UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
ENGENHARIAS – CCAE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RHAIRA NAZARIO RIBEIRO

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO RENISUS COM AÇÃO LEISHMANICIDA PARA FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp.

ALEGRE-ES
2019

RHAIRA NAZARIO RIBEIRO

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO RENISUS COM AÇÃO LEISHMANICIDA PARA FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr.: Francisco de Paula Careta

Coorientador (a): Prof.(a) Dr.(a): Juliana Severi

ALEGRE-ES

2019

RHAIRA NAZARIO RIBEIRO

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO RENISUS COM AÇÃO LEISHMANICIDA PARA FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas

Aprovado em 30 de Julho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Paula Careta
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Marcos Santos Zanini
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador interno

Prof (a). Dr (a). Greiciane Gaburro Paneto
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador externo

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, por tudo que tens planejado para minha vida. Por ter me concedido forças e perseverança, que não me deixastes desistir diante dos obstáculos dessa caminhada. Sendo esse agradecimento apenas uma parte do que sou eternamente grata e devedora. Agradeço a ele a vida do meu filho, Davi, que hoje é meu maior motivador, minha força, meu amor, meu sentido. A alegria de ter o recebido foi, é, e sempre será o meu combustível diário.

Aos meus pais, Marilane e Marcus, que sempre mativeram-se presentes na minha formação pessoal, me ensinando a ser justa e humana, e na minha formação profissional, com palavras e atitudes que sempre me demonstraram o carinho e o apoio desses dois profissionais e pais exemplares, neles me espelho para educar meu filho e educar-me primeiramente. Especialmente à minha querida mãe que nunca me deixou desistir dos meus sonhos e tem me ajudado tanto em oração. Assim também agradeço ao meu irmão Armando.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo por todo suporte, apoio técnico, financeiro, estrutural e aos professores que contribuem para que tantas pesquisas aconteçam.

Agradeço em especial ao meu orientador, Dr. Francisco de Paula Careta, pela confiança, apoio e ensinamentos, que muito acrescentou para meu crescimento profissional. Estendo também esses agradecimentos à minha coorientadora a Prof. (a). Dr. (a). Juliana Severi, mulher forte e determinada que inspira-me.

Ao Professor Dr. Marcos Santos Zanini, as Dr. (as). Mariana Drummond e Juliana Resende por permitirem a utilização de equipamentos necessários para o andamento do projeto.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios de Bioquímica, Produção Farmacêutica e Análises Clínicas, em especial à Sandra e Gerusa por toda amizade e serviços prestados.

Às amigas do laboratório de Cultivo celular, por todo o carinho e companheirismo, especialmente a Taysa, Bianca, e Vivian que mantiveram-se presente em todos os momentos, e seguirão em meu coração.

Agradeço em especial à Bianca por todo o conhecimento à mim repassado, com uma tranquilidade invejável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa.

Enfim, sou muito grata a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram em qualquer aspecto do meu experimento e percurso durante o mestrado

RESUMO

RIBEIRO, RHAIRA NAZARIO. **BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO RENISUS CONTRA PROMASTIGOTAS DE** *Leishmania* **spp**. 2019. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias, de caráter zoonótico, cujos protocolos terapêuticos adotados possuem altos índices de efeitos colaterais. O Brasil é um país com uma flora abundante, com recursos naturais que possuem grandes potenciais terapêuticos. Em 2002 criou-se o RENISUS, programa governamental que em parceira com instituições de pesquisa tem o objetivo de promover o embasamento técnico-cientifico para o uso de plantas medicinais. O estudo teve o objetivo de avaliar o efeito leishmanicida "*in vitro"* de plantas pertencentes ao RENISUS, sendo: *Morus nigra* L. (amoreira), *Anacardium occidentale* (cajueiro), *Pereskia aculeata* (ora-pro-nóbis), *Eugenia uniflora* (pitangueira), *Momordica charantia* (melão de São Caetano) e *Psidium guajava* (goiabeira) para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, bem como a toxicidade de cada um dos extratos avaliados sobre macrófagos. Foram realizados testes de viabilidade e citotoxicidade dos extratos, frente ambas as espécies de *Leishmania* spp. e a macrófagos (DH82) respectivamente. Os resultados foram determinados pelo método da resazurina e analisados estatisticamente por meio da ANOVA e Tukey. O extrato das folhas da Ora-pro-nóbis, obteve um IC_{50} de 33,78µg/mL, sendo o mesmo o que apresentou melhor potencial leishmanicida contra *L. infantum*. Todos os extratos testados foram inativos contra promastigotas da espécie *L. amazonensis* com IC_{50} superior a 250µg/mL. Contudo, os extratos apresentaram baixo índice de seletividade frente aos macrófagos testados.

Palavras-chave: Leishmaniose. Produtos naturais. Tratamento

ABSTRACT

RIBEIRO, RHAIRA NAZARIO. **BIOPROSPECTION OF RENISUS PLANTS EXTRACTS AGAINST PROMISTIGOTES OF** *Leishmania* **spp**. 2019. 74 p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences) - Center of Agrarian Sciences and Engineering - CCAE, Federal University of Espírito Santo, Alegre, ES, 2019.

*Leishmania*sis is a group of zoonotic infectious parasitic diseases whose adopted therapeutic protocols have high rates of side effects. Brazil is a country with an abundant flora, with natural resources that have great therapeutic potentials. In 2002 RENISUS was created, a government program that in partnership with research institutions aims to promote the technical-scientific basis for the use of medicinal plants. The objective of this study was to evaluate the in vitro leishmanicidal effect of plants belonging to RENISUS, namely: *Morus nigra* L. (mulberry), *Anacardium occidentale* (cashew), *Pereskia aculeata* (ora-pro-nobis), *Eugenia uniflora* (pitangueira), *Momordica charantia* (são caetano melon) and *Psidium guajava* (guava) for promastigote forms of *Leishmania* amazonensis and *Leishmania* infantum, as well as the toxicity of each extract evaluated on macrophages. Feasibility and cytotoxicity tests of the extracts were performed against both *Leishmania* spp. and macrophages (DH82) respectively. Results were determined by the resazurin method and statistically analyzed using ANOVA and Tukey. The extract of ora-pro-nóbis leaves obtained an IC50 of 33.78µg / mL, which presented the best leishmanicidal potential against *L. infantum*. All extracts tested were inactive against *L. amazonensis* promastigotes with IC50 greater than 250µg/mL. However, the extracts showed low selectivity index against the macrophages tested.

Key words: *Leishmania*sis. Natural products. Treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração do protozoário *Leishmania* spp. forma promastigota (A); forma amastigota (B). FONTE: Getty Images.....18

Figura 2- Ciclo de transmissão da leishmaniose. FONTE: SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002, adaptado.....21

Figura 3- Esquema ilustrativo dos procedimentos adotados para realização do ensaio de viabilidade das promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* tratadas com extratos de plantas do RENISUS. FONTE: O autor.....37

Figura 4- Esquema ilustrativo dos procedimentos adotados para realização do ensaio de citotoxicidade dos extratos testados em macrófagos DH82. FONTE: O autor.....40

Figura 5- Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FMN *(*folhas *Morus nigra*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. FONTE: O autor.....44

Figura 6- Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FAO *(*folhas *Anacardium occidentale*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. FONTE: O autor.....46

Figura 7- Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FEU (folhas *Eugenia uniflora*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. FONTE: O autor.....48

Figura 8- Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FPA (folhas *Pereskia aculeata*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. FONTE: O autor.....50

Figura 9- Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato EEM (folhas *Momordica charantia*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. FONTE: O autor.....53

Figura 10- Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FPG (folhas *Psidium guajava*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. FONTE: O autor.....54

Figura 11- Média da viabilidade de células de macrófagos DH82, após 48h de exposição aos extratos FMN *(folhas Morus nigra);* FAO *(Folhas Anacardium occidentale);* FPA *(folhas Pereskia aculeata);* FEU *(folhas Eugenia uniflora);* EEM *(partes aéreas Momordica charantida)* e FPG *(folhas Psidium guajava)*, mais os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), ANF (Anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}). As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. FONTE: O autor.....56

Figura 12- Média da viabilidade de células de macrófagos DH82, após 48h de exposição aos extratos EEM *(partes aéreas Momordica charantida)* e FPG *(folhas Psidium guajava)*, mais os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), ANF (Anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}). As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de significância. FONTE: O autor.....57

Figura 13- Valores de CC_{50} (µg/mL), dos extratos FMN (folhas *Morus nigra*); FAO (Folhas *Anacardium occidentale*); FPA (folhas *Pereskia aculeata*); FEU (folhas *Eugenia uniflora*); EEM (partes aéreas *Momordica charantida*) e FPG (folhas *Psidium guajava*), em macrófagos da linhagem DH82 obtidos por regressão não-linear. FONTE: O autor.....59

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

LV - Leishmaniose visceral

LC - Leishmaniose cutânea

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LD - Leishmaniose cutânea disseminada

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LPG - Lipofosfoglicanos

FMN – Extrato das folhas *Morus nigra* L.

FAO – Extrato das folhas *Anacardium occidentale*

FPA – Extrato das folhas *Pereskia aculeata*

FEU – Extrato das folhas *Eugenia uniflora*

FPG – Extrato das folhas *Psidium guajava*

EEM – Extrato das partes aéreas *Mormodica charantia*

CN - Controle negativo

CP - Controle positivo

ANF - Anfotericina B

SCHND- Schneider

DMEM - Dulbecco Mem

DMSO - Dimetilsulfóxido

IC_{50} - Concentração inibitória de 50% dos parasitas

CC_{50} - Concentração citotóxica para 50% das células

Sumário

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1 Leishmaniose 16
2.2 Leishmaniose Visceral 17
2.3 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) 17
2.4 *Leishmania* spp. o agente etiológico das leishmanioses 18
2.5 Ciclo biológico e aspectos clínicos da doença 19
2.6 Terapêutica das leishmanioses 22
2.6.1 Antimoniais 23
2.6.2 Pentamidina 24
2.6.3 Anfotericina B 25
2.6.4 Miltefosina 26
2.7 Produtos Naturais e o RENISUS 28
2.8 *Anacardium occidentale* L. 29
2.9 *Eugenia uniflora* 29
2.10 *Momordica charantia* 30
2.11 *Morus nigra L.* 30
2.12 *Psidium guajava* L. 31
2.13 *Pereskia aculeata* 32
3. MATERIAis E MÉTODOS 33
3.1 Preparo dos extratos 33
3.2 Preparo das soluções estoques 34
3.3 Preparo da solução estoque de anfotericina B 34
3.4 Cultivo e preparo da solução teste de promastigotas 35
3.5 Avaliação in vitro da bioprospecção dos produtos naturais com ação leismanicida para formas promastigotas das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* 36
3.6 Citotoxicidade dos extratos frente a Macrófagos DH82 38
3.7 Determinação da concentração inibitória e citotóxica (IC_{50} e CC_{50}) 41
3.8 Índice de seletividade 41
3.9 Análise estatística 41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
4.1 Atividade contra as formas promastigotas 42

4.1.2 Resultados dos ensaios de viabilidade e citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de Morus nigra L. (FMN) 43

4.1.3 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amozonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Anacardium occidentale* (FAO) 45

4.1.4 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Eugenia uniflora* (FEU) 47

4.1.5 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Pereskia aculeata* (FPA) 49

4.1.6 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Momordica charantia* (EEM) 52

4.1.7 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Psidium guajava* (FPG) 54

4.2 Viabilidade das células DH82 e teste de citotoxicidade (CC_{50}) 56

4.3 Índice de seletividade (IS) 60

5. CONCLUSÃO 62

6. REFERÊNCIAS 63

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma zoonose causada por protozoário do gênero *Leishmania,* da família Trypanosomatidae. Cujo principal vetor é a fêmea do mosquito flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* (MARCONDES, 2016). É uma infecção que causa grandes impactos na saúde pública de vários países, principalmente nos países subdesenvolvidos. A doença faz parte das seis endemias de maior relevância mundial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2011).

Em 2013 a infecção afetava cerca de 88 países, prejudicando em grande maioria a população mais carente, e associa-se a outros problemas do submundo, como a desnutrição e a deficiência imune. A falta de saneamento básico e o crescente desmatamento, fazem com que o seres humanos fiquem mais expostos aos riscos de contaminação pelo parasito, que por sua vez está cada dia mais perto das zonas urbanas (FIOCRUZ, 2013[b]; WHO, 2018).

O Brasil representa uma área endêmica. Há registros de casos da infecção em quase todos os estados brasileiros, aproximadamente 90% dos casos da doença na América Latina são registrados pelo Brasil (BRASIL, 2012; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MENDES, *et al*., 2016).

As leishmanioses são classificadas em dois grupos de acordo com os sinais clínicos: Leishmaniose Visceral, e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo a LTA dividida em cutânea, mucocutânea ou cutânea difusa. Essa divisão baseia-se no local de acometimento da infecção (MARCONDES, 2016). A doença pode causar lesões deformantes e incapacitantes quando na sua forma cutânea, e na sua forma visceral pode levar a óbito se não tratada corretamente (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARCONDES, 2016).

Os protocolos terapêuticos adotados para tratar as leishmanioses envolvem o uso dos antimoniais e antifúngicos. Porém, destacam-se os efeitos colaterais, que associam-se ao longo período de tratamento e acarreta em abandono prematuro do paciente ao tratamento. Por isso, há uma necessidade de tratamentos menos agressivos ao hospedeiro (ANDRADE-NETO, 2016; MAHMOUDVAND *et al*., 2015; MAYRINK *et al.*, 2006).

Uma alternativa antiga, mas cada vez mais utilizada e, que vem crescendo em termos de empregabilidade na medicina tradicional é o uso de produtos naturais para tratar doenças, principalmente as infecções negligenciadas. Pois, os custos associados aos produtos de origem natural geralmente são inferiores aos medicamentos alopáticos. Cerca de 80% da população mundial utiliza esses produtos como uma alternativa para otimizar a saúde, principalmente por não possuírem condições econômicas de arcar com os preços onerosos dos medicamentos alopáticos (NDJONKA *et al*., 2010; TELES *et al*., 2015).

Considerando o potencial da flora brasileira, o Brasil criou um projeto que tem como objetivo listar as plantas cujo potencial medicinal já foi descrito cientificamente, por meio de instituições de pesquisa, que são parceiras ao projeto. Assim surgiu a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), a lista começou a ser criada em fevereiro de 2009 e, até o momento possui 71 espécies de plantas cadastradas (BRASIL, 2019).

O objetivo do presente trabalho foi realizar a avaliação *in vitro, d*os efeitos leishmanicida dos extratos etanólicos das folhas ou partes aéreas de seis espécies de plantas listadas no RENISUS, sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, bem como sua toxicidade para as célula de mamífero (macrófagos DH82). Entre as 71 plantas pertencentes à lista, as selecionadas para o teste foram: amoreira (*Morus nigra* **L**.)*,* cajueiro (*Anacardium occidentale* **L**.)*,* melão de são caetano (*Momordica charantia),* goiabeira *(Psidium guajava),* ora-pro-nóbis *(Pereskia aculeata)* e pitangueira *(Eugenia uniflora).*

A seleção dos extratos a serem utilizados nos testes de viabilidade e citotoxicidade, partiu de uma extensa revisão bibliográfica, onde investigou-se características das plantas que já tiveram seu potencial leishmanicida registrado cientificamente. Não era de interesse testar extratos de plantas que já haviam sido estudados, então por meio, das características em comum dessas plantas com outras, que estavam disponíveis em forma de extrato para serem testados na instituição de ensina em questão e que pertencessem ao RENISUS, foi possível determinar as seis plantas citadas acima.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

Caracterizam-se por Leishmaniose um grupo de infecções de pele, mucosas e órgãos, que ocorrem de forma endêmico-epidêmica com vários padrões de transmissão (FIOCRUZ, 2013 b). Considerada uma infecção de caráter parasitária classificada como uma zoonose, de caráter crônico, com um período de incubação extenso, que varia de 2 a 12 meses (KRAUSPENHAR *et al*., 2007).

