste composto possa ser mediada pela célula hospedeira. Este fato, aliado à ação tardia de SSHE (72h), nos leva a considerar a hipótese do composto atuar como uma pró-droga, que necessita ser metabolizada pelo macrófago para exercer seu efeito.

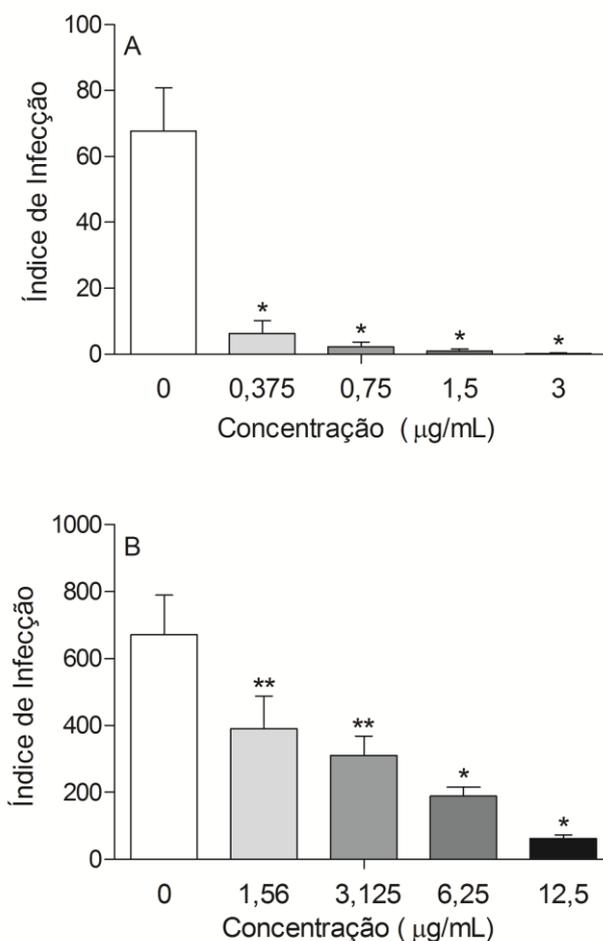


Fig. 4: Atividade antileishmania da amentoflavona (A) e robustaflavona (B) sobre amastigotas intracelulares. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações das substâncias. O índice de infecção foi calculado 72h após tratamento. Barras representam a Média  $\pm$  DP de sextuplicatas. \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,0001$ , para as diferentes concentrações em relação às células não tratadas (controle) (teste *t*-Student).

Da mesma forma que SSHE e amentoflavona, robustaflavona apresentou atividade antileishmania de forma dose-dependente, com redução do índice de infecção chegando a 90,8% (12,5 µg/mL) (Fig. 4B). Robustaflavona foi menos ativa que amentoflavona, com  $CI_{50}$  de 2.84 µg/mL. Mesmo sendo considerada ativa ( $CI_{50} < 10$  µg/mL), o composto

mostrou certa citotoxicidade sobre as células de mamíferos deste ensaio, com índices de seletividade abaixo de 10 (Ndjakou Lenta et al. 2007), conforme mostrado na Tab. I.

Foi investigada a liberação de NO pelos macrófagos infectados e constatou-se que houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após tratamento com a maior concentração de SSHE (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 5A). A produção de NO pelas células tratadas com amentoflavona foi significativamente menor nas concentrações de 1,5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ) e 0,75  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ) em relação às não tratadas (Fig. 5B). Este resultado pode ser devido às propriedades antioxidantes da amentoflavona, que no trabalho de Banerjee et al. (2002) foi associada à inibição da expressão proteica de iNOS. Além disso, Woo et al. (2005) demonstraram o efeito inibidor da amentoflavona sobre a produção de NO induzido por LPS, através do bloqueio da ativação do gene NF- $\kappa$ B, responsável pela transcrição de iNOS. Sugere-se, então, que o mecanismo de destruição das amastigotas intracelulares por este biflavonoide pode não estar associada à liberação de NO. Amentoflavona poderia ter ação direta sobre os parasitos e/ou influência sobre outros mecanismos citotóxicos para patógenos intracelulares. Mecanismos de defesa independentes da liberação de NO podem ser vantajosos em casos de LTA associados a cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* resistentes ao óxido nítrico, descritas no estudo de Giudice e colaboradores (2007), onde a resistência ao NO foi diretamente relacionada ao tamanho da lesão e severidade da doença.

Em contrapartida, robustaflavona aumentou a liberação de NO pelos macrófagos infectados na maior concentração testada (Fig. 5C). De fato, robustaflavona isolada de *S. tamariscina* não tem efeito inibidor sobre a expressão de iNOS, sendo a produção de NO aumentada nas maiores concentrações testadas sobre células tratadas com LPS (Yang et al. 2006). Neste mesmo trabalho, este efeito é comparado ao de outro biflavonoide isolado, a sumaflavona que, tal como amentoflavona, inibe iNOS, diminuindo os níveis de

NO. Os autores sugerem ainda que a diferença do potencial de inibição de NO deve-se a diferenças na localização da ligação C-C das substâncias, isto é, IC3'-IIC8" em amentoflavona e sumaflavona, e IC3'-IIC6" em robustaflavona.

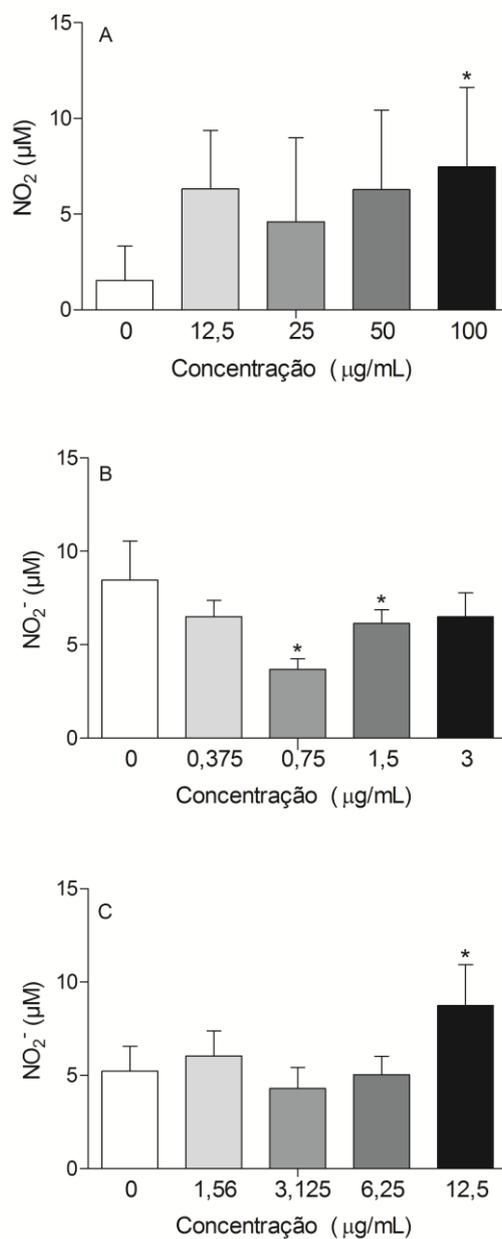


Fig. 5: Efeito sobre a produção de NO por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* após 72h de tratamento com SSHE (A), amentoflavona (B) e robustaflavona (C). Barras representam a média  $\pm$  DP de sextuplicatas. \* $p < 0,05$ , para as diferentes concentrações em relação às células não tratadas (teste *t*-Student).