Os parasitos causadores desse tipo de infecção destacam-se na colonização de animais silvestres e acidentalmente os animais domésticos e o Homem, sendo o cão considerado o principal reservatório urbano (FURTADO, 1994; NEUBER, 2008).

As leishmanioses estão classificadas em quatro grupos, de acordo, com a forma clínica da infecção: Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose cutânea localizada (LCL), Leishmaniose cutânea difusa (LCD) e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (MARCONDES, 2016).

São conhecidas cerca de 53 espécies de *Leishmania* spp*.,* 20 dessas espécies são capazes de causar à infecção em humanos. Morfologicamente, todas as espécies são similares, só é possível a identificação formal da espécie através de análises bioquímicas e moleculares (BARRAL; COSTA, 2011; MORAIS, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), as leishmanioses integram o conjunto das seis doenças tropicais mais preocupantes no Velho Mundo e Américas, e constituem um crescente problema de saúde pública. No Brasil, é considerada uma das endemias de interesse prioritário, como em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano. 700.000 mil novos casos da infecção surgem anualmente em todo o mundo (WHO,2018).

2.2 Leishmaniose Visceral

Causada por *L. donovani* e *L. infantum/chagasi*, conhecida popularmente por Calazar, acomete regiões da Europa, América do Sul e Central, Bacia do Mediterrâneo e Ásia (WHO, 2018).

Em 2015 o Brasil encontrava-se entre os seis países que mais se destacavam quanto ao número de casos desse tipo de infecção, juntamente com o Afeganistão, Argélia e a Colômbia, entre outros, eram os responsáveis por 90% dos casos notificados de LV em todo o mundo (PEARSON, 2014; WHO, 2018).

Na Índia e África oriental, são registrados anualmente cerca de 50.000 e 90.000 mil novos casos respectivamente de Leishmaniose Visceral (COGOA *et al*., 2018; FIOCRUZ, 2014).

A infecção apresenta-se por quadros irregulares de febre, desnutrição, aumento de órgãos (fígado e baço) e anemia. A LV é a infecção causada por *Leishmania* spp. mais importante e a mais preocupante, pois, é a responsável por cerca de 95% dos casos de óbitos por leishmanioses (WHO, 2018).

2.3 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Trata-se de infecções que acometem a pele (Leishmaniose cutânea) e as mucosas (Leishmaniose mucocutânea), não sendo uma infecção de caráter contagioso (BRASIL, 2017).

No Brasil, o acometimento cutâneo pode ser causado por 14 espécies de *Leishmania* spp. dessas, a espécie *Leishmania (L) amazonensis* (LAINSON, 2010), e *Leishmania (V) braziliensis* (LLANOS-CUENTAS, 1984; LAINSON, 1993), são as que mais causam impactos no país.

A Leishmaniose Cutânea é caracterizada por nódulos ou pápulas que evoluem para úlceras na pele, formadas no local da picada do inseto vetor da doença (BARRATT *et al*., 2010; WHO, 2016). A úlcera é indolor, possuem formato arredondado ou ovalado, podem ser única ou diversas (Leishmaniose Cutânea Difusa). Cerca de 5% dos casos de LC evoluem para Leishmaniose mucocutânea. Essa forma de infecção se expressa por lesões destrutivas

localizadas nas mucosas, acomete principalmente as vias aéreas superiores. Acredita-se que a forma mucocutânea surge por meio de disseminação hematogênica ou linfática do parasito (BRASIL, 2010).

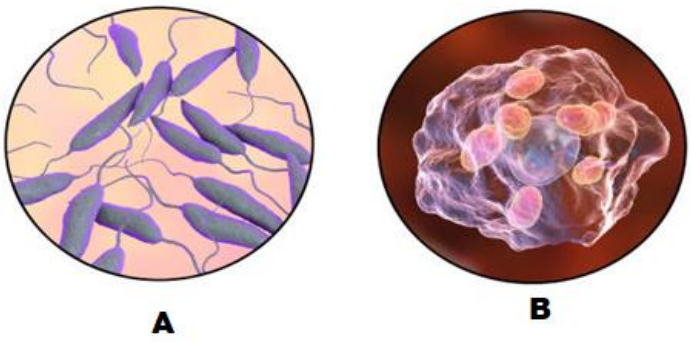
Nos cães, essas úlceras cutâneas sugestivas comumente são limitadas a uma (LCL) ou múltiplas lesões de forma disseminada (LCD), que evoluem causando vermelhidão e secreção, essa evolução é típica de contaminação secundaria, bacteriana ou fúngica, as lesões em caninos são geralmente distribuídas nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal (BRASIL, 2010).

2.4 *Leishmania* **spp. o agente etiológico das leishmanioses**

O gênero *Leishmania* compreende protozoários com um ciclo de vida digenético (heteroxênico) e dimórficos, vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e invertebrados, nas formas amastigota e promastigota respectivamente (CAROSELLI, 2012).

As formas promastigotas são formas alongadas, flageladas, com cerca de 30µm de comprimento e são encontradas nos hospedeiros invertebrados. As formas amastigotas são formas arredondadas, com aproximadamente 10 µm de diâmetros, são encontradas nos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (MONTEIRO, 2011; SILVA, 2008).

Figura 1 - Ilustração do protozoário *Leishmania* spp. forma promastigota (A); forma amastigota (B).



FONTE: Getty Images.

No final do século XIX, Cunningham, na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de calazar, foi o primeiro registro desse tipo de microorganismo. Ross em 1903 identificou os microorganismos isolados em um novo gênero, o gênero *Leishmania.* Assim, o nome correto do agente etiológico do calazar ficou sendo *Leishmania donovani* (FIOCRUZ, 2007).

No continente americano em 1909, Gaspar Vianna, no Instituto Oswaldo Cruz correlacionou parasitos presentes em lesões de pacientes acometidos pela infecção de caráter cutâneo, como um protozoário do gênero *Leishmania*, dando-lhe o nome de *Leishmania (V) braziliensis* (FIOCRUZ, 2007).

2.5 Ciclo biológico e aspectos clínicos da doença

O gênero *Leishmania* compreende protozoários com ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo os últimos os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero ao outro (CAROSELLI, 2012). Esses vetores são fêmeas de insetos hematófagos, dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phebotominae*, conhecidos genericamente por flebotomíneos (BRASIL, 2010).

São mosquitos de hábitos noturnos, preferencialmente das 17 horas ás 5 horas da manhã, e nas áreas urbanas preferem o período crepuscular, realizam oviposição em áreas úmidas e com acumulo de matéria orgânica (ARTACHO, 2009; BRASIL, 2010).

O ciclo da leishmaniose começa no momento após o repasto sanguíneo realizado pela fêmea do mosquito “palha”, que ingere macrófagos de mamíferos infectados com a forma amastigota do parasito. Após a ingestão dos macrófagos é liberado no intestino médio dos flebotomíneos as formas amastigotas do parasito, que irão transforma-se em promastigota procíclica proliferativa nessa mesma região do organismo do inseto (WILSON *et al*., 2010).

Promastigotas procíclicas possuem características que ajudam o parasito a manter-se dentro do organismo hospedeiro, por meio da capacidade de aderir-se às microvilosidades do epitélio intestinal, impedindo a sua excreção pelas

fezes. Por meio de divisão binária multiplicam-se rapidamente na região (PETERS *et al*., 2008; SACKS; KAMHAWI, 2001).

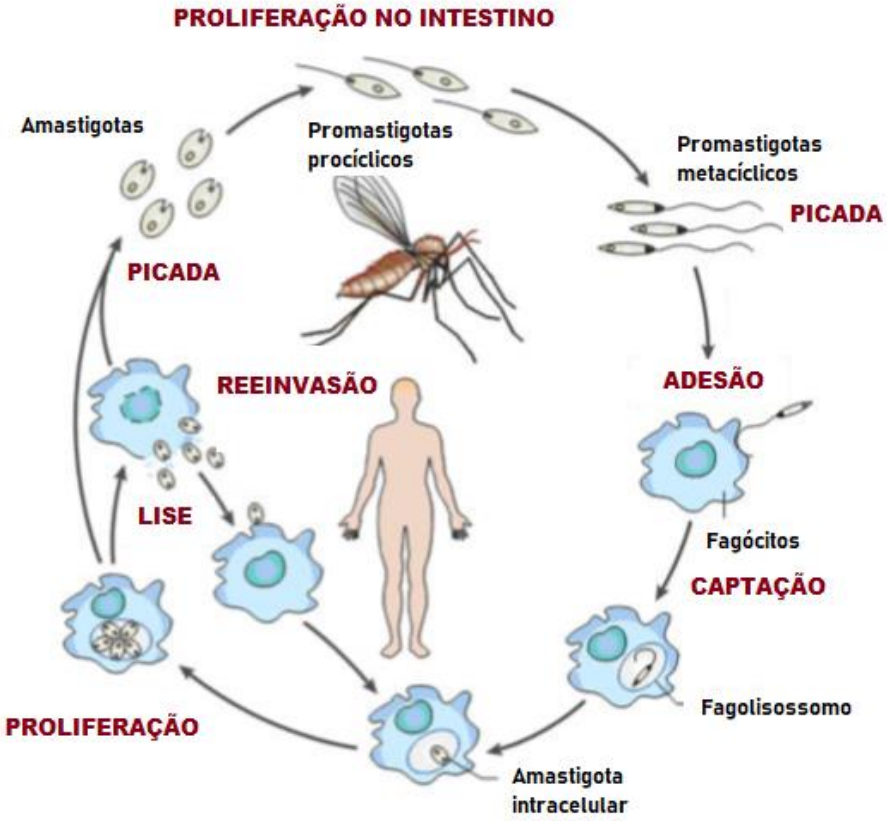
O próximo processo importante para o ciclo da doença acontece por volta do sétimo dia até o décimo dia após o repasto, trata-se de um processo chamado de metaciclogênese, onde as promastigotas procíclicas passam por mudanças morfológicas e fisiológicas, e parte dessa população se diferencia em formas metacíclicas. As promastigotas metacíclicas, desprendem-se das microvilosidades do intestino do inseto (PIMENTA; TURCO, 1992; PETERS *et al*., 2008). Na forma metacíclica, os parasitos migram até uma região da cabeça do inseto chamada de probóscide, e ali ficam até o vetor realizar outro repasto sanguíneo e inocular a forma promastigota metacíclica em um hospedeiro vertebrado (LAINSON *et al.*, 1990).

Após a inoculação nos mamíferos as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos. Estas células do sistema imune secretam quimiocinas, substâncias responsáveis por recrutar novas células, incluindo os macrófagos, que irão fagocitar outras promastigotas (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Na estrutura celular da membrana dos parasitos há estruturas que irão auxiliar o mesmo a aderir-se aos macrófagos: os lipofosfoglicanos (LPG) e glicoproteínas chamadas de leishmanolisina, são duas, das principais estruturas presentes nas promastigotas que auxiliam no momento de fagocitose, elas interagem com dois componentes da membrana dos macrófagos C_3b e C_3bi, os receptores CR1 e CR3, também se encontram nas superfícies das células imunes, quando as promastigotas penetram por meio desses canais a internalização acontece sem que uma explosão oxidativa aconteça junto a endocitose. Passando o processo de endocitose das promastigotas, os vacúolos parasitóforos logo se ligam aos lisossomos, originando os fagolisossomos (Da SILVA *et al*., 1989; WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983).

Devido a diversos mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro, os parasitas mantêm-se resistentes ao ambiente hostil, e as formas metacíclicas se transformam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária até que rompem a célula hospedeira e são fagocitadas por outros macrófagos, o ciclo se completa quando macrófagos parasitados por amastigotas são ingeridos por vetores invertebrados em um novo repasto sanguíneo (PETERS *et al*., 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo de transmissão da leishmaniose.



FONTE: SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002, adaptado.

A infecção em cães e humanos são clinicamente semelhantes, principalmente devido ao ciclo da doença ser o mesmo em ambas as espécies (KRAUSPENHAR *et al*., 2007).

Durante o repasto sanguíneo, a saliva do vetor atua como um agente vasodilatador, que ativa a resposta imune local. Assim, a penetração das promastigotas na pele gera um processo inflamatório local, caracterizando a lesão cutânea (MARCONDES, 2016). A maior parte das promastigotas inoculadas são destruídas, por meio da ação do sistema complemento que promove lise celular (MOSSER, 1984; MOSSER *et al*., 1986). Porém, alguns parasitos resistem à ação lítica do complemento, os que resistirem se aderem a receptores de membranas nos macrófagos, que possuem em sua superfície moléculas que são conhecidas como ligantes do parasito, que permitem que rapidamente os macrófagos sejam ativados e promovam a fagocitose do parasito (PIMENTA *et al*., 1989; CHANNON *et al*., 1984).

No vacúolo parasitóforo o parasito passa da forma promastigota metacíclica para amastigota, e após a fusão desses vacúolos á grânulos lisossomais, são formados os fagolisossomos, onde as formas amastigotas deverão se multiplicar (MURRAY, 1981).

Dentro dos macrófagos, as formas amastigotas de *Leishmania* promovem a inibição da resposta imune à infecção, por meio da desregulação de diversos mecanismos, principalmente devido a presença das LPG em sua membrana celular, que permite uma modulação da resposta imune por meio da presença do parasito no macrófago, tornando-o resistente ao estresse oxidativo e, a outros mecanismos de defesa, como os responsáveis pela lise das células contaminadas, tais como fusão do fagolisossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

Na leishmaniose visceral os sinais clínicos da infecção surgem devido a disseminação, por meio das vias hematógena e linfática dos macrófagos infectados que conseguiram escapar da resposta imune, para tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (MARCONDES, 2016).

2.6 **Terapêutica das leishmanioses**

As drogas utilizadas para tratar as leishmanioses em humanos atualmente no Brasil, são: o antimoniato de N-metil glucamina, a anfotericina B, e a pentamidina (BRASIL, 2010). A problemática dos protocolos terapêuticos atuais contra as leishmanioses não está relacionada apenas com a quantidade de drogas disponíveis, destaca-se, os elevados índices de efeitos adversos, como, a alta toxicidade renal e cardíaca e, a via de administração invasiva, que diminuem a aceitação do paciente ao tratamento. Os medicamentos de segunda escolha para tratar as infecções por *Leishmania* spp., é a pentamidina, e a anfotericina B, são menos utilizados devido à alta toxicidade e ao alto custo. Uma alternativa adotada para diminuir os efeitos colaterais e aumentar a disponibilidade da anfotericina B é a sua incorporação na forma lipossomal, que

contribui para o elevado custo da formulação (BARBOSA *et al*., 2011; PLANO *et al*., 2011).

Todas as opções disponíveis para tratar as leishmanioses em humanos no Brasil são administradas por via parenteral (SINGH; SUNDAR, 2012). A miltefosina é a droga utilizada para o tratamento da leishmaniose canina no país, é a única droga oral que combate o parasito (SUNDAR *et al*., 2005).

As opções de tratamentos contra a leishmaniose existentes até o momento podem ser consideradas limitadas, pois, associa-se a sérios efeitos colaterais e períodos de tratamento longos. Há uma necessidade de drogas com potencial leishmanicida que possam ser administradas por via oral e com menores índices de efeitos colaterais, principalmente para tratamento em humanos no Brasil (TARIQ; SOMAKALA; AMIR, 2017; TRISTÁN-MANZANO *et al*., 2015).

Não há imunização contra a infecção em humanos, então, o combate a leishmaniose para a espécie fica restrita à uma terapia eficaz dos hospedeiros infectados, e demais métodos de controle ao parasito (BARRETT; CROFT, 2012).

2.6.1 **Antimoniais**

A aproximadamente 60 anos o tratamento da LV é realizado com o antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime® e o estibogluconato de sódio-Pentostan® como drogas de primeira escolha. Mas, esses medicamentos possuem algumas limitações e estão associadas à perigosos efeitos adversos, e graus de eficácia distintos contra o mesmo parasito em dose constante (IQBAL, 2016). No Brasil as leishmanioses em humanos são tratadas primeiramente com algum tipo de antimonial. Os mais consumidos mundialmente é o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de N- metil glucamina (Glucantime®) (SERENO *et al*., 2000; SEIFERT, 2011).

Essa classe de compostos é administrada via intravenosa ou intramuscular de forma lenta na tentativa de evitar efeitos colaterais, dentre eles, o mais comum, a trombose (WHO, 2010). Além do alto risco de trombose devido a infusão, possuem alta taxa de cardiotoxicidade (OLLIARO *et al*., 2005). Os

efeitos adversos mais relatados incluem náusea, dor abdominal, mialgia, inflamação pancreática, arritmia cardíaca e hepatite (OLIVEIRA, 2011). Neves e colaboradores (2012) relatam agravamento no quadro clínico de paciente cardiopatas com os uso dos antimoniais, essa droga interage com fármacos antiarrítmicos e betabloqueadores, causando alterações na repolarização ventricular.

A meia vida plasmática é de apenas 2 horas para o antimoniato, e de 76 horas para o estibogluconato. O tempo de duração do tratamento pode chegar a 28 dias (SEIFERT, 2011).

Sundar e Chatterjee (2006) relata falta de resposta relacionada ao uso dos antimoniais. De acordo com o autor, mais de 60% dos pacientes no norte de Bihar, na Índia, não responderam ao tratamento.

O regime de administração, associado ao prolongado tempo do tratamento, juntamente com efeitos colaterais fortes, contribuem para o abandono prematuro do tratamento (BALAÑA-FOUCE *et al*., 1998; BERMAN; WYLER, 1980).

2.6.2 **Pentamidina**

Quando os antimoniais não são efetivos no tratamento da infecção, drogas de segunda escolha como a pentamidina e a anfotericina B são utilizadas em humanos (BRASIL, 2010).

A pentamidina foi sintetizada no início do século passado como um fármaco antiglicêmico, sendo posteriormente descoberta a sua atividade antiprotozoária e utilizada pela primeira vez no tratamento da LV em 1940 (BALAÑA-FOUCE, 1998).

Assim como os antimoniais a pentamidina também possui um esquema terapêutico muito limitado e com grandes chances de abandono prematuro pelo paciente, a administração da droga é feita preferencialmente por infusão intravenosa, no período de 3 a 4 semanas, por até 4 meses (SEIFERT, 2011).

Os efeitos adversos mais comuns são dores de cabeça, náuseas, dores musculares e, menos frequentemente, dormência e hipotensão (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006).

Na Índia a utilização do medicamento foi fortemente relacionada à indução de diabetes mellitus insulinodependente, o que levou à redução do seu uso na terapia da LV (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006).

2.6.3 **Anfotericina B**

A partir de culturas de *Streptomyces nodosus* em 1995 o antibiótico poliênico, chamado de anfotericina B foi isolado pela primeira vez (SEIFERT, 2011). Trata-se de uma substância muito lipofílica, ou seja, possui baixa solubilidade em água, acarretando em baixa permeabilidade pelas membranas, enquadrando-se na classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), sendo assim, uma substância com biodisponibilidade oral prejudicada. Devido às características descritas do fármaco, sua administração é pela via intravenosa, lentamente, devido ao alto risco de reações à perfusão (CHAPPUIS *et al*., 2007; AMIDON *et al*., 1995).

A anfotericina B é uma substância hidrofóbica, com alta afinidade pelo ergosterol presente na parede celular de *leishmanias* spp*.*, o que torna o fármaco mais seletivo ao parasito, do que ao humano (NAKAGAYA *et al*., 2016). O fármaco age alterando a permeabilidade da membrana do parasito, há perda de íons celulares, devido aos poros transmembrana formados pela interação da anfotericina B com a membrana (NO, 2016).

Os efeitos colaterais oriundos do uso da anfotericina B. são inúmeros, destaca-se, cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão (ARRUDA *et al*., 2016; BRASIL, 2011). O efeito adverso mais preocupante é o alto risco de nefrotoxicidade, mas, também podem surgir hipocalemia e anafilaxia (CHAPPUIS *et al*., 2007; JOLY *et al*., 1992).

As formulações lipossomais apresenta uma alternativa, que diminui os efeitos adversos citados e possibilita à administração de doses mais altas, entretanto, essa alternativa aumenta consideravelmente o custo do tratamento (PURKAIT *et al*., 2012).

O protocolo de tratamento com a anfotericina B para leishmaniose varia de acordo com a forma clínica da infecção, cutânea ou mucosa, e com o tipo de formulação, lipossomal ou desoxicolato. O tratamento com a Anf. B na forma

lipossomal para a leishmaniose cutânea utiliza-se de 1 a 1,5g de substância, sendo essa dose distribuída em 1 a 4mg/kg/dia. Para um paciente de 65kg aproximadamente o tratamento com a dosagem mínima estipulada (1g), levaria cerca de 38 dias. Para tratar a infecção nas mucosas, administra-se de 2,5 a 3g de anfotericina B lipossomal, distribuídas da mesma forma para a cutânea, então, um paciente de 65 kg com leishmaniose mucocutânea, leva no mínimo 96 dias para concluir o tratamento (BRASIL, 2010).

2.6.4 **Miltefosina**

Em 1980 a miltefosina teve sua atividade antiprotozoária contra a espécie *Leishmania donovani* relatada (GUERIN *et al*., 2002). É o primeiro e único fármaco utilizado por via oral na terapia da leishmaniose. Em 2002 esse medicamento foi registrado para o tratamento de LV na Índia (BERMAN, 2005). O tratamento dura cerca de 28 dias, não é indicado para gestantes. As manifestações clinicas mais comuns relacionadas ao uso da droga são: distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal, que levam o paciente ao abandono prematura do tratamento, aumentando assim os casos de resistência parasitária (SUNDAR; MURRAY, 2005; WHO, 2010). Nos estudos em animais foi observado efeito teratogênico (SINDERMANN; ENGEL, 2006).

A miltefosina atua na função mitocondrial por meio da despolarização do potencial de membrana e inibição do complexo de enzimas da citocromo c Oxidase, que consequentemente levaria à morte do parasito por apoptose (ZUO *et al*., 2011).

Estudos realizados em 2008, por um grupo de pesquisadores na Índia, mostrou que apesar da miltefosina ter uma boa farmacocinética e um tempo de permanência na corrente sanguínea relativamente alta, pacientes que foram tratados por 28 dias com esse fármaco apresentaram presença do parasito na circulação sanguínea seis meses após o término do tratamento (DORLO *et al*., 2008). A meia vida plasmática longa da miltefosina (150 horas) pode ocasionar desenvolvimento de resistência pelos parasitas (BRUNTON *et al*., 2012).

Em 2008 no Brasil, o Ministério da Saúde através de uma portaria proibiu o tratamento de animais com medicamentos humanos ou medicamentos não

registrados no Ministério da Pecuária e Abastecimento (MAPA), devido ao risco de seleção de parasitos resistentes, e desde então o serviço público brasileiro utilizava a eutanásia como método de controle em cães sorologicamente positivos (AMARAL, 2009). Em citação a “PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008” - “Proíbe o tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Em setembro de 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde, foi autorizado o registro do produto Milteforan® (miltefosina), indicado para o tratamento da leishmaniose canina (MAPA, 2016).

Mesmo sendo o tratamento padrão para leishmaniose canina no Brasil, a droga não apresenta atividade contra *L. (v) braziliensis*, a principal causadora da LTA no país. O estudo foi realizado com pacientes acima de 12 anos com Leishmaniose cutânea, na Colômbia e na Guatemala. De acordo com os autores, a miltefosina foi um agente oral útil contra a leishmaniose cutânea causada por *L. panamensis* na Colômbia, mas não contra a leishmaniose causada *por L. (v) braziliensis* na Guatemala (SOTO *et al*., 2004).

Atualmente, o protocolo mais utilizado para tratar os animais, consiste na utilização de um leishmaniostático como o alopurinol, para cessar a multiplicação do protozoário, a utilização de um leishmanicida (o único permitido no país até o momento é a miltefosina), para diminuir a carga parasitária do protozoário, e um imunomodulador como a marbofloxacina e vitaminas para aumentar a imunidade do hospedeiro (o que leva a diminuição dos sinais clínicos e evita infecções secundárias) (NOGUEIRA, 2015).

O protocolo adotado leva ao desaparecimento dos sinais clínicos da infecção, Em contrapartida, não há relatos de erradicação do parasito da corrente sanguínea (LEAL, 2017). Então, mesmo após o cão apresentar a cura clínica, métodos de controle devem ser utilizados, como: coleiras e *pour-on,* uma vez que o animal continua sendo reservatório do parasito (OTRANTO e DANTAS-TORRES, 2013). Na tabela 01 é possível entender resumidamente os fármacos utilizados na terapêutica da leishmaniose, juntamente com os esquemas terapêuticos e respectivos efeitos.

TABELA 01 - Informações relevantes sobre os fármacos utilizados na terapêutica das leishmanioses atualmente IV (intravenosa), IM (intramuscular) e GI (gastrointestinais).

Fármacos	Via de Administração	Duração do Tratamento	Efeitos Adversos
ANTIMONAIS	IV; IM com infusão lenta	28 dias	Náuseas, dores abdominais, mialgia, pancreatite, arritmia cardíaca e hapatite
PENTAMIDINA	IV	3-4 semanas, durante 4 meses	Náuseas, dores na cabeça, musculares, dormência e hipotensão
ANFOTERICINA B (Única opção de tratamento para gestantes)	IV com infusão lenta	Varia de acordo com os sinais clínicos da infecção e com o peso do paciente, em geral dura de 38 a 96 dias	Nefrotoxicidade, hipocalemia e anafilaxia
MILTEFOSINA	Oral	28 dias	Distúrbios GI e toxicidade renal

FONTE: adaptado (BRASIL, 2010).

2.7 Produtos Naturais e o RENISUS

Atualmente estima-se que cerca de 40% dos fármacos são obtidos por meio de fontes vegetais, apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica e biologia molecular, o uso de plantas na terapêutica não perdeu seu espaço. São utilizadas como matéria prima, ou por meio de derivados semissintéticos provenientes de produtos vegetais ou substâncias sintéticas que possuem que são protótipos de substâncias vegetais (SIMÕES *et al*., 2010).

O uso de produtos naturais traz vantagens econômicas e ambientais, pois, é uma fonte renovável, acessível, de baixo custo e não causam impactos ambientais (CALIXTO *et al*., 2001).

No final da década de 70, a Organização Mundial de Saúde começou a apoiar o uso de produtos naturais, principalmente, devido as vantagens econômicos, que permitem aumentar a cobertura da atenção primária à saúde. No Brasil, o governo vem desde a década de 90 estruturando políticas que incentivam à utilização racional de plantas medicinais e às pesquisas

relacionadas aos fitoterápicos, baseado no fato do país deter cerca de 20% da biodiversidade mundial (BRASIL, 2006).

O RENISUS, é a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS), é um programa governamental que desde 2009 em parceria com entidades de pesquisas, vem incentivando e financiando os estudos e pesquisas que envolvem as plantas medicinais. Espera-se que o projeto fortaleça o estudo e o uso das plantas medicinais nativas do país. Contribuindo para a assistência farmacêutica, por meio, da disponibilidade de informações técnico-científicas suficientes para o uso seguro das plantas na medicina. Foram investidos 2.010.226,00 de reais até o momento nos projetos pertencentes ao Programa (BRASIL, 2019).

2.8 *Anacardium occidentale* **L**.

A planta *Anacardium occidentale* L. ou cajueiro, como é conhecido popularmente, é uma planta tropical, da família Anacardiaceae nativa do Brasil a região Nordeste, destaca-se no cultivo da espécie, com uma área plantada que corresponde a 95% da produção do país. O caju é o fruto dessa cultivar, trata-se de uma fruta rica em compostos fenólicos (EMBRAPA, 2003).

Em estudos realizados na polpa e na pele do fruto, observou-se a presença de fenóis monoméricos (polpa) e de flavonoides glicosídicos na pele (miricetina, quercitina, pentosídios e ramnosíidos). Os extratos provenientes dos frutos e das hastes dos caules do cajueiro, possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória já estudada (MICHODJEHOUN-MESTRES *et al*., 2009). As folhas e as hastes também são utilizadas na medicina no tratamento de eczemas, bronquite, tosse e disfunções gastrointestinais (FRANCA *et al*., 1993; OJEWOLE, 2004; SOKENG *et al*., 2001).

2.9 *Eugenia uniflora*

A planta *Eugenia uniflora*, popularmente chamada de pitangueira no Brasil, pertence à família Myrtaceae, é uma planta nativa do pais, encontrada entre os estados da Bahia e o Rio Grande do Sul. A parte da planta com maior interesse

farmacológico são as folhas, utilizadas de diversas formas: secas, frescas, em forma de brotos ou ainda jovens (HOLETZ, 2002; SHARMA, 2006). Devido ao seu potencial como um antioxidante a *E. uniflora* chamou a atenção dos pesquisadores e tem sido alvo de muitos estudos (VELAZQUEZ *et al*., 2003), também há relatos de estudos envolvendo essa planta com efeito hipotensivo (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002), fotossensibilizador e potencializador de antibiótico (COUTINHO *et al*., 2010a; 2010b). Há estudos que apontam o emprego da *E. uniflora* como agonista do efeito de antibióticos, potencializando os efeitos antimicrobianos (COUTINHO, 2010b).

2.10 *Momordica charantia*

A planta *Momordica charantia* ou melão de são caetano, como é conhecido popurlamente no Brasil, pertence à família *Cucurbitaceae*. Trata-se de uma trepadeira de clima tropical nativa da Ásia e África, porem com plena adaptação ao clima brasileiro (ALZUGARAY, 1983; ZURLO; MITZI, 1989). Assim como *E. uniflora*, *M. charantia*, ganhou interesse de estudo devido ao seu potencial antioxidante (COUTINHO *et al*., 2010b), destaca-se também devido a sua atividade como antimicrobiano (ROOPASHREE *et al*., 2008; FARIA *et al*., 2009), antidiabético, antilipêmico (FERNANDES *et al*., 2007), imunomodulador e antiinflamatório (JUVEKAR *et al*., 2009; UMUKORO; ASHOROBI, 2006).