Este estudo apresenta a primeira descrição da presença dos biflavonoides amentoflavona e robustaflavona na espécie *S. sellowii*. O fracionamento do extrato

hidroetanólico de *S. sellowii* com ação antileishmania permitiu a identificação de compostos ainda mais ativos. O mecanismo antileishmania da amentoflavona não parece envolver a liberação de NO pelos macrófagos infectados, ao contrário da robustaflavona, que apresentou aumento da produção de NO. A atividade antileishmania da amentoflavona, aliada à baixa citotoxicidade às células de mamíferos, torna a mesma um composto promissor para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das leishmanioses, em especial a LTA.

## AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer o suporte financeiro recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

## REFERÊNCIAS

- Agrawal PK, Bansal MC 1989. Other Flavonoids. In Agrawal PK, *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Studies in Organic Chemistry-39, Elsevier, Amsterdam, p.
- Assis, ELM, Labiak PH 2009. Lycophyta da borda oeste do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Bot Bras* 23 (3): 703-12.
- Banerjee T, Van der Vliet A, Ziboh VA 2002. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(5-6): 485-492.
- Brahmachari G 2011. Natural products in drug discovery: Impacts and opportunities - An assessment. In Brahmachari G, *Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry*, 1st ed., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, p. 1-199.
- Camacho MR, Mata R, Castaneda P, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL, Phillipson JD 2000. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Med* 66 (5): 463-468.

Claudino VD, Silva KC da, Filho VC, Yunes RA, Monache FD, Giménez A, Salamanca E, Gutierrez-Yapu D, Malheiros A 2013. Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2): 140-144.

Coulerie P, Nour M, Maciuk A, Eydoux C, Guillemot J-C, Lebouvier N, Hnawia E, Leblanc K, Lewin G, Canard B, Figadère B 2013. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp. *Planta Med* 79: 1313–1318.

Croft SL, Coombs GH 2003. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitol*, 19 (11): 502-508.

Ding AH, Nathan CF, Stuer DJ, 1998. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2412.

Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL 2012. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol: Drugs and Drug Resistance* 2: 11-19.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, Jesus ARde, Carvalho EM, Almeida RP 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7:7.

Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36 (1): 71-80.

Grimaldi Jr G, Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6 (3): 230-250.

Jung HJ, Sung WS, Yeo S-H, Kim HS, Lee I-S, Woo E-R, et al. 2006. Antifungal Effect of Amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Arch Pharm Res* 29 (9): 746-51.

Kramer KU, Green PS 1990. *The families and genera of vascular plants: Pteridophytes and gymnosperms*. v. 1, Springer-Verlag, Berlin, p. 40.

Kunert O, Swamyb RC, Kaiser M, Presser A, Buzzi S, Apparao AVN, et al. 2008. Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. *Phytochem Lett* 1: 171–4.

Lin L-C, Kuo Y-C, Chou C-J 2000. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *J Nat Prod* 63: 627-630.

Lin RC, Skaltsounis AL, Seguin E, Tillequin F, Koch M 1994. Phenolic constituents of *Selaginella doederleinii*. *Planta Med* 60(2): 168-70.

Ma S-C, But PP-H, Ooi VE-C, He Y-H, Lee SH-S, Lee S-F, et al. 2001. Antiviral Amentoflavone from *Selaginella sinensis*. *Biol Pharm Bull* 24 (3): 311-12.

Mabry TJ, Markhan KR, Thomas MB 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, New York, PAG

Medeiros MdasGFde, Silva AC da, Citó AMdasGL, Borges AR, Lima SGde, Lopes JdeAD, et al. 2011. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int* 60: 237–241.

Mishra PK, Raghuram GV, Bhargava A, Ahirwar A, Samarth R, Upadhyaya R, et al. 2011. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the anticarcinogenic and cancer chemopreventive potential of a flavonoid-rich fraction from a traditional Indian herb *Selaginella bryopteris*. *Br J Nutr* 106: 1154-68.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Pau K, Vistica D, et al. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83 (11): 757-766.

Monzote L 2009. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Int J Antimicrob Agents* 1: 9-19.

Ndjakou Lenta B, Vonthron-Sénécheau C, Fongang Soh R, Tantangmo F, Ngouela S, Kaiser M, Tsamod E, Anton R, Weniger B 2007. *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 111: 8–12.

Oh J, Rho HS, Yang Y, Yoon JY, Lee J, Hong YD, Kim HC, Choi SS, Kim TW, Shin SS, Cho JY 2013. Extracellular signal-regulated kinase is a direct target of the anti-inflammatory compound amentoflavone derived from *Torreya nucifera*. *Mediators Inflamm* 2013: 1-11.

Oliveira LFO, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RO, Marzochi MC, et al. 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 118: 87–96.

Oubada A, García M, Bello-Alarcó A, Cuesta-Rubio O, Monzote L 2014. Antileishmanial activity of leaf extract from *Calophyllum rivulare* against *Leishmania amazonensis*. *Emir J Food Agric* 26 (9): 807-812.

Paladi CdS, Pimentel IAS, Katz S, Cunha RLOR, Judice WAdS, Caires ACF, et al. 2012. *In vitro* and *in vivo* activity of a Palladacycle Complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (5): e1626.

Reithinger R, Dujardin JD, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7: 581-96.

Sah NK, Singh SNP, Sahdev S, Banerji S, Jha V, Khan Z, et al. 2005. Indian herb 'Sanjeevani' (*Selaginella bryopteris*) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultra violet and oxidative stress. *J Biosci* 30: 499–505.

Sakthivel KM, Guruvayoorappan C 2013. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- $\kappa$ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 17: 907–916.

Santos JdeFL, Pagani E, Ramos J, Rodrigues E 2012. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. *J Ethnopharmacol* 142: 503-515.

Setyawan AD 2011. Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). *Nus Biosci* 3 (1): 44-58.

Silverstein RM, Webster, FX, Kiemle, DJ 2007. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 7th ed., LTC, Rio de Janeiro.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica, D, et al. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-12.

Sundar S, Chatterjee M 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* 123: 345-352.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31: 1104-1107.