2.11 *Morus nigra* ***L.***

A planta *Morus nigra* L., conhecida como amoreira, pertence à família *Moraceae*. Os frutos da cultivar destaca-se pela cor escura, conhecido por amora, é rico em compostos fenólicos, como os flavonóides, antocianinas e carotenóides (KOSTIC *et al*., 2013). Por conta da grande quantidade de antocianina, os frutos de dessa espécie de planta destacam-se por sua atividade antioxidante (OZGEN *et al.*, 2009; KOSTIC *et al*., 2013).

Estudos com *Morus nigra* L. tem mostrado o grande potencial antimicrobiano, antioxidante, antidiabético, anti-HIV, antiinflamatório,

hepatoprotetor anticancerígeno, das espécies pertencentes ao gênero *Morus* (GRAJEK *et al*., 2015; KHALID *et al.,* 2011; KOSTIC *et al*., 2013; SAKAGAMI *et al*., 2007; RAMESH *et al*., 2014).

Atualmente na medicinal tradicional a espécie M. *nigra* L.*,* é utilizada como opção de tratamento em casos de incontinência urinária, tontura, dor de garganta, depressão, febre e câncer (KHALID *et al*., 2011; KOSTIC *et al.,* 2013). O extrato das folhas de amoreira demonstrou ter atividade citotóxica em células do câncer cervical humano (HeLa) (QADIR *et al*., 2014).

2.12 *Psidium guajava* **L***.*

A planta *Psidium guajava* L., ou goiabeira como é conhecida popularmente, é uma espécie da família *Myrtaceae*, nativa do México, costas brasileiras, Colômbia e Peru (POMMER *et al*., 2006).

A fruta da goiabeira é rica em compostos antioxidantes e possui quantidades regulares de ácidos, açúcares e pectinas e entre os compostos fenólicos, sendo os mais relatos e importantes os taninos, os flavonóides, óleos essenciais, álcoois, e sesquiterpenoides (NASCIMENTO, 2010). Porém, na medicina popular o uso dessa planta destaca-se, por meio, de chás, bocejos e gargarejos oriundos de partes que vão desde as folhas (brotos), até as cascas do caule e até mesmo o fruto maduro. Desde então, pode-se destacar a presença bioquímica dos compostos como mucilagens (ROZANE *et al*., 2000).

O teor de flavonóides presentes no extrato das folhas possui grande atividade antibacteriana, já as propriedades antidiarréicas do extrato estão ligada ao teor de quercetina presente nas folhas, esse flavonoide tem a capacidade de relaxar o músculo liso intestinal e inibir as contrações intestinais (JOSEPH; PRIYA, 2011).

Em um estudo realizado por Joseph e Priya em 2011, o extrato das folhas da goiabeira mostrou atividade antiproliferativa *in vitro* utilizando células de leucemia superior à da Vincristina. Sabe-se que o extrato da folha da goiabeira é muito eficaz na terapêutica de muitas doenças, porém, ainda não há relatos na literatura, de um mecanismo de ação dos compostos presentes na folha dessa planta. As propriedades medicinais da goiabeira correlaciona-se a seus

compostos polifenólicos como: os ácidos protocatecúico, ferúlico, ascórbico, gálico e caféico e a quercetina (DENNY *et al*., 2013).

2.13 *Pereskia aculeata*

Popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, trepadeira-limão e groselha-de-barbados, trata-se de uma trepadeira semilenhosa, podendo chegar a 10 metros de altura, possui longos ramos e folhas elípticas e carnosas com espinhos nas axilares (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1988; LORENZI; SOUZA, 1995; MANKE, 1998). Entre as plantas pertencentes à família *Cactaceae*. A trepadeira destaca-se pela preservação das características primitivas da família em questão. É uma planta nativa da América do Sul, no Brasil, encontra-se em predominância nas baixas altitudes de nordeste ao sul.

Na medicina popular, as folhas de *P. aculeata* são utilizadas na cicatrização de feridas cutâneas e no tratamento da inflamação, devido ao seu elevado conteúdo mucilaginoso e capacidade emoliente (SHARIF *et al*., 2013; PINTO; SCIO, 2014). Apenas uma pequena informação está disponível na literatura sobre as atividades biológicas de *P. aculeata*. Os compostos fenólicos são os principais componentes antioxidantes nas folhas de *P. aculeata*. Sitosterol, estigmasterol, flavonóides e os fenóis são relatados como estando nas folhas de *P. aculeata* (SHARIF *et al*., 2013). Na literatura pesquisada não há relatados de estudos envolvendo produto isolados das folhas de *P. aculeata*. O extrato bruto a base de acetato de etila, proveniente da espécie *P. grandifolia*, apresentou atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa, S. aureus* e *B. subtilis*. Os extratos metanólicos e etanólicos de *P. bleo* foram efetivos contra *P. aeruginosa* e, o extrato etanólico também foi ativo contra *B. subtilis* (PHILIP *et al*., 2009).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo dos extratos

Os extratos utilizados nos ensaios foram preparados no Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da UFES em Alegre-ES (CCENS/UFES) encontram-se armazenados no Laboratório de Produção Farmacêutica, sob os cuidados da Professora Doutora Juliana Severi.

O preparo do material vegetal ocorreu de forma semelhante para todas as espécies utilizadas. Resumidamente, procedeu-se a coleta do material vegetal adulto em ambiente nativo, no período da manhã. A porção fértil das plantas foram separadas para o preparo das exsicatas, para enfim serem depositadas em um herbário para a documentação das mesmas.

A parte do material vegetal reservada para o preparo do extrato foi manualmente separada de interferentes e após a separação, foi inspecionado a integridade das partes coletadas (folhas e partes aéreas). A higienização foi feita com água corrente. Procedeu-se a secagem a 45ºC em estufa com circulação forçada de ar. A moagem foi realizada por meio de moinhos de facas, com malha de 0,5mm, a fim de obter um pó fino para realizar a extração.

A extração foi feita por meio de maceração em álcool etílico. A mistura foi mantida em ambiente fechado por três dias, com agitação ocasional e não foi realizada troca do liquido extrator durante esse processo. Após a extração a mistura foi filtrada em papel filtro e, o resíduo vegetal foi remacerado por mais duas vezes seguindo os passos anteriores. A solução extrativa obtida após três macerações, foi submetida ao rotaevaporador, com temperatura abaixo de 45ºC, até a secagem total dos extratos. O extrato foi transferido para recipientes de vidros e liofilizados. Assim, obteve-se um extrato total bruto seco das plantas utilizadas para os ensaios. Na tabela 02 consta as principais informações sobre os extratos utilizados.

Tabela 02 - Principais informações (sigla; espécie; nome popular; parte vegetal utilizada; tipo de extrato) dos extratos utilizados para os testes de viabilidade sob as promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* e toxicidade sobre macrófagos DH82.

EXTRATOS (SIGLAS)	ESPÉCIE	NOME POPULAR	PARTE VEGETAL	TIPO DE EXTRATO
FMN	*Morus nigra* L.	Amoreira	Folhas	Etanólico
FAO	*Anacardium occidentale*	Cajueiro	Folhas	Etanólico
FPA	*Pereskia aculeata*	Ora-pro-nóbis	Folhas	Etanólico
FEU	*Eugenia uniflora*	Pitangueira	Folhas	Etanólico
EEM	*Momordica charantia*	Melão de São Caetano	partes áreas	Etanólico
FPG	*Psidium guajava L.*	Goiabeira	Folhas	Etanólico

FONTE: O autor.

3.2 Preparo das soluções estoques

Para todos os extratos foram realizados os mesmos procedimentos de solubilização. Resumidamente, preparamos uma solução na concentração de 100mg/mL a qual denominamos como solução estoque. Para a solubilização dos extratos nessa concentração, inicialmente adicionamos DMSO em volume correspondente a 20% do volume final, sendo posteriormente agitado em vórtex e então colocado em banho ultrassônico por 15 minutos. Após essa solubilização inicial, foi adicionado o meio Schneider em volume suficiente para corresponder a 80% do volume final. Esse extrato em solução foi então transferido para microtubos de 1,5mL em alíquotas de 50µL por tubo e armazenado em freezer -20ºC até o momento de uso.

3.3 Preparo da solução estoque de anfotericina B

A anfotericina B foi utilizada como controle positivo nos testes de viabilidade e citotoxicidade, em ambos os testes, as condições de uso dessa substância foram as mesmas. Resumidamente, foi preparada uma solução

estoque da anfotericina B na concentração de 50mg/mL, foi pesado 50 mg de da droga em balança analítica e posteriormente foi solubilizado o conteúdo com auxílio de DMSO em volume correspondente a 20% do volume final, sendo posteriormente agitado em vórtex. Após essa solubilização inicial, foi adicionado o meio Schneider em volume suficiente para corresponder a 80% do volume final da solução estoque.

As soluções estoques preparadas foram alíquotas em microtubos de 500µL contendo o volume de 100µL de solução e congeladas em freezer vertical a -20ºC.

3.4 Cultivo e preparo da solução teste de promastigotas

O cultivo das promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foi realizado em garrafa de cultivo de 25 cm^2, em meio Schneider completo, que corresponde a suplementação do meio em questão com 20% de soro bovino fetal e 1% de pentamidina/estreptomicina. Para o cultivo da espécie L. infantum utilizou-se urina humana masculina filtrada, para otimizar a suplementação do meio. Os parasitos foram mantidos em estufa B.O.D. (Biologycal Oxygen Demand) a 26ºC, no laboratório de cultivo celular no prédio do REUNI da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre.

Durante o cultivo das promastigotas traçou-se uma curva de crescimento parasitário, proveniente da contagem diária durante uma semana das promastigotas em câmara de Neubauer. Esse procedimento foi realizado para garantir que as células do parasito encontravam-se em fase exponencial de crescimento no dia da realização dos testes.

Para a realização dos experimentos, as promastigotas novamente foram contadas em câmara de Neubauer, após a contagem o valor estimado foi submetido aos ajustes matemáticos necessários para determinar a quantidade estimada de parasitos/mL.

A solução de parasitos preparada para a realização do teste de viabilidade foi preparada afim de obter-se a concentração final de $1x10^6$ parasitos/mL por poço. Utilizou-se 100µL de solução de promastigotas em cada poço ($1x10^6$

parasitos/mL em meio Schneider). Assim, foi realizado o cálculo de quanto de volume final de solução seria necessária para plaquiar 88 poços.

3.5 Avaliação in vitro da bioprospecção dos produtos naturais com ação leismanicida para formas promastigotas das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*

As soluções estoques de anfotericina B e, dos extratos foram descongelados no momento do teste em placas de 96 poços sendo submetidos a diluição seriada. Após essa diluição, as concentrações testadas dos extratos foram as seguintes: 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL e 31,25µg/mL.

Os testes foram realizadas em microplacas contendo 96 poços, com todos os tratamentos realizados em duplicata, em dois experimentos independentes.

Para obtenção das concentrações de teste foram preparadas no momento de realização do teste, soluções de extratos provenientes das soluções estoques na concentração de 10mg/mL, denomina-se solução teste. A partir da solução teste foram adicionados 40µL de extrato mais 160µL de meio Schneider nos primeiros poços de cada duplicata na placa de 96 poços. O primeiro poço de teste de cada extrato ao final de todos os procedimentos do teste encontrava-se na concentração mais alta de teste 1000µg/mL.

Os demais poços testados foram adicionados primeiramente 100µL de meio Schneider e, foi realizada diluição seriada do volume de 100µL a partir do poço de maior concentração até o menos concentrado, deixando todos os poços teste com volume de 100µL.

A anfotericina B foi utilizada como controle positivo (CP) a diluição seguiu os mesmos passos dos extratos, partiu da solução estoque que encontrava-se 50mg/mL e foi diluída 100 vezes, até alcançar a concentração de 5µg/mL^{-1}.

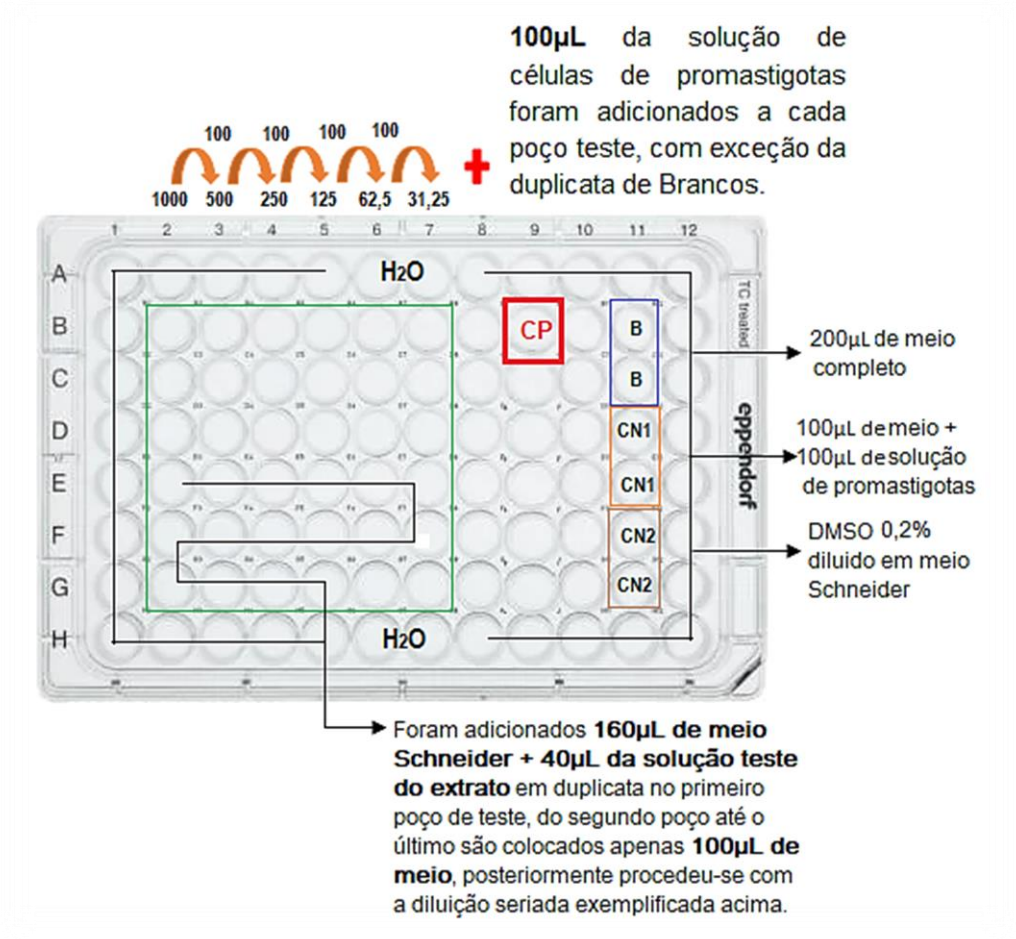
Como controle negativo (CN), adotou-se CN1 e CN2. O CN1 foi realizado por meio da incubação de promastigotas em meio Schneider sem adição dos compostos e o CN2 foi utilizado o DMSO 0,2%. O branco foi preparado a partir

de 200µL de meio Schneider completo sem adição de nenhuma outra substância ou célula (Figura 03).

Para finalizar foi alcançado um volume final de 200µL/poço, alcançado por meio da adição de 100µL de solução de promastigotas em todos os poços, com exceção dos brancos.

Ao final as placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C por 48 horas, sendo inspecionadas sob microscópio invertido.

Figura 3- Esquema ilustrativo dos procedimentos adotados para realização do ensaio de viabilidade das promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* tratadas com extratos de plantas do RENISUS.



Fonte: O autor.

Ao final das 48 horas foi adicionada a cada poço a solução de resazurina (3 µM), preparada com tampão fosfato 1% em pH 7.

Em seguida as placas foram mais uma vez incubadas a 26°C e, após um período de 4 horas as absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas nos

comprimentos de onda 570 e 600nm. De acordo com o protocolo do fabricante (ALAMAR BLUE, 2008), para obtenção da % de viabilidade em ensaios de proliferação e citotoxicidade, utiliza-se a seguinte equação:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{(O2.A1)-(O1.A2)}{(O2.P1)-(O1.P2)} \,.\, 100$$

Sendo que:

O1 = coeficiente de extinção molar do alamarBlue® oxidado (azul) a 570nm: 80586

O2 = coeficiente de extinção molar do alamarBlue® oxidado a 600nm: 117216

A1 = absorbância dos poços de teste a 570nm

A2 = absorbância dos poços de teste a 600nm

P1 = absorbância dos poços de controle negativo (DMSO) a 570nm

P2 = absorbância dos poços de controle negativo (DMSO) a 600nm

A partir dos valores de viabilidade celular, os valores da concentração inibitória 50% (IC_{50}) foram determinados por análise de regressão.

Os ensaios foram realizados em duplicata, e repetidos duas vezes.

3.6 Citotoxicidade dos extratos frente a Macrófagos DH82

Macrófagos caninos da linhagem DH82 foram cultivados em garrafas de cultivo de 75 cm^2 com filtro e meio Dulbecco Mem (DMEM), suplementado com 20% de soro bovino fetal, e 1% de pentamidina/estreptomicina e mantidos em estufa de circulação de ar a 37ºC e 5% de dióxido de carbono (CO_2).

No ensaio de citotoxicidade, os macrófagos DH82 foram plaqueados em placas de 96 poços, na concentração de $2x10^4$ células/mL em meio DMEM suplementado, em um volume total de 200µL por poço.

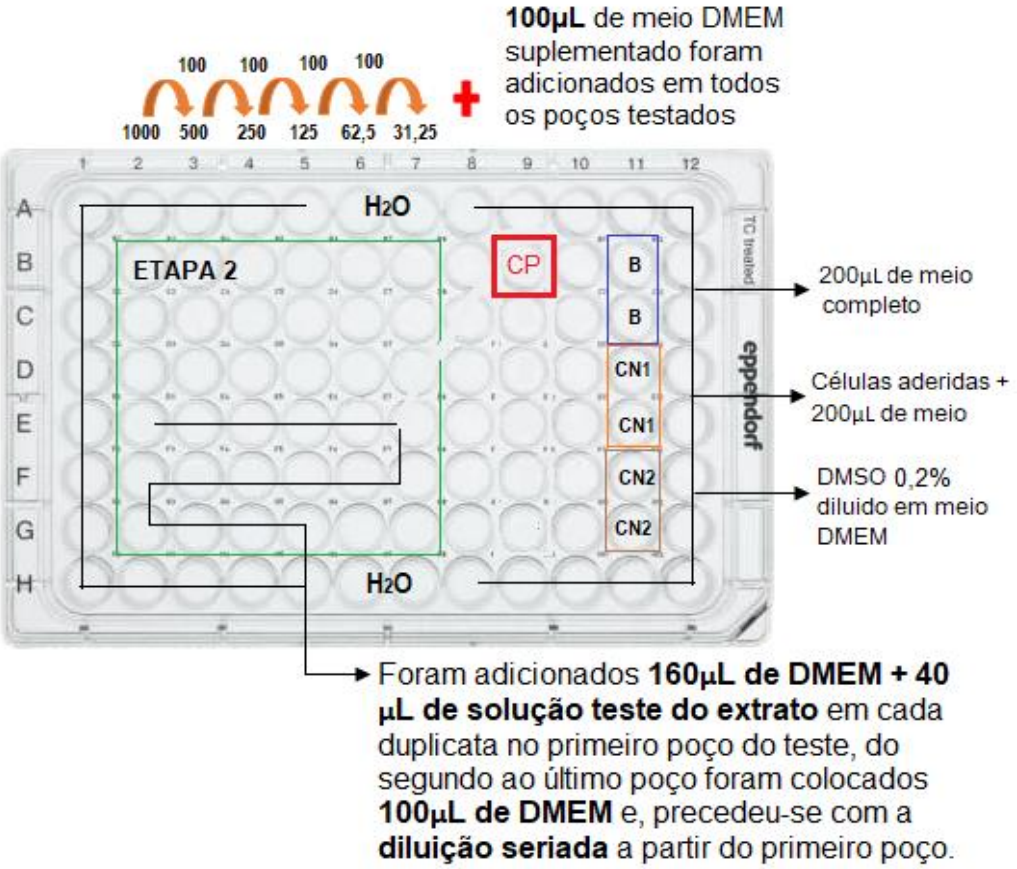
As placas foram mantidas em estufa de circulação de ar a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO_2) durante 24h.

Após este período o meio foi retirado dos poços, mantendo os macrófagos aderidos ao fundo, e foram adicionados 40µL da solução teste de extrato mais 160µL de meio DMEM nos primeiros poços de cada duplicata, os demais poços foram adicionados 100µL de DMEM, foi realizada diluição seriada a partir do poço de maior concentração para obtenção das diluições testes de 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL e 31,25µg/mL.

Assim como no ensaio com as promastigotas, a anfotericina B que foi diluída da mesma forma que os extratos foi usada como controle positivo. No CN1 as células foram mantidas em meio DMEM sem adição dos compostos, e no CN2 foi utilizado o DMSO 0,2%. O meio DMEM composto foi utilizado como branco (Figura 4).

Figura 4- Esquema ilustrativo dos procedimentos adotados para realização do ensaio de citotoxicidade dos extratos testados em macrófagos DH82.

ETAPA 1: Adicionou-se 200µL da solução de células DH82 e após o período de aderência de 24 horas retirou todo o meio de cada poço, permanecendo apenas os macrófagos aderidos ao fundo do poços.



. Fonte: O autor.

As placas foram mantidas em estufa de circulação de ar a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO_2) por 48 horas.

Conforme descrito no item 3.4, após o período de incubação foi adicionada a cada poço a solução de resazurina (3µM).

As absorbâncias obtidas pela leitura das placas foram utilizadas para o cálculo da viabilidade celular, e a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) foi determinada por análise de regressão.

Cada ensaio foi realizado em duplicata, em dois experimentos independentes.

3.7 Determinação da concentração inibitória e citotóxica (IC_{50} e CC_{50})

A Determinação da concentração inibitória (IC_{50}) e da concentração tóxica a 50% dos macrófagos (CC_{50}), é dada pelo valor da concentração teste capaz de promover morte significativa em 50% do total de células. Essa concentração, então, será conhecida como IC_{50}, quando avaliamos a viabilidade e, $CC_{50,}$ para os resultados de citotoxicidade. Quanto menor o valor encontrado para a concentração do IC_{50}, mais tóxica para célula é a substância avaliada.

3.8 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS), foi determinado pela razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC_{50}) para células DH82 e o IC_{50} para protozoários.

Quanto maior o índice de seletividade mais eficiente contra os parasitos e menos tóxico para os macrófagos (NAKAMURA, *et al.,* 2006).

3.9 Análise estatística

Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparação das médias. Valores de p=0,05 foram considerados significativos. Os resultados que não apresentaram distribuição Gaussiana foram avaliados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os valores de IC_{50}, e CC_{50} foram obtidos por análise de regressão não linear. Os programas Origin 8.0, GraphPad Prism 5.0.4 e Microsoft Excel 2010 foram utilizados para análise dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade contra as formas promastigotas

Analisando os dados obtidos foi possível verificar que os extratos etanólicos testados possuem efeito leishmanicida sobre promastigotas de *Leishmania* spp. Porém, a espécie *L. infantum*, demonstrou ser mais suscetível aos extratos bruto do que a espécie *L. amazonensis,* no qual os valores de IC_{50} encontrados ficaram acima de 250µg/mL. Ao comparar os resultados de viabilidade obtidos com o emprego dos seis extratos analisados em diferentes diluições, todos os dados apresentaram diferença significativa (p=0,05) do resultado de viabilidade da anfotericina B (CP). Considerando que a substância em questão é um medicamento de referência com uma atividade leishmanicida estabelecida na literatura (SOBARZO-SANCHEZ *et al*., 2013), o resultado de viabilidade do CP obtido por meio do tratamento das promastigotas de *Leishmania* spp., com a anfotericina B foi utilizado como base para realizar as análises estatísticas (ANOVA) e quando necessário o teste de médias (Tukey).

As figuras de 05; 06; 07; 08; 09 e 10 trazem os resultados de viabilidade e, as concentrações de $IC_{50,}$ obtido por regressão não linear, por meio da utilização do programa estatístico Origin 8.0, para o tratamento das formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* com os extratos das folhas da amoreira, do cajueiro, da pitangueira, da ora-pro-nóbis e as partes aéreas do melão de são caetano.

Considerando a análise da variância (ANOVA), não houve diferença significativa (p=0,05) entre os controles negativos CN1 e CN2 sobre as promastigotas da espécie *L. infantum* e *L. amazonensis*.

Em todas as concentrações testadas houve diferença significativa por meio do teste de Tukey (p=0,05), entre a viabilidade das promastigotas de *L. infantum* quando comparadas ao CP e ao CN realizados nos testes.

O valor médio da viabilidade das promastigotas de *L. amazonensis* nos ensaios com os extratos da amoreira na concentração de 31,25µg/mL e, da pitangueira nas concentrações de 61,5µg/mL e 31,25µg/mL, e o valor médio de

viabilidade do CN do ensaio, não apresentaram diferença estatística considerada significante por meio da aplicação do teste de Tukey (p=0,05).

Os resultados obtidos sobre as forma promastigotas de *Leishmania amazonensis*, demonstrou inatividade dos extratos avaliados. Toda via, há possibilidade de avaliação de produtos isolados dessas plantas que poderiam apresentar potencial leishmanicida, principalmente, os pertencentes as classes dos flavonóides e dos triterpenos. Os valores de IC_{50} e IS encontrados para a espécie *L. infantum* foram melhores. Contudo, somente o extrato de *Pereskia aculeata* que apresentou um índice de seletividade superior a 10.

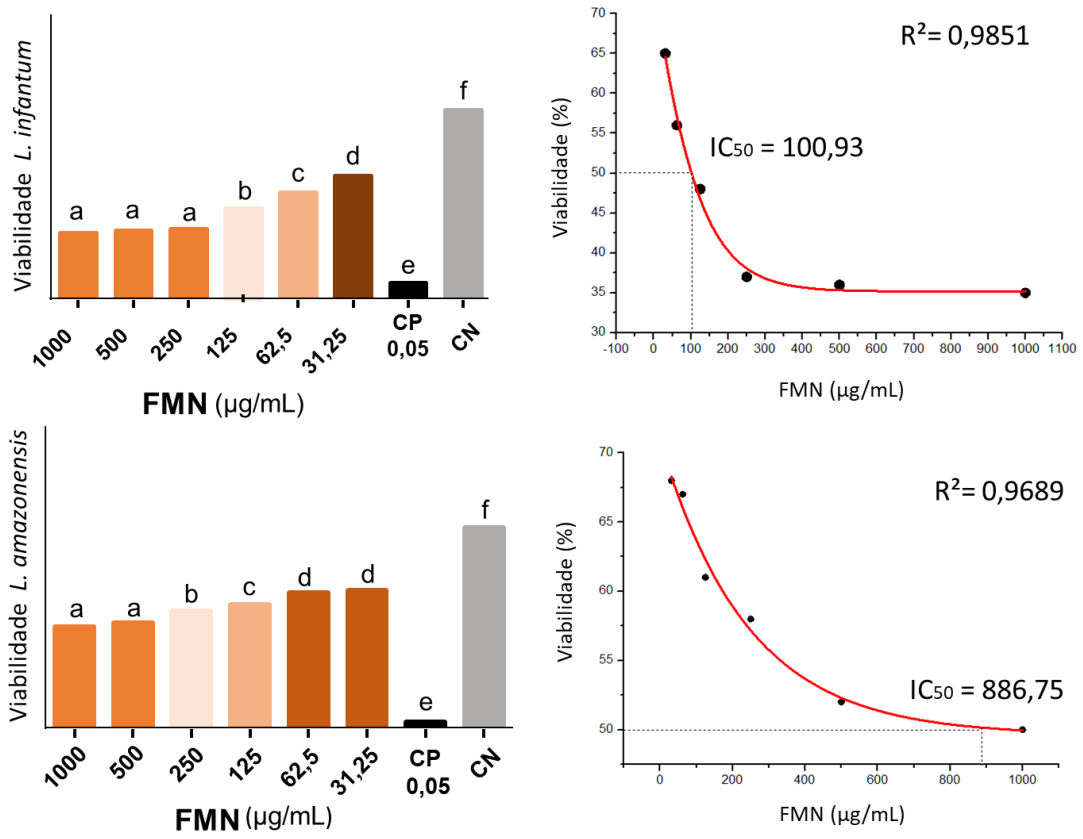
Nenhum dos extratos analisados apresentou efeito maior do que a do fármaco de referência sobre as promastigotas de ambas as espécies testadas.

4.1.2 **Resultados dos ensaios de viabilidade e citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de** *L. amazonensis* **e** *L. infantum* **com o extrato de** Morus nigra **L. (FMN)**

O extrato bruto FMN apresentou uma diferença de viabilidade média considerada não significativa por meio do teste de Tukey (p=0,05) entre as concentrações de 1000µg/mL e 500µg/mL, o mesmo aplicou-se no valor médio de viabilidade nas concentrações de 62,5µg/mL e 31,25µg/mL do extrato em questão. O IC_{50} encontrado para o tratamento de promastigotas de *L. infantum* com o extrato em questão foi de 100,93µg/mL. Para a espécie *L. amazonensis*, a concentração de 886,75µg/mL foi a responsável por matar 50% das células em estudo.

O valor de CC_{50} obtido ficou na concentração de 852,92µg/mL. Com base nos valores de IC_{50} e CC_{50}, foi possível estimar o índice de seletividade (IS) do extrato testado. Por meio da razão entre a concentração citotóxica e a capaz de inibir 50% do crescimento das promastigotas, obteve-se um IS do extrato FMN de 8,45 para a espécie *L. infantum* e de 0,96 para a espécie *L. amazonensis*. A figura 5 demonstra em forma de gráficos os resultados obtidos.

Figura 5– Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FMN (folhas *Morus nigra*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: O autor.

A amoreira é uma planta da família *Moraceae*. Possui frutos (amora) ricos em compostos fenólicos, como os flavonóides, antocianinas e carotenoides, devido à grande quantidade de antocianina. A amora, então, é muito utilizada na medicina devido a sua atividade antioxidante (KOSTIC *et al.*, 2013).