Wang Y-H, Long C-L, Yang F-M, Wang X, Sun Q-Y, Wang H-S, Shi Y-N, Tang G-H 2009. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Selaginella moellendorffii*. *J Nat Prod* 72: 1151–1154.

Weniger B, Vonthron-Sénécheau C, Kaiser M, Brun R, Anton R 2006. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* 13: 176–80.

Woo ER, Lee JY, Cho IJ, Kim SG, Kang KW 2005. Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Pharmacol Res* 51: 539-546.

Xu G-H, Ryoo I-J, Kim Y-H, Choo S-J, Yoo I-D 2009. Free radical scavenging and antielastase activities of flavonoids from the fruits of *Thuja orientalis*. *Arch Pharm Res* 32 (2): 275-282.

Yang JW, Pokharel YR, Kim M-R, Woo E-R, Choi HK, Kang KW 2006. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumafavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *J Ethnopharmacol* 105: 107–113.

Zembower DE, Lin Y-M, Flavin MT, Chen F-C, Korba BE 1998. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. *Antiviral Res* 39: 81-88.

Zhang Y-X, Li Q-Y, Yan L-L, Shi Y 2011. Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25: 2173-2186.

Zheng X-k, Li Y-j, Zhang L, Feng W-s, Zhang Xin 2011. Antihyperglycemic activity of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *J Ethnopharmacol* 133: 531-537.

## 5. MANUSCRITO EM LÍNGUA INGLESA

*IN VITRO* ACTIVITY OF HYDROETHANOLIC EXTRACT AND BIFLAVONOIDS  
ISOLATED FROM *SELAGINELLA SELLOWII* ON *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*  
*AMAZONENSIS*

Yasmin Silva Rizk<sup>1</sup>, Alice Fischer<sup>2</sup>, Marillin de Castro Cunha<sup>3</sup>, Patrik Oening Rodrigues<sup>4</sup>,  
Maria Carolina Silva Marques<sup>5</sup>, Maria de Fátima Cepa Matos<sup>3</sup>, Mônica Cristina Toffoli  
Kadri<sup>6</sup>, Carlos Alexandre Carollo<sup>2</sup>, Carla Cardozo Pinto de Arruda<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia Humana, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

<sup>6</sup>Laboratório de Biofisiofarmacologia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

\*(55) 67 33457369, carla.arruda@ufms.br

### ABSTRACT

This study demonstrates the antileishmanial activity of the hydroethanolic extract from *Selaginella sellowii* (SSHE), as well as of the biflavonoids amentoflavone and robustaflavone, isolated for the first time in this species. These substances' effects were evaluated on intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, a

species of great relevance in American cutaneous leishmaniasis (ACL). SSHE presented high activity against intracellular amastigotes ( $IC_{50}$  value of 20.18  $\mu\text{g/mL}$ ). Extract fractionation led to isolation of two bioflavonoids with the highest activity, as follows: amentoflavone was about 170 times more active ( $IC_{50}$  value of 0.12  $\mu\text{g/mL}$ ) and less cytotoxic than SSHE ( $IC_{50}$  value of 2.16 and 2.97  $\mu\text{g/mL}$ , respectively on NIH/3T3 and J774.A1 cells), with high selectivity index (18 and 24.75); robustaflavone was also active against *L. amazonensis* ( $IC_{50}$  value of 2.84  $\mu\text{g/mL}$ ), but more cytotoxic, with  $IC_{50} = 25.52$   $\mu\text{g/mL}$  (SI = 9) on NIH/3T3 cells and  $IC_{50} = 3.06$   $\mu\text{g/mL}$  (SI = 1.08) on J774.A1 cells. The production of nitric oxide was lower in cells treated by amentoflavone (suggesting that NO should not be the leishmanicide mechanism in this case), while NO release was higher after treatment with robustaflavone. We demonstrate *S. sellowii* as a potential source of biflavonoids that could provide promising compounds for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

**KEYWORDS:** cutaneous leishmaniasis; amentoflavone; robustaflavone; antileishmanial activity.

## INTRODUCTION

Leishmaniasis are a group of infectious diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, transmitted by the bite of sand flies insects. American cutaneous leishmaniasis (ACL) is the cutaneous form of the disease in the New World, with clinical manifestations ranging from skin lesions to mucosal forms, including widespread and diffuse forms (Reithinger et al. 2007, Gontijo & Carvalho 2003). The cutaneous diffuse manifestation is associated, in Brazil, to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, form in which anergic individuals develop numerous parasite-rich nodules. A lesion develops at the insect bite's site and evolves slowly, with multiple non-ulcerated nodules appearing in

large extensions of the skin, usually with poor response to treatment (Grimaldi & Tesh 1993).

The first-choice drugs to the treatment of leishmaniasis are the pentavalent antimonials ( $\text{Sb}^{+5}$ ). Amphotericin B and pentamidine are used as alternative therapeutic options. However, all of these drugs have important limitations as to the safety of use, presenting relevant toxicity and high frequency of side effects (Croft & Coombs 2003, Sundar & Chatterjee 2006, Oliveira et al. 2011). The antimonials still require long-term use and parenteral administration, resulting in treatment failure and resistant parasites (Sundar et al. 2000), facts which reinforce the urgent need for new therapeutic agents.

Recently, many efforts have been applied to the development of antileishmanials compounds, naturally or synthetically obtained (Monzote 2009). Natural products are a great source of new biologically active compounds that can be used directly or with structural modifications designed to improve their activities and/or reduce their toxicity (Brahmachari 2012).

The genus *Selaginella* (Selaginellaceae) contains about 750 species, distributed mainly in tropical areas (Kramer & Green 1990). Many of them are used by folk medicine in countries like India, China and Brazil (Sah et al. 2005, Zheng et al. 2011, Santos et al. 2012). Several metabolites have been isolated in the genus, such as alkaloids (Wang et al. 2009), lignans (Lin et al. 1994), phenylpropanoids (Lin et al. 1994) and mainly biflavonoids (Setyawan 2011). Studies have explored the biological activities of compounds present in their species, such as anticancer (Mishra et al. 2011), antifungal (Mishra et al. 2011), and antiviral (Ma et al. 2001). Kunert et al. (2008) observed antileishmanial activity in biflavonoids present in *S. bryopteris*.

*Selaginella sellowii* is widely found in Brazilian pantanal wetlands (Assis & Labiak 2009), but there are no descriptions of their compounds and their respective biological

activities. The aim of this study was to evaluate the activity of hydroethanolic extract and biflavonoids isolated from *S. sellowii* on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Plant material*

*Selaginella sellowii* Hieron. (Selaginellales: Selaginellaceae) was collected in June 2009 in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The plant was identified by Dr. Arnildo Pott of the Botany Laboratory, CCBS/UFMS and voucher material was deposited in the CG/UFMS herbarium under registration number 27218 (license CGEN/MMA n° 010273/2013-1).