As folhas de uma planta chamada de *Pourouma guianensis,* planta amazônica, da mesma família da amoreira, serviram de material para a extração e o isolamento de triterpenos, que foram avaliados contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis.* Dois triterpenos isolados o Ácido Ursólico e o Ácido Oleanólico, demonstraram por meio de estudo *in vitro* atividade leishmanicida contra a forma amastigota da *Leishmania amazonensis*, com IC_{50}

de 27µg/mL e 11µg/mL respectivamente, superior ao IC_{50} do Glucantime® (83µg/mL), utilizado como controle positivo no teste (GIL *et al*., 2008).

O extrato FMN, proveniente das folhas da *M. nigra* (**L**) que pertence à mesma família da planta amazônica estudada por Gil em 2008, obteve um IC_{50} superior a 250µg/mL contra as promastigotas da espécie *L. amazonensis*, e um IS baixo, de 0,96. O alto valor de IC_{50} e o baixo índice de seletividade sugerem que ao contrário do relatado por Gil em 2008 para a planta *Pourouma guianensis,* o extrato das folhas da amoreira não possui bom potencial leishmanicida contra a espécie *L. amazonensis*.

Para o ensaio com promastigotas da espécie *L. infantum* os resultados foram melhores (IC_{50} de 100,93µg/mL), o IS mostrou que o extrato bruto das folhas da amoreira é 8,45 vezes mais tóxico ao parasito do que as células DH82 (macrófagos caninos).

A planta *Morus nigra* **L**. é muito estudada pelo seu alto potencial antioxidante, devido ao grande número de compostos fenólicos, principalmente isolados dos frutos. Porém, estudos recentes têm relatado também atividades antimicrobianas dessa planta. Inúmeras outras atividades biológicas foram atribuídas a outras espécies do gênero *Morus,* por meio de vários estudos, como: antidiabéticas, anti-HIV, antiinflamatórias, hipolipidêmicas, hepatoprotetoras, anticancerígenas, antiobesidade e neuroprotetoras (KHALID *et al*. 2011; KOSTIC *et al*., 2013; SAKAGAMI *et al*., 2007; RAMESH *et al*., 2014).

4.1.3 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amozonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Anacardium occidentale* (FAO)

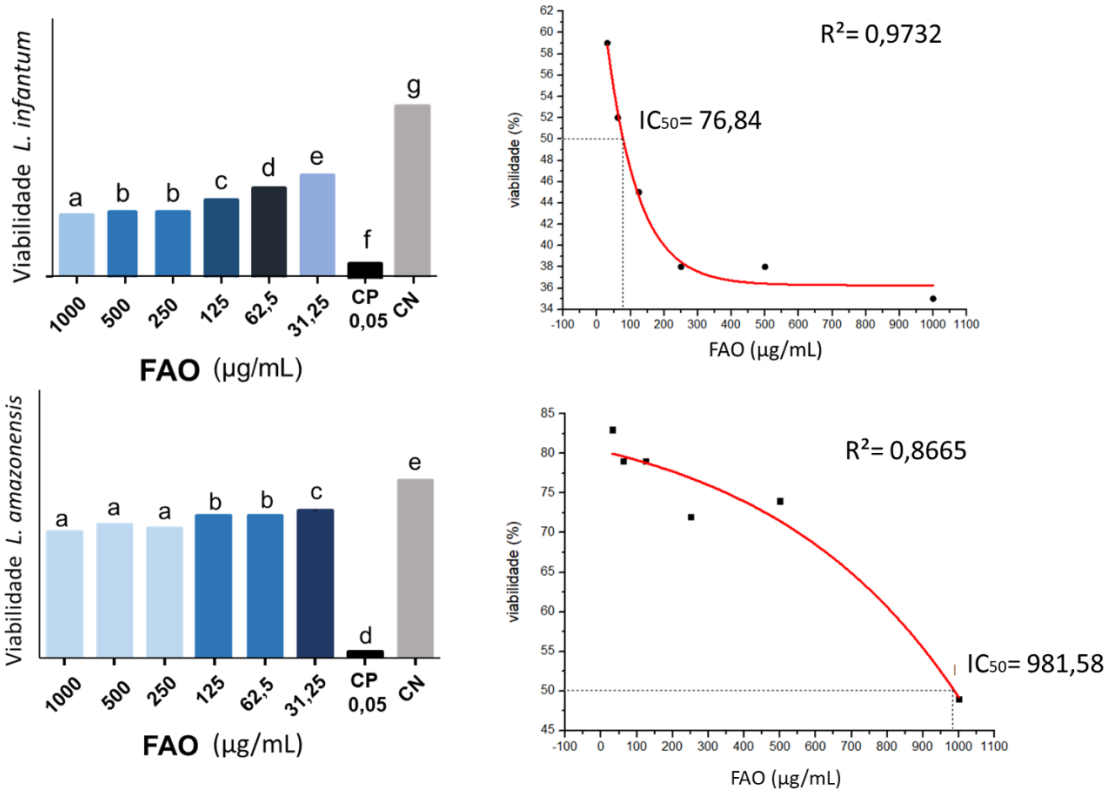
Os valores médios de viabilidades encontrados nas concentrações testes do extrato FAO de 1000 µg/mL até 250µg/mL e, a de 125µg/mL e 61,5µg/mL, não apresentaram diferença estatística significante quanto ao teste de Tukey (p=0,05). O extrato bruto FAO apresentou valores de viabilidade considerados insignificantes (p=0,05) entre

O IC_{50} (76,84µg/mL) e o CC_{50} (549,46µg/mL) encontrados com o tratamento de promastigotas de *L. infantum* com o extrato FAO demonstrou

que o mesmo possui compostos promissores contra o parasito, porém, o IS estimado é considerado baixo, ou seja, o extrato é pouco seletivo.

O IC_{50} superior a 250µg/mL (981,58µg/mL) encontrado no teste de viabilidade com as formas promastigotas de *L. amazonensis*, sugere que o extrato FAO é inativo contra essa espécie do parasito. A figura 6 traz as informações completas sobre os dados obtidos nos ensaios de viabilidade e o IC_{50}.

Figura 6 – Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FAO (folhas *Anacardium occidentale*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: O autor.

As folhas e as hastes do cajueiro são utilizadas na medicina para o tratamento de eczemas, bronquite, tosse e disfunções gastrointestinais (FRANÇA *et al*., 1993; SOKENG *et al*., 2001; OJEWOLE, 2004).

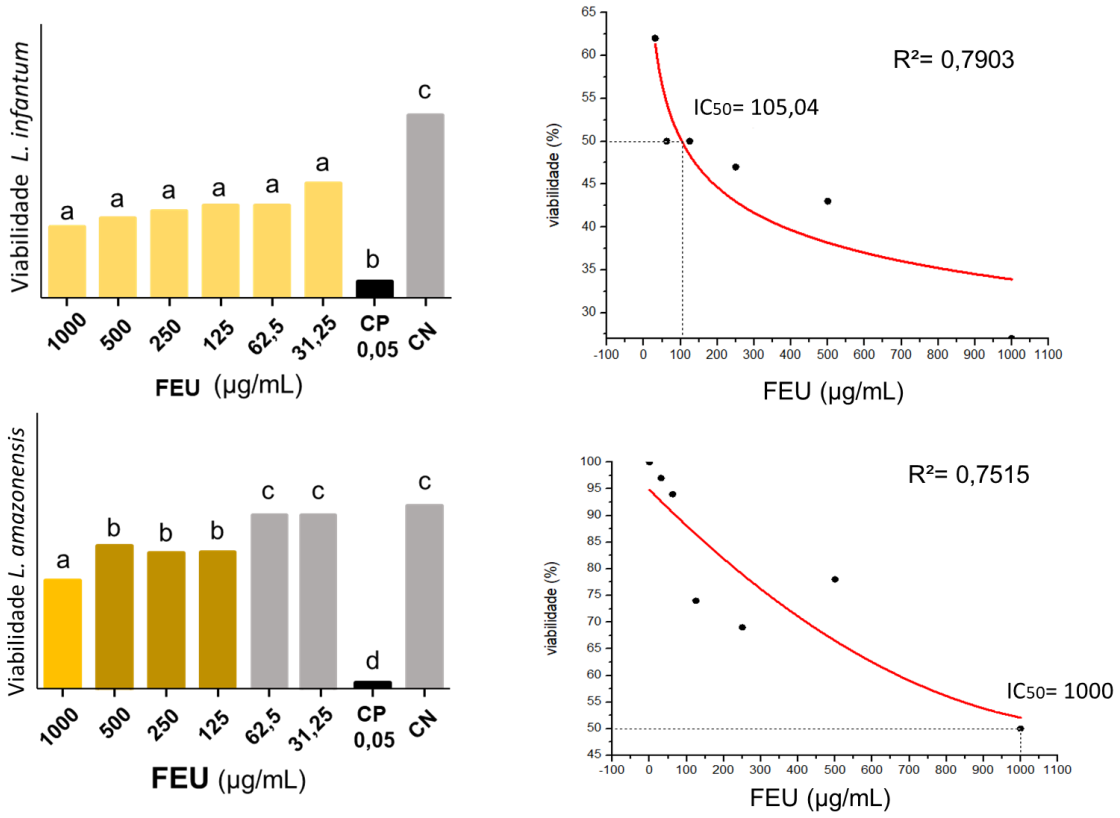
A atividade leishmanicida do extrato das cascas do Cajueiro foi avaliada em 1993 por França e colaboradores, que realizou teste *in vivo* em camundongos e *in vitro.* No teste *in vitro,* contra o parasito *Leishmania (V.) braziliensis,* o extrato foi testado autoclavado ou não, nas concentrações de 7,5mg/mL e 15mg/mL respectivamente. O ensaio com o extratos nas duas condições foi realizado no período de 6 dias, em placa de petri. Como o teste foi realizado em apenas uma concentração não foi possível determinar o IC_{50}, mas ao final o crescimento parasitário encontrava-se estático e inferior ao controle (Glucantime®) para ambos os extratos (FRANÇA, 1993). Assim, como o descrito para *L. brasiliensis* por França em 1993, os resultados encontrados com o tratamento das promastigotas de *L. amazonensis* com o extrato de *A. occidentale* também é promissor.

Em um estudo realizado por Ajileye e colaboradores (2015) o potencial antimicrobiano do extrato bruto do Caju foi avaliado. Nesse estudo foi utilizada: três bactérias gram positivas, quatro gram negativas e dois fungos e os antimicrobianos Acriflina e Estreptomicina para controle. Os resultados indicam baixa atividade antimicrobiana do extrato avaliado e inatividade como antifúngico.

4.1.4 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Eugenia uniflora* (FEU)

O extrato bruto FEU não apresentou diferença significativa quanto ao teste de Tukey a 5%, nas médias de viabilidades obtidas entre os valores de concentrações de 500µg/mL a 125µg/mL e, entre as concentrações de 62,5µg/mL e 31,25µg/mL, que também não apresentaram diferença significativa do valor de viabilidade média do CN1. A figura 7 demonstra os dados citados.

Figura 7 – Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FEU (folhas *Eugenia uniflora*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: O autor.

Os valores de IC_{50} encontrados para o extrato bruto das folhas da *E. uniflora*, conhecida como pitangueira, sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, foram de 105,04µg/mL e 1000µg/mL respectivamente.

Esses resultados sugerem que o extrato possui atividade leishmanicida promissora contra *L. infantum.* Resultado semelhante foi encontrado por Santos e colaboradores (2013), no qual a atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto das folhas de *E. uniflora* foi avaliado nas concentrações de 100µg/mL e 500µg/mL, contra *Leishmania braziliensis* e, a citotoxicidade, sobre células de fibroblastos NCTC 929. O extrato apresentou inibição do crescimento parasitário superior a 50% em ambas as concentrações, na concentração de 100µg/mL o valor de inibição encontrado foi de 65%. Os valores obtidos nos estudos de

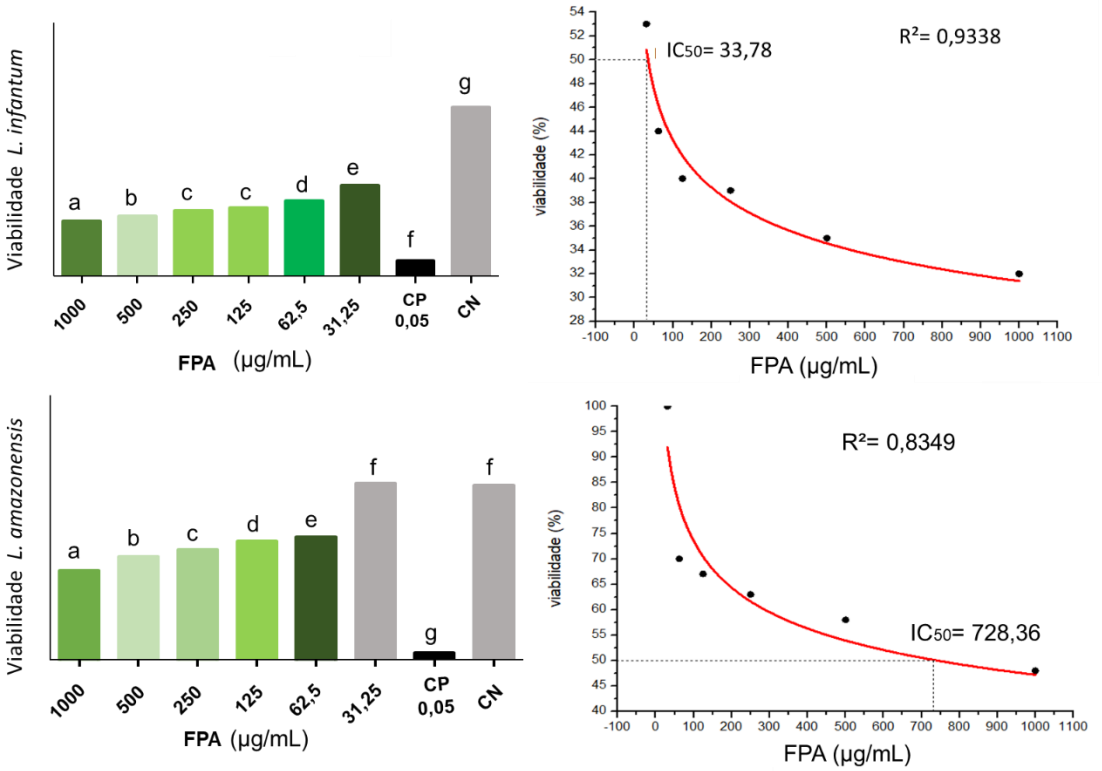
Santos *et al*., em (2013), foram semelhantes ao IC_{50} encontrado para o mesmo extrato no estudo contra as formas promastigotas de *L. infantum* (IC_{50}=105,04µg/mL). No estudo realizado pelos autores acima não foi calculado o IC_{50}, mas foi possível verificar que na concentração de 100µg/mL o extrato é capaz de inibir 65% do crescimento parasitario de *L. braziliensis*.

O extrato FEU foi inativo contra as promastigotas de *L. amazonensis*. Braga e colaboradores (2007), já haviam avaliado e registrado a inatividade do extrato metanólico das folhas da pitangueira contra parasitos da espécie *L. amazonensis*.

4.1.5 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Pereskia aculeata* (FPA)

Os resultados das médias da viabilidade encontradas para o tratamento de *L. infantum* com o extrato bruto FPA, nas concentrações de 125µg/mL e 250µg/mL, não apresentaram diferença significativa quando analisados sobre o teste de Tukey (p=0,05). Os resultados de viabilidade obtidos com o emprego do mesmo extrato sobre promastigotas de espécie *L. amazonensis*, também não demonstraram diferença significativa entre as concentrações de 250µg/mL e 500µg/mL. A figura 8 traz os resultados de viabilidades encontrados nos testes e o valor de IC_{50} determinado para ambas as espécies estudadas.

Figura 8 – Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FPA *(*folhas *Pereskia aculeata*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: O autor.

Os valores de IC_{50} obtidos de 33,78µg/mL de FPA para *L. infantum* e de 728,36µg/mL para a *L. amazonensis*, sugerem uma atividade leishmanicida promissora contra a espécie *L. infantum*, em contrapartida, com valor de IC_{50} superior a 250µg/mL o mesmo extrato demonstrou ser inativo contra *L. amazonensis.*

Pinto (2012), avaliou a capacidade leishmanicida do extrato bruto metanólico das folhas da *Pereskia aculeata* M. O autor avaliou o extrato em questão contra as formas promastigotas de *Leishmania major, L. braziliensis, L. chagasi/infantum* e *L. amazonensis*. Os resultados obtidos apontam inatividade do extrato metanólico contra as espécies estudadas, considerando que o IC_{50} superior a 100µg/mL não apresentava resultados promissores.

Souza e colaboradores (2016) avaliaram o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato bruto das folhas e o óleo essencial de *Pereskia aculeata*. No estudo foram feitos extratos etanólico, clorofórmico e metanólico. Os três tipos de extratos das FPA foram testados na concentração de 1µg/mL a 4µg/mL contra, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e fungos da espécie *P. expansum, P. citrinum, P. niger* e *A. versicolor*. O extrato etanólico bruto teve atividade contra todas as bactérias avaliadas, destacando-se contra *E. coli*. O extrato metanólico foi inativo na concentração de 1µg/mL e na concentração de 4µg/mL obteve atividade contra todas as bactérias. Os autores concluíram que o extrato bruto das folhas de *P. aculeata,* possui boa atividade antimicrobiana, principalmente o etanólico e com base em estudos sobre células neuroblastomas (SH-SY5Y) as substâncias testadas demonstraram-se atóxicas nas concentrações de 0,01 e 100µg/mL.

Considerando os estudos citados é possível verificar com o tipo de líquido extrator utilizado para preparar o extrato interfere diretamente nos resultados obtidos. Souza e colaboradores (2016) por meio do estudo de extratos da mesma planta, porem com diferentes líquidos extratores contra as mesmas bactérias e fungos, obteve resultados que variam de acordo com o solvente utilizado.

Considerando relatados sobre uma possível atividade sobre o SNC de algumas espécies de *Pereskia*, Souza e colaboradores (2016), ampliaram os estudos envolvendo as células SH-SY5Y e obtiveram dados que revelam que a alta concentração do extrato metanólico (100µg/mL) inibiu a expressão de ADCY1 na célula avaliada e alterou a produção intracelular de AMPc. A inibição de AMPc demonstra de acordo com pesquisas clínicas e epidemiológicas, que a redução da expressão de ADCY1 tem benefícios bem documentados, incluindo benefícios para doenças cardíacas e dor (BRAND *et. al.*, 2013).

4.1.6 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Momordica charantia* (EEM)

Os extrato bruto de EEM não demonstrou diferença considerada significante (p=0,05) na viabilidade das promastigotas de *L. infantum*, a partir da concentração de 125µg/mL até a concentração de 1000µg/mL.

As médias de viabilidade de *L. amazonensis* também não apresentaram diferença significante quando avaliados pelo teste de Tukey ($p<0,05$) para o tratamento com o extrato do melão de são caetano, nas concentrações de 125µg/mL e 250µg/mL e entre 31,25µg/mL e 61,5µg/mL.

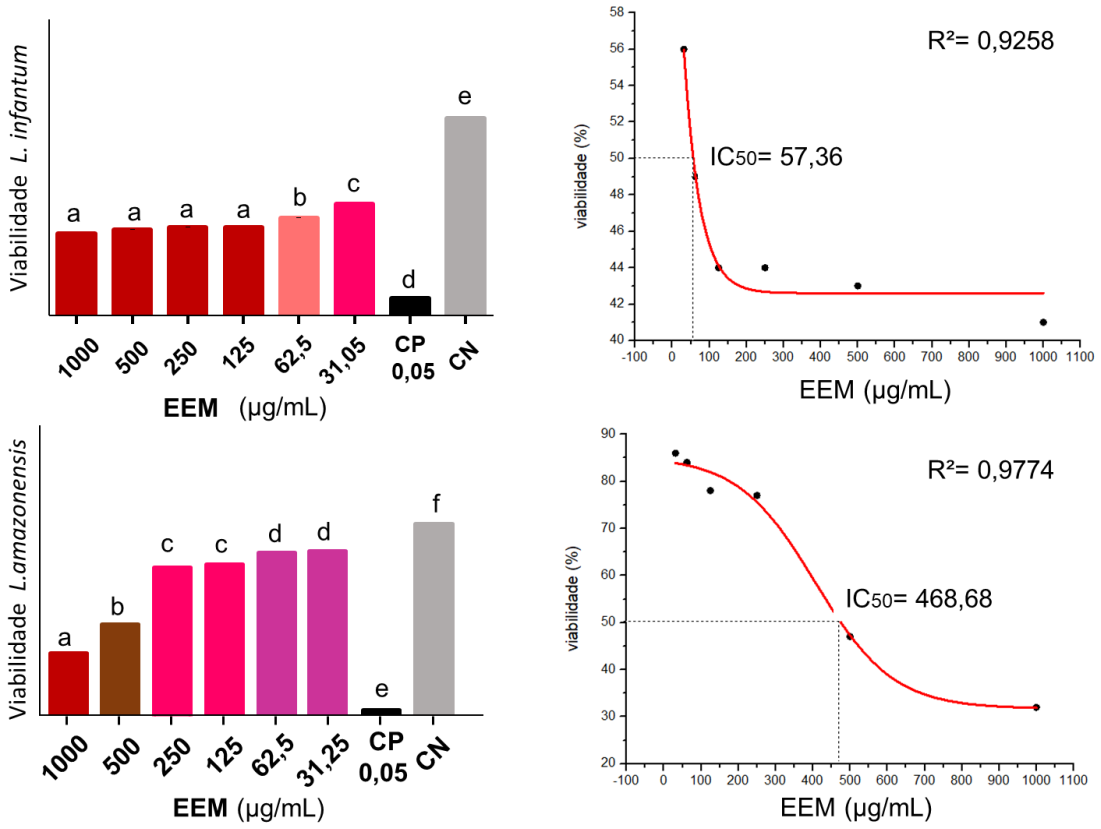
A avaliação do IC_{50} do extrato EEM obtido por meio do teste de viabilidade com *L. infantum* ficou em torno de 57,36µg/mL, valor considerado bom, que subtende-se que o extrato contém componentes leishmanicidas promissores, contra a espécie em questão.

Na literatura há registro da atividade leishmanicida de um componente isolado dos frutos do Melão de São Caetano, a momordicatina, como foi chamada essa substância, apresentou IC_{50} de 20µg/mL contra a forma promastigota de *L. braziliensis* (GRUPTA, 2010).

O valor de IC_{50} obtido para a espécie *L. amazonensis* tratada com o extrato EEM, foi de 468,98µg/mL, sendo o extrato considerado não promissor contra a espécie.

O CC_{50} encontrado para as espécies foi de 683,76µg/mL (figura 13). O IS encontrado por meio da razão entre os valores de IC_{50} e CC_{50}, foi de 1,45 para *L. infantum* e 11,92 para *L. amazonensis*. Considera-se boa a seletividade apresentada pelo extrato para o parasito da espécie *L. infantum*, e pouco seletivo para *L. amazonensis*. A figura 9 traz os gráficos com os valores de Viabilidade e IC_{50} obtidos por meio do tratamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. com o extrato EEM.

Figura 9 – Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato EEM (partes aéreas de *Momordica charantia*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



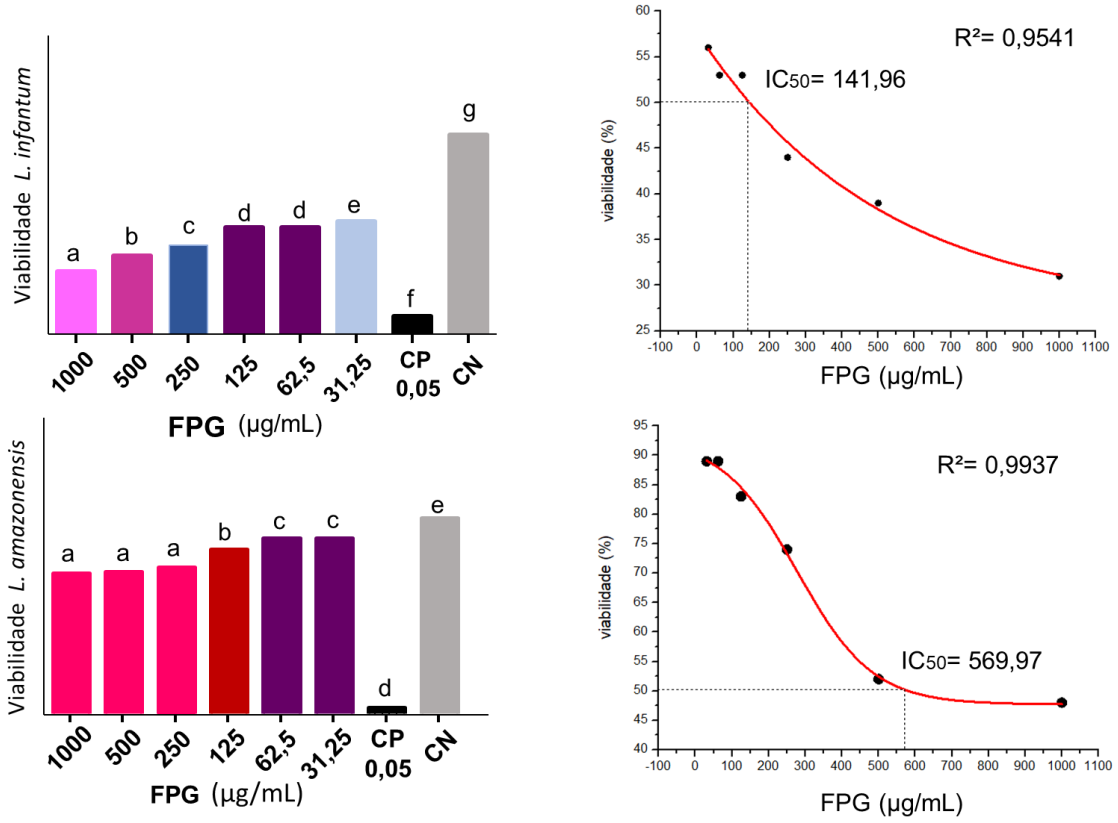
Fonte: O autor.

O potencial leishmanicida do melão de são caetano (*Momordica charantia*) foi avaliado contra *L. braziliensis* na concentração de 100µg/mL e 500 µg/mL, com inibição inferior a 50% do crescimento parasitário na concentração de 100µg/mL o extrato bruto de *Momordica charantia* foi considerado inativo contra *L. braziliensis* (SANTOS *et al*., 2013). A inatividade do extrato etanólico bruto do extrato EEM foi registrada contra *L. amazonensis*, com IC_{50} superior a 250µg/mL.

4.1.7 Resultados dos ensaios de Viabilidade e Citotoxicidade obtidos com o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* com o extrato de *Psidium guajava* (FPG)

As médias de viabilidade de *L. infantum* encontradas nas concentrações de 62,5µg/mL e 125µg/mL do tratamento com o extrato bruto FPG, não obtiveram diferenças significativas quando comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os resultados obtidos com o emprego do mesmo extrato sobre promastigotas de espécie *L. amazonensis* não apresentaram diferença estatística significativa nas concentrações de 250µg/mL a 1000µg/mL (Figura 10).

Figura 10 – Resultados das médias da viabilidade obtidas com o tratamento de diferentes concentrações do extrato FPG (folhas de *Psidium guajava*) e os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), e a ANF (anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}) sobre as promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*. As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Fonte: O autor.

As concentrações de IC_{50} para *L. infantum* e *L. amazonensis*, nos ensaios com o extrato FPG foi de 141,96µg/mL e 569,97µg/mL respectivamente.

A atividade leishmanicida de *P. guajava* foi avaliada por Machado e colaboradores (2018) o extrato foi testado nas concentrações de 250µg; 500µg e 1000µg/mL. Em todas as concentrações o extrato de *P. guajava* demonstrou atividade contra o *Trypanosoma cruzi*. Contudo, foi inativo contra *L. amazonensis* e obteve resultados considerados não promissores contra *L. braziliensis*.

Estudos mostraram que o extrato de folhas da Goiabeira possui grande potencial em formar complexos coloridos com ferro, por isso o extrato tem a capacidade de quelar o ferro e, assim torna-se tóxico a alguns parasitas, especialmente contra o *T. brucei* (EKANEM, 1989; THAPANON *et al*., 2005).

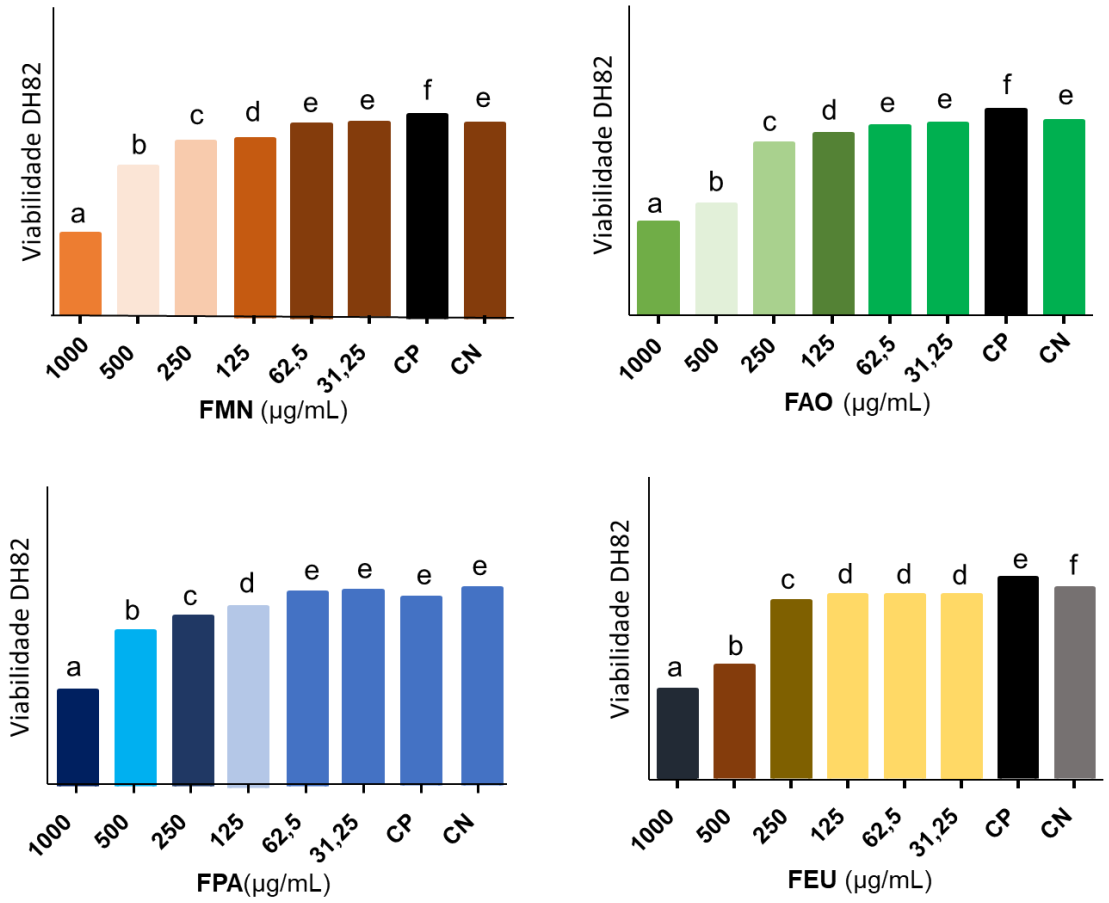
A triagem fitoquímica realizada nas folhas da *P. guajava* mostrou que o extrato contém uma quantidade apreciável de flavonóides e taninos, entre outros. A capacidade do extrato para manter uma baixa parasitemia pode em parte ser atribuída à sua capacidade de quelar o ferro. O mecanismo que causa a morte do parasito, pode estar ligado a enzima ribonucleotídeo redutase (RNR). A RNR requer ferro para a produção de ribonucleotídeos antes da proliferação celular. Portanto, a remoção do ferro disponível no sistema celular gera efeitos deletérios. A presença de flavonoides está ligada a ação antimicrobiana do extrato das folhas de *P. guajava* (ADEYEMI *et al*., 2009).