### *Plant extraction and isolation*

The whole dried pulverized plant was submitted to a pressurized fluid extractor (Dionex, model ASE 150) equipped with an extraction cartridge (100 mL). The following parameters were repeated three times: temperature of 130°C, pressure of 1500 psi, static extraction time of four minute, 150% volume wash and three cycles of extraction. Plant material (90.0 g) was first extracted in dichloromethane to remove apolar compounds, followed by a mixture of ethyl acetate:methanol (8:2) and finally ethanol:water (7:3). The latter extraction cycles were concentrated in a rotary evaporator, obtaining a hydroethanolic extract denominated SSHE. The yield was 10.0% (w/w). SSHE (2.0 g) was chromatographed on a Sephadex LH-20 column and eluted with MeOH; 102 fractions of 20 mL each were collected. The obtained fractions were grouped after thin-layer

chromatography (TLC) in silica gel 60 plates (Merck), eluted with chlorophorm:methanol (9:1 and 8.5:1.5) and the revelation done with NP/PEG. Fractions 52-63 (14.8 mg) were grouped, obtaining the compound amentoflavone (**1**). Fractions 64-101 (1 mg) were identified as robustaflavone (**2**) (Fig. 1).

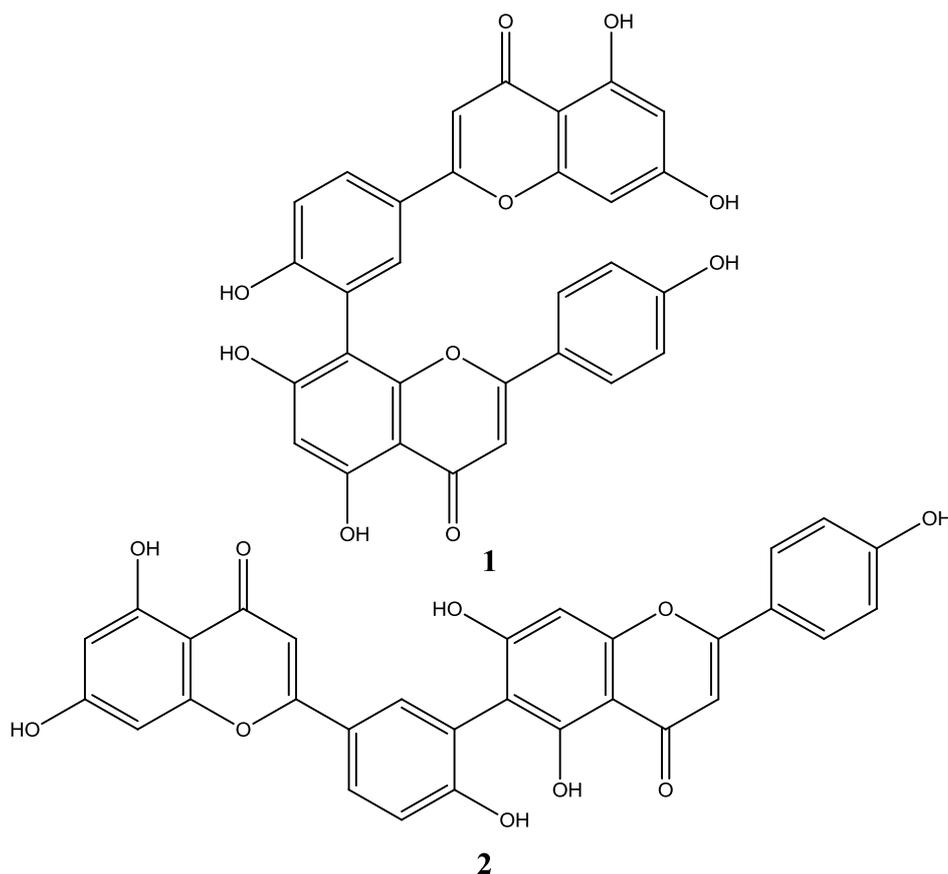


Fig. 1: Compounds isolated from *Selaginella sellowii*: amentoflavone (**1**) and robustaflavone (**2**).

### *Structural elucidation*

The compounds were identified by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and DEPT-135° Bruker (300/75 MHz) DPX-300 diluted in deuterated DMSO (Merck, Darmstadt, Germany). Data for MS and MS/MS were obtained in high resolution (ESI-TOF micrOTOF II - Bruker Daltonics) with positive ionization mode, confirmed by comparison with literature spectra (Agrawal & Bansal 1989).

### *Liquid chromatography*

SSHE was analyzed quantitatively (500µg/mL) for HPLC-DAD using a liquid chromatograph model LC-20AD coupled with a diode array detector (model SPD-M20A, Shimadzu), operating at wavelengths of 325 nm and manual injector with 20 µL loop sampling. A reversed phase octadecyl Shimadzu Shim-pack PREP-ODS (H) KIT (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) and guard column (4 cm x 3 mm) with the same stationary phase were used for separation. The mobile phase consisted of A (H<sub>2</sub>O) and B (MeOH), both with 1% acetic acid, using a linear gradient system: 0.01 to 10 min (25% B), 10 to 25 min (100% B), 25 to 30 min (100% B) and 30 to 45 min (25% B). The flow rate was 0.8 mL/min. The chromatographic data were analyzed on a computer with the Lcsolution operating system (Shimadzu). The solvents were HPLC grade (Vetec) and ultrapure water (Millipore Inc.).

### *Parasites*

A standard strain of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) was used for *in vitro* tests. Amastigotes forms were routinely isolated from BALB/c mice cutaneous lesions and maintained as promastigotes at 25°C in Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% fetal calf serum (Cultilab) and 140 µg/mL gentamicin (Sigma-Aldrich).

### *Animals*

Female BALB/c mice aged six weeks were used to obtaining resident peritoneal macrophages used in the tests. The animals were obtained from the central animal facility of the Center for Biological and Health Sciences (CCBS) of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS, Brazil) in good health and free of common rodent infections or

parasites, maintained in individually ventilated cages equipped with mini-isolators, fed a balanced feed (Nuvilab CR-1, Nuvital®) with free access to water. This study received approval from the local Animal Experimentation Ethics Committee (CEUA/UFMS) under protocol number 431/2012.

### *Antileishmanial activity*

Peritoneal macrophages from BALB/c mice were isolated after lavage with RPMI 1640 medium (Sigma) and placed ( $1 \times 10^5$  cells/well) in a 24-well plate in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% FCS (Cultilab) and 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicin (Sigma). After one hour-incubation at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ , cells were infected with *L. amazonensis* promastigotes ( $1 \times 10^6$  cells/well), and subsequently incubated at 35°C for four hours. SSHE was added at concentrations of 50 to 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The cells were incubated at 35°C in 5%  $\text{CO}_2$ , fixed and stained with Giemsa after 24, 48 and 72 hours. Amentoflavone (0.375 a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and robustaflavone (1.56 a 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were added at different concentrations and the cells stained after 72 hours of treatment. Untreated infected cells were used as negative control. Amphotericin B (Sigma) was used as a positive control and analyzed after 24 hours. The percentage of infected macrophages and the total number of amastigotes were determined by counting 200 cells in sextuplicates. Infection index was determined by multiplying the percentage of macrophages that had at least one intracellular parasite by the mean of amastigotes per macrophage (Paladi et al. 2012). A non-linear dose-response regression curve was used to calculate the half maximum inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ).

### *Nitric oxide (NO) evaluation*

NO production by *L. amazonensis* infected cells treated as described in the previous item was evaluated. 100  $\mu\text{L}$  of the supernatants were collected and incubated with an equal volume of Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1% naphthalene diamine dihydrochloride/2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) for 10 minutes at room temperature for the quantification of the accumulation of nitrite (Ding et al. 1988). Absorbance was determined at 540 nm. The conversion of absorbance to  $\mu\text{M}$  of  $\text{NO}_2^-$  was performed by comparing the samples to a standard curve obtained with known concentrations (1 to 10  $\mu\text{M}$ ) of sodium nitrite diluted in RPMI medium.

### *Cytotoxicity assay*

Murine macrophages (J774.A1) and fibroblast cells (NIH/3T3) purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil) were treated with SSHE and isolated compounds at concentrations of 0.25 to 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to estimate  $\text{IC}_{50}$ . Amphotericin B (Sigma) was used as reference drug at the same concentrations. Cell viability was determined using the sulforhodamine B assay (Skehan et al. 1990). Sodium dimethylsulfoxide (DMSO, Vetec) was used as a negative control at the concentration used to solubilize higher concentrations of test compounds without interfering with the cell's viability. The percentage growth of each test sample was calculated as described by Monks et al. (1991). A non-linear dose-response regression curve was used to calculate  $\text{IC}_{50}$ . The selectivity index (SI) was calculated according to Medeiros et al. (2011).

### *Statistical analysis*

Nitric oxide evaluation and infection index were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD), and the data were analyzed using the Student's *t*-test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$  (represented by asterisks).

## RESULTS AND DISCUSSION

The hydroethanolic extract (SSHE) was tested against intracellular amastigotes by evaluating the kinetics of infection at 24, 48 and 72 hours. Our results demonstrated a dose-dependent inhibition on the proliferation of intracellular amastigotes, with highest activity registered 72h after extract addition. At that point, the infection index had decreased from 51.6% to 96.5%, from the lowest to the highest concentration tested (Fig. 2). The inhibitory concentration that reduced 50% of the intracellular forms of *L. amazonensis* ( $IC_{50}$ ) was 20.18  $\mu\text{g/mL}$ , with no cytotoxicity to mammalian cells ( $IC_{50}$  value of 246.2  $\mu\text{g/mL}$ ) (Table I).

SSHE was regarded with great antileishmanial activity ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ), according to the criterion used by Claudino et al. (2013). Therefore, their constituents were characterized in order to identify the compounds responsible for the activity. Amphotericin B was used as a reference drug and resulted in  $IC_{50}$  value of 0.03  $\mu\text{g/mL}$  against *L. amazonensis* (Table I). Despite its high activity, amphotericin B is highly toxic, costly and associated with cases of resistance (Freitas-Júnior et al. 2012), making the search for a new antileishmanial drug a relevant matter.

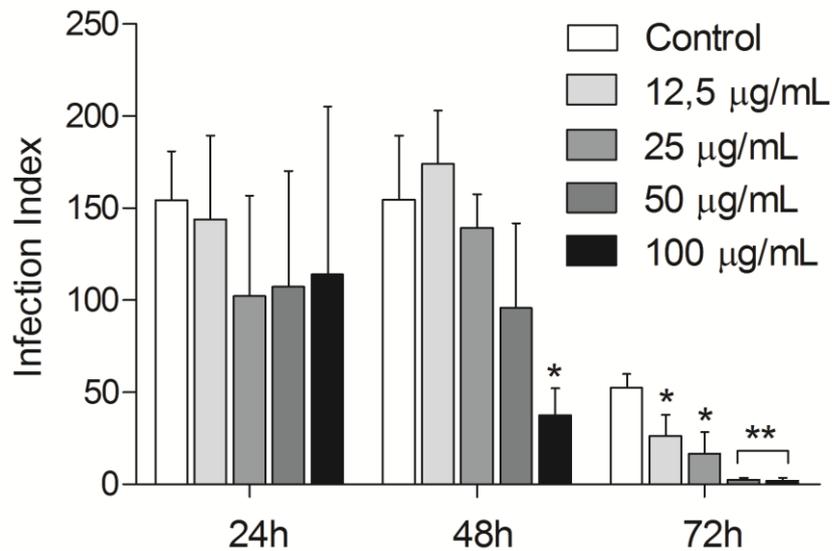


Fig. 2: Antileishmanial activity of hydroethanolic extract from *Selaginella sellowii* (SSHE) on intracellular amastigotes. Peritoneal macrophages were infected with *L. amazonensis* and treated with different concentrations of SSHE. Infection index was calculated 24, 48 and 72 hours after treatment. Bars represent the mean  $\pm$  SD of quadruplicates. \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.0001$ , for the different concentrations compared to untreated cells (control) (Student's *t*-test).

Table I.  
Antileishmanial activity and cytotoxicity of hydroethanolic extract (SSHE) and biflavonoids isolated from *Selaginella sellowii*.

Test-sample	Intracellular amastigotes	NIH/3T3		J774.A1	
	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	IS	CI <sub>50</sub> µg/mL (µM)	IS
SSHE	20,18	246,42	12,21	166,29	8,24
Amentoflavone	0,12 (0,23)	2,16 (4)	18	2,97 (5,51)	24,75
Robustaflavone	2,84 (5,27)	25,52 (47,4)	9	3,06 (5,7)	1,08
Amphotericin B	0,03 (0,029)	2,19 (2,19)	73	4,32 (4,67)	144

IC<sub>50</sub> = half maximum inhibitory concentration

SI (selectivity index) = IC<sub>50</sub> mammalian cell/IC<sub>50</sub> amastigotes (µg/mL)

The analysis of UV spectra of SSHE compounds revealed the presence of phenylpropanoids (Silverstein et al. 2007) and biflavonoids (Mabry et al. 1970) (Fig. 3).

The fractionation led to the isolation of two biflavonoids described in the genus *Selaginella*:

amentoflavone (Ma et al. 2001, Zhang et al. 2011) and robustaflavone (Lin et al. 2000, Zhang et al. 2011).

The  $^{13}\text{C}$  NMR profiles of the compounds (1) and (2) were consistent with those reported previously for amentoflavone and robustaflavone (Agrawal & Bansal 1989). The mass spectrum of (1) exhibited  $m/z$  539,0973  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ , and fragments which included  $m/z$  497, 403, 347, 335, 283, 153 and 121, characteristic of amentoflavone (Zhang et al. 2011). Compound (2) exhibited mass spectrum with  $m/z$  539,0956  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ , and fragments  $m/z$  521, 465, 387, 283, 270, 153 and 121, characteristic of robustaflavone (Zhang et al. 2011). This is the first report of biflavonoids isolated from *S. sellowii*.

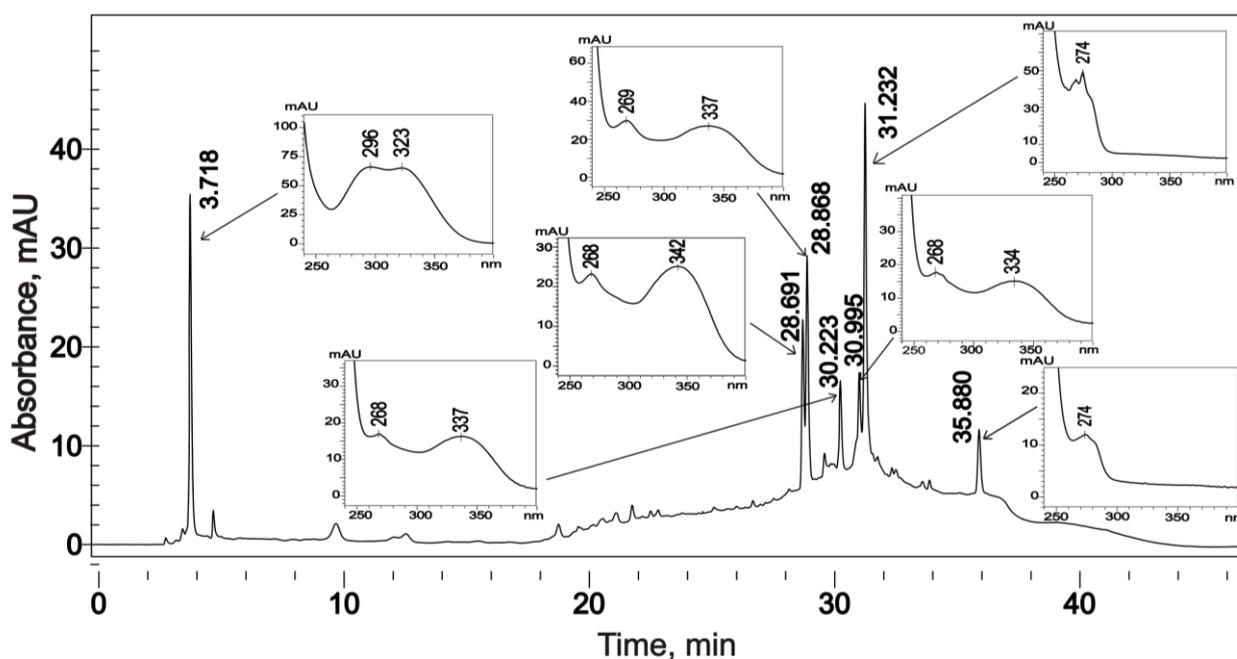


Fig. 3: Chromatographic profile at 270 nm and UV absorption spectra (240-400nm) of the hydroethanolic extract from *Selaginella sellowii*.

Amentoflavone shows various biological activities such as antiviral (Ma et al. 2001), antifungal (Jung et al. 2006), antioxidant (Sakthivel & Guruvayoorappan 2013) and anti-inflammatory (Oh et al. 2013). Robustaflavone is described as a potent inhibitor of HBV virus replication (Zembower et al. 1998). Furthermore, both biflavonoids are suggested for

the development of promising anti-dengue drugs (Coulerie et al. 2013) and antielastase (Xu et al., 2009).

Once the highest activity was found 72 hours after the treatment with SSHE, the isolates were evaluated at that point. Purification resulted in compounds with higher activity. Treatment of intracellular amastigotes with all concentrations tested of amentoflavone caused a significant decrease ( $p < 0.0001$ ) in the infection index when compared to the control, with a reduction greater than 90.6%, reaching almost 100% at the highest concentration (3  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 4A). Amentoflavone was about 170 times more powerful than SSHE ( $\text{IC}_{50}$  value of 0.12  $\mu\text{g/mL}$ ). The excellent antileishmanial activity of amentoflavone obtained in our study is in conformity with those obtained by Oubada et al. (2014), who observed the effects on *L. amazonensis* intracellular amastigotes 48 hours after the treatment aforementioned. Amentoflavone was not active on axenic amastigotes of *Leishmania donovani* (Weniger et al. 2006, Kunert et al. 2008) and showed poor activity on promastigotes of the same species (Camacho et al. 2000). Therefore, the antileishmanial action of this compound may be mediated by the host cell. This fact, coupled with the delayed action of SSHE (72h), leads us to consider the compound as a pro-drug, which needs to be metabolized by macrophage to exert its effect.

Robustaflavone also showed antileishmanial activity in a dose-dependent way, with a reduction of infection index reaching 90.8% (12.5  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 4B). Robustaflavone was less active than amentoflavone, with  $\text{IC}_{50}$  value of 2.84  $\mu\text{g/mL}$ . Despite of being considered as active ( $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ), the compound showed some cytotoxicity on mammalian cells, with selectivity index below 10 (Ndjakou Lenta et al. 2007), as shown in Table I.

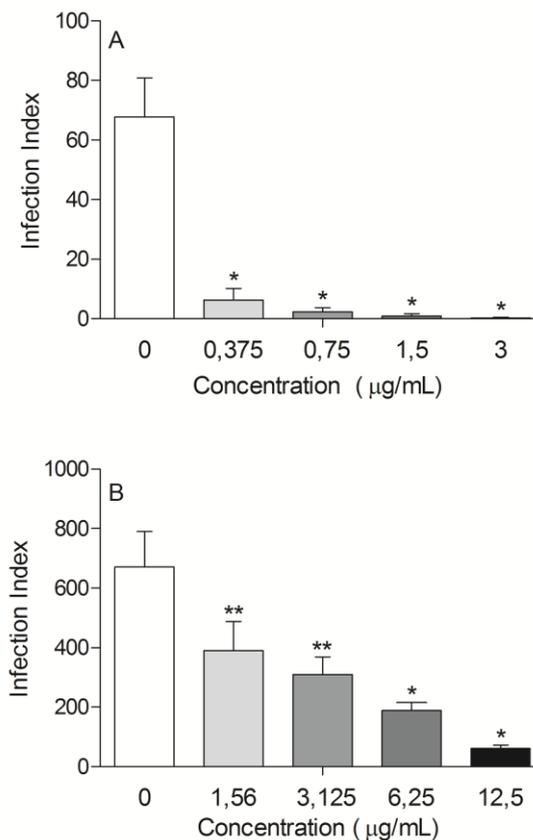


Fig. 4. Antileishmanial activity of amentoflavone (A) and robustaflavone (B) on intracellular amastigotes. Peritoneal macrophages were infected with *L. amazonensis* and treated with different concentrations of the compounds. Infection index was calculated 72 h after treatment. Bars represent the mean  $\pm$  SD of sextuplicates. \*\*  $p < 0.01$ . and \*  $p < 0.0001$ , for the different concentrations compared to untreated cells (control) (Student's *t*-test).

Activation of macrophages was investigated by the nitric oxide (NO) release. NO production was significantly increased ( $p < 0.05$ ) after treatment with the highest concentration of SSHE (100 µg/mL) (Fig. 5A). NO production by peritoneal macrophages treated with amentoflavone was significantly lower at the concentrations of 1.5 µg/mL ( $p < 0.05$ ) and 0.75 µg/mL ( $p < 0.01$ ), compared to untreated infected cells (Fig. 5B). This may be due to the antioxidant properties of amentoflavone. Banerjee et al. (2002) observed the inhibition of iNOS protein expression by amentoflavone. In addition, Woo et al. (2005) demonstrated the inhibitory effect of amentoflavone on NO production, induced by LPS, which prevents the activation of NF- $\kappa$ B, the gene responsible for transcription of iNOS. It

suggests, therefore, that the destruction mechanism of intracellular amastigotes by this biflavonoid should not be directly associated with increased release of NO. Amentoflavone could have direct action on the parasites and/or influence over other cytotoxic mechanisms for intracellular pathogens. Defense mechanisms independent of NO release can be useful in cases of ACL associated with strains of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* resistant to nitric oxide, as described by Giudice et al. (2007), who demonstrated that the resistance to NO is directly related to lesion size and severity of the disease.

In contrast, robustaflavone had increased the NO release by infected macrophages at the highest concentration tested (Fig. 5C). In fact, Yang et al. (2006) demonstrated that robustaflavone isolated from *S. tamariscina* did not affect the expression of iNOS. In the same study, this effect was compared with another isolated biflavonoid called sumaflavone, which, as amentoflavone, has inhibited iNOS and decreased NO levels. The authors also suggest the difference in inhibitory potential of NO due to differences in the location of the C-C bond in the compounds, i.e., IC3'-IIC8" in amentoflavone/sumaflavone and IC3'-IIC6" in robustaflavone.

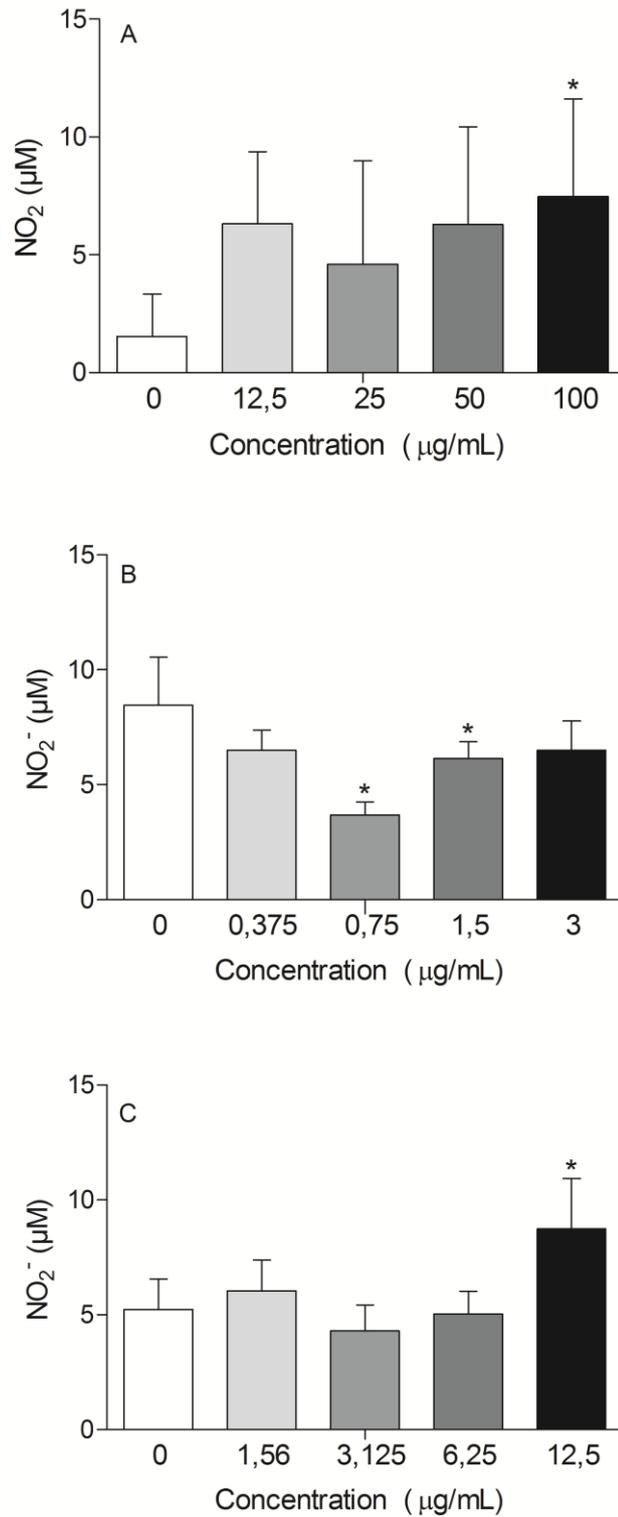


Fig. 5: Nitric oxide release by *L. amazonensis* infected macrophages 72 hours after treatment with SSHE (A), amentoflavone (B) and robustaflavone (C). Bars represent the mean  $\pm$  SD of sextuplicates. \*  $p < 0.05$ , for the different concentrations compared to untreated cells (Student's *t*-test).

This is the first study to describe the presence of the biflavonoids amentoflavone and robustaflavone in *S. sellowii*. The fractionation of active hydroethanolic extract from *S. sellowii* allowed the identification of even more active compounds. The antileishmanial mechanism of amentoflavone does not seem to involve macrophage activation by increasing the release of NO, unlike the one from robustaflavone, which induced an increase in its production. The antileishmanial activity of amentoflavone coupled with its low cytotoxicity to mammalian cells suggest it as a promising compound for the development of new drugs aimed at treating leishmaniasis, specially the ACL form.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge financial support received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT).

#### REFERENCES

- Agrawal PK, Bansal MC 1989. Other Flavonoids. In Agrawal PK, *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Studies in Organic Chemistry-39, Elsevier, Amsterdam, p.
- Assis, ELM, Labiak PH 2009. Lycophyta da borda oeste do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Bot Bras* 23 (3): 703-12.
- Banerjee T, Van der Vliet A, Ziboh VA 2002. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(5-6):485-492.
- Brahmachari G 2011. Natural products in drug discovery: Impacts and opportunities - An assessment. In Brahmachari G, *Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry*, 1st ed., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, p.1-199.

Camacho MR, Mata R, Castaneda P, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL, Phillipson JD 2000. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Med* 66 (5):463-468.

Claudino VD, Silva KC da, Filho VC, Yunes RA, Monache FD, Giménez A, Salamanca E, Gutierrez-Yapu D, Malheiros A 2013. Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2): 140-144.

Coulerie P, Nour M, Maciuk A, Eydoux C, Guillemot J-C, Lebouvier N, Hnawia E, Leblanc K, Lewin G, Canard B, Figadère B 2013. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp. *Planta Med* 79: 1313–1318.

Croft SL, Coombs GH 2003. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitol*, 19 (11): 502-508.

Ding AH, Nathan CF, Stuer DJ, 1998. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2412.

Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL 2012. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol: Drugs and Drug Resistance* 2: 11-19.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, Jesus ARde, Carvalho EM, Almeida RP 2007. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7:7.

Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36 (1): 71-80.

Grimaldi Jr G, Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6 (3): 230-250.

Jung HJ, Sung WS, Yeo S-H, Kim HS, Lee I-S, Woo E-R, et al. 2006. Antifungal Effect of Amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Arch Pharm Res* 29 (9): 746-51.

Kramer KU, Green PS 1990. *The families and genera of vascular plants: Pteridophytes and gymnosperms*. v. 1, Springer-Verlag, Berlin, p. 40.

Kunert O, Swamyb RC, Kaiser M, Presser A, Buzzi S, Apparao AVN, et al. 2008. Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. *Phytochem Lett* 1: 171–4.

Lin L-C, Kuo Y-C, Chou C-J 2000. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *J Nat Prod* 63: 627-630.

Lin RC, Skaltsounis AL, Seguin E, Tillequin F, Koch M 1994. Phenolic constituents of *Selaginella doederleinii*. *Planta Med* 60(2):168-70.

Ma S-C, But PP-H, Ooi VE-C, He Y-H, Lee SH-S, Lee S-F, et al. 2001. Antiviral Amentoflavone from *Selaginella sinensis*. *Biol Pharm Bull* 24 (3): 311-12.

Mabry TJ, Markhan KR, Thomas MB 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, New York, PAG

Medeiros MdasGFde, Silva AC da, Citó AMdasGL, Borges AR, Lima SGde, Lopes JdeAD, et al. 2011. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int* 60: 237–241.

Mishra PK, Raghuram GV, Bhargava A, Ahirwar A, Samarth R, Upadhyaya R, et al. 2011. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the anticarcinogenic and cancer chemopreventive potential of a flavonoid-rich fraction from a traditional Indian herb *Selaginella bryopteris*. *Br J Nutr* 106:1154-68.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Pau K, Vistica D, et al. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83 (11):757-766.

Monzote L 2009. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Int J Antimicrob Agents* 1: 9-19.

Ndjakou Lenta B, Vonthron-Sénécheau C, Fongang Soh R, Tantangmo F, Ngouela S, Kaiser M, Tsamod E, Anton R, Weniger B 2007. *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 111: 8–12.

Oh J, Rho HS, Yang Y, Yoon JY, Lee J, Hong YD, Kim HC, Choi SS, Kim TW, Shin SS, Cho JY 2013. Extracellular signal-regulated kinase is a direct target of the anti-inflammatory compound amentoflavone derived from *Torreya nucifera*. *Mediators Inflamm* 2013: 1-11.

Oliveira LFO, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RO, Marzochi MC, et al. 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 118: 87–96.

Oubada A, García M, Bello-Alarcó A, Cuesta-Rubio O, Monzote L 2014. Antileishmanial activity of leaf extract from *Calophyllum rivulare* against *Leishmania amazonensis*. *Emir J Food Agric* 26 (9): 807-812.

Paladi CdS, Pimentel IAS, Katz S, Cunha RLOR, Judice WAdS, Caires ACF, et al. 2012. *In vitro* and *in vivo* activity of a Palladacycle Complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (5): e1626.

Reithinger R, Dujardin JD, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7: 581-96.

Sah NK, Singh SNP, Sahdev S, Banerji S, Jha V, Khan Z, et al. 2005. Indian herb 'Sanjeevani' (*Selaginella bryopteris*) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultra violet and oxidative stress. *J Biosci* 30: 499–505.

Sakthivel KM, Guruvayoorappan C 2013. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- $\kappa$ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 17: 907–916.

Santos JdeFL, Pagani E, Ramos J, Rodrigues E 2012. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. *J Ethnopharmacol* 142: 503-515.

Setyawan AD 2011. Review: Natural products from Genus *Selaginella* (Selaginellaceae). *Nus Biosci* 3 (1): 44-58.

Silverstein RM, Webster, FX, Kiemle, DJ 2007. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, 7th ed., LTC, Rio de Janeiro.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica, D, et al. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-12.

Sundar S, Chatterjee M 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* 123: 345-352.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, et al 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31: 1104-1107.

Wang Y-H, Long C-L, Yang F-M, Wang X, Sun Q-Y, Wang H-S, Shi Y-N, Tang G-H 2009. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Selaginella moellendorffii*. *J Nat Prod* 72: 1151–1154.

Weniger B, Vonthron-Sénécheau C, Kaiser M, Brun R, Anton R 2006. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* 13: 176–80.

Woo ER, Lee JY, Cho IJ, Kim SG, Kang KW 2005. Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Pharmacol Res* 51: 539–546.

Xu G-H, Ryoo I-J, Kim Y-H, Choo S-J, Yoo I-D 2009. Free radical scavenging and antielastase activities of flavonoids from the fruits of *Thuja orientalis*. *Arch Pharm Res* 32 (2): 275-282.

Yang JW, Pokharel YR, Kim M-R, Woo E-R, Choi HK, Kang KW 2006. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumafavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *J Ethnopharmacol* 105: 107–113.

Zembower DE, Lin Y-M, Flavin MT, Chen F-C, Korba BE 1998. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. *Antiviral Res* 39: 81–88.

Zhang Y-X, Li Q-Y, Yan L-L, Shi Y 2011. Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25: 2173-2186.

Zheng X-k, Li Y-j, Zhang L, Feng W-s, Zhang Xin 2011. Antihyperglycemic activity of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *J Ethnopharmacol* 133: 531-537.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
**Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA**

### C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 431/2012 da Pesquisadora Carla Cardozo Pinto de Arruda referente ao projeto de pesquisa “Investigação da ação de extratos de *Selaginella sellowii* Hieron, sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”, está de acordo com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 17 de maio 2012.

Campo Grande (MS), 25 de maio de 2012.

Dr<sup>a</sup> Joice Stein  
Coordenadora da CEUA