P. guajava possui propriedades tripanocidas, bem como a capacidade de prolongar o tempo de vida de ratos infectados com *T. brucei*. Apesar da depuração dos parasitas do sangue, os ratos infectados morrem. A morte tardia dos ratos, sugerem o envolvimento de agentes secundários aos parasitas (ADEYEMI *et al*., 2009). Fatores extracelulares derivados dos parasitas podem ser os responsáveis pelos óbitos mesmo diante de baixo índice parasitário (NWAGWU *et al*., 1987; EKANEM, 1989; BOUTIGNON *et al*., 1990; EKANEM *et al*., 1996).

4.2 Viabilidade das células DH82 e teste de citotoxicidade (CC_{50})

Os resultados da viabilidade dos macrófagos (DH82) após serem tratados com as mesmas concentrações estudadas para as promastigotas e nas mesmas condições, estão demonstrados a seguir (Figura 11).

Figura 11 – Média da viabilidade de células de macrófagos DH82, após 48h de exposição aos extratos FMN *(folhas Morus nigra);* FAO *(Folhas Anacardium occidentale);* FPA *(folhas Pereskia aculeata);* FEU *(folhas Eugenia uniflora);* EEM *(partes aéreas Momordica charantida)* e FPG *(folhas Psidium guajava)*, mais os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), ANF (Anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}). As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

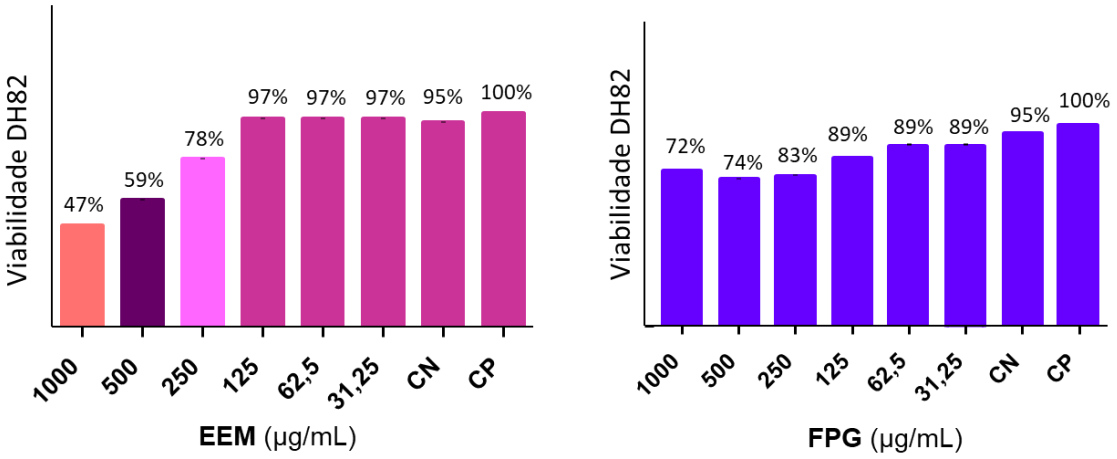


Fonte: O autor.

Ao teste de Tukey não houve diferença significativa (p=0,05) na viabilidade dos macrófagos DH82 tratados com os extratos FMN, FAO e FPA nas concentrações de 62,5µg e 31,25µg/mL, e com o CN e o CP. O extrato FEU não apresentou diferença estatística entre as médias de viabilidade considerada significativa nas concentrações de 125µg; 62,5µg e 31,25µg/mL.

Os extratos FPG e EEM não apresentaram distribuição normal nos dados obtidos. Então, foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis para avaliar a significância dos valores médios de viabilidade, o resultado do teste indicou que não há diferença estatística significativa entre os valores médios de viabilidade das células DH82 tratadas com os extratos FPG e EEM em todas as concentrações testadas (p=0,05) (Figura 12).

Figura 12 – Média da viabilidade de células de macrófagos DH82, após 48h de exposição aos extratos EEM *(partes aéreas Momordica charantida)* e FPG *(folhas Psidium guajava)*, mais os controles, CN1 (meio schneider completo e promastigotas), CN2 (DMSO, 0,2%), ANF (Anfotericina B, 5 µg/mL^{-1}). As barras seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença entre si pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de significância.



Fonte: O autor

O tratamento dos macrófagos com o extrato FAO, não apresentou médias de viabilidade consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p=0,05), nas concentrações de 1000µg/mL e 500µg/mL quando comparadas com as médias de viabilidade obtidas para o tratamento das promastigotas de *L. infantum* com o mesmo extrato nas concentrações de 125µg/mL e 61,5µg/mL. Os resultados médios de viabilidade do teste de citotoxicidade na concentração

de 500µg/mL do extrato FAO, não apresentou diferença estatística pelo teste de Tukey (p=0,05), quando comparado à concentração teste de 250µg/mL do teste de viabilidade com as promastigotas de *L. amazonensis*.

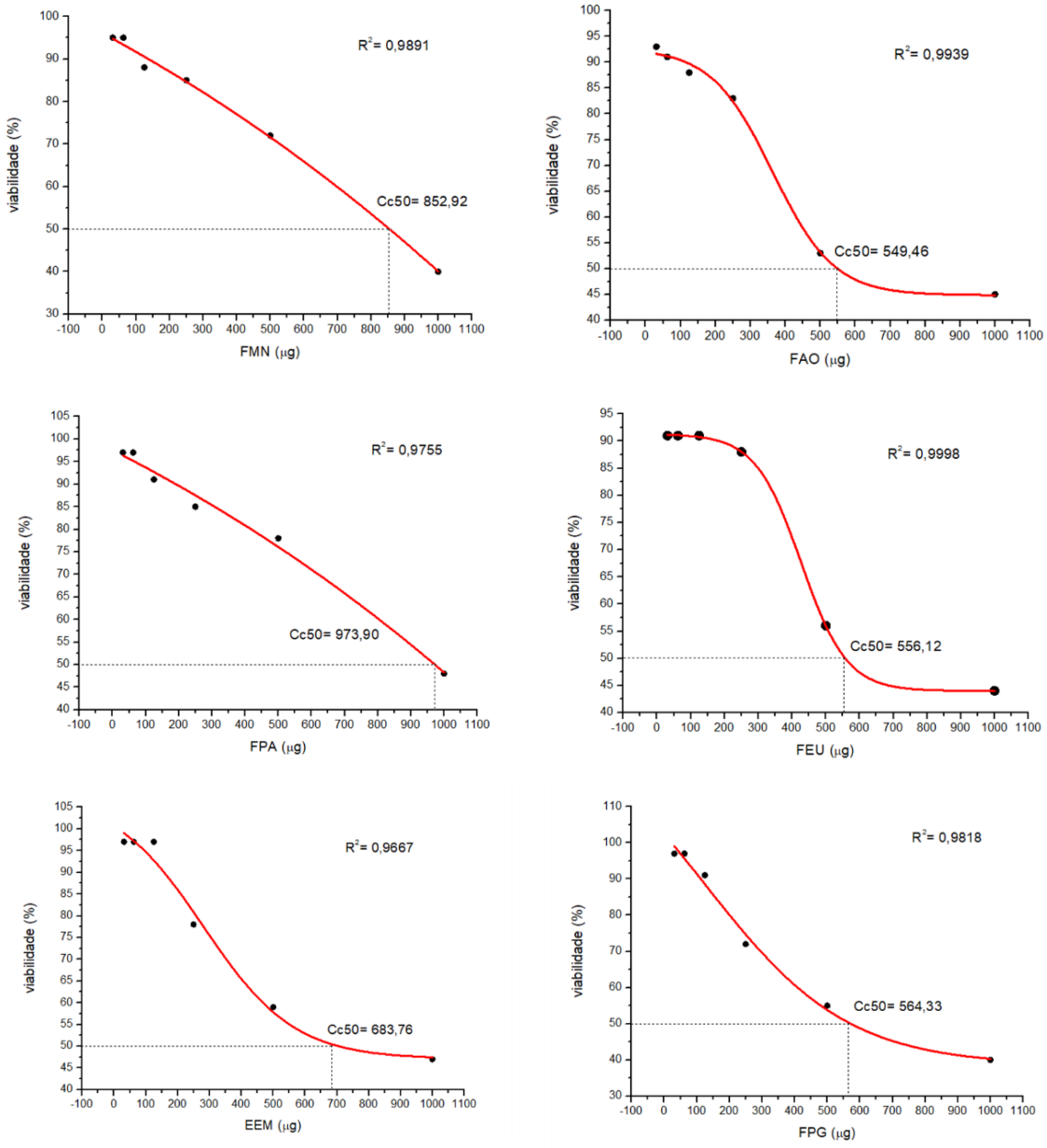
Os resultados de viabilidade obtidos no teste de citotoxicidade e no teste de viabilidade com promastigotas de *L. amazonensis,* no tratamento com o extrato FPA não apresentaram diferença entre as médias de viabilidades pelo teste de Tukey (p=0,05) nas concentrações testes de 62,5µg/mL e 31,25µg/mL.

Os resultados obtidos com o tratamento dos macrófagos com o extrato FEU no teste de citotoxicidade, quando comparados aos resultados obtidos com o tratamento das promastigotas de *L. infantum*, no teste de viabilidade, demonstrou que por meio do teste de Tukey a 5%, os resultados das médias de viabilidades obtidas na concentração de 1000µg/mL do extrato FEU sob as células de macrófagos não possuem diferença estatística na viabilidade média apresentada pelas promastigotas tratadas com 500µg/mL do mesmo extrato no teste de viabilidade.

O teste de viabilidade com extrato FEU realizado com promastigotas *de L. amazonensis*, demonstraram, que quando avaliam-se as viabilidades médias obtidas com os resultados encontrados para o mesmo extrato no teste de citotoxicidade sob macrófagos, os dados de viabilidade encontrados para o CN adotado no teste de viabilidade não apresentam diferença estatística por meio de Tukey (p=0,05), entre as concentrações de 31,25µg/mL e 62,5µg/mL do mesmo extrato no teste de citotoxicidade com macrófagos.

A determinação da concentração citotóxica (CC_{50}) responsável por matar 50% da população de macrófagos foi de: 852,92 µg/mL para o extrato FMN, 549,46 µg/mL para o FPA, 973,9 µg/mL para o FAO, 556,12 µg/mL para o FEU, 683,76 µg/mL para o extrato EEM e 564,33 µg/mL para o extrato FPG (Figura 13).

Figura 13- Valores de CC_{50} (µg/mL), dos extratos FMN (folhas *Morus nigra*); FAO (Folhas *Anacardium occidentale*); FPA (folhas *Pereskia aculeata*); FEU (folhas *Eugenia uniflora*); EEM (partes aéreas *Momordica charantia*) e FPG (folhas *Psidium guajava*), em macrófagos da linhagem DH82 obtidos por regressão não-linear.



Fonte: O autor.

A citotoxicidade de *Eugenia uniflora* e de *Momordica charantia,* avaliada por Santos *et al*. (2013), foi considerada alta contra os fibroblastos NCTC 929, por isso, os autores concluíram que são necessários mais estudos com

compostos isolados dessas plantas e posterior avaliação *in vivo* (SANTOS *et al*., 2013).

O extrato bruto das folhas de *P. aculeata* apresenta boa atividade antimicrobiana, principalmente o etanólico, e com base em estudos sobre células neuroblastomas (SH-SY5Y) as substâncias testadas demonstraram-se atóxicas nas concentrações de 0,01µg/mL e 100µg/mL (SOUZA *et al*., 2016). Assim como o registrado por Souza em 2016, o extrato FPA, foi o mais seletivo ao parasito (tabela 03), considerado atóxico, com IS de 28,83 para a espécie *L. infantum.*

4.3 Índice de seletividade (IS)

O IS consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC_{50}) para células DH82 e o IC_{50} para protozoários. Indica a seletividade dos extratos, quanto maior o IS, mais eficiente o extrato é considerado.

Os resultados de IS estão demonstrados na Tabela 03. Para a espécie *L. amazonensis* temos o extrato EEM o mais eficiente com maior índice de seletividade (1,45) acompanhado do extrato FPA com IS de 1,33. Isso significa que esses extratos são 1,45 e 1,33 vezes menos tóxicos para as células DH82 do que para os protozoários.

Para as formas promastigotas de *L*. *infantum,* o extrato com maior IS foi o FPA (28,83) seguido pelo EEM com um IS de 11,92.

Os extratos que apresentaram efeitos leishmanicidas promissores foram os extratos das folhas de Pereskia aculata com IC_{50} de 33,78µg/mL e o extrato das partes aéreas de *Momordica charantia* com IC_{50} de 57,36µg/mL sobre as formas promastigotas de *Leishmanio*se da espécie *L. infantum*. Os testes com parasitos da espécie *L. amazonensis*, não apresentaram resultados que possam ser considerados promissores.

Tabela 03 - Valores do índice de seletividade das formas promastigotas das espécies de *L. infantum* e *L. amazonensis* tratadas com os extratos etanólicos das folhas e partes aéreas de plantas do RENISUS.

Extratos	**Índice de Seletividade**	
	L. infantum	*L. amazonensis*
FMN	8,45	0,96
FAO	7,15	0,55
FPA	28,83	1,33
FEU	5,29	0,55
EEM	11,92	1,45
FPG	3,97	0,99

FMN (folhas *Morus nigra*); FAO (Folhas *Anacardium occidentale*); FPA (folhas *Pereskia aculeata*); FEU (folhas *Eugenia uniflora*); EEM (partes aéreas *Momordica charantida*) e FPG (folhas *Psidium guajava*).

5. CONCLUSÃO

Os melhores resultados obtidos foram oriundos do tratamento das promastigotas de *L. infantum* com os extratos etanólicos das folhas de *P. aculeata* (FPA) e, das partes aéreas de *M. charantia* (EEM). De fato o melhor resultado de IC_{50} obtido para o teste com a promastigota com a espécie de *L. infantum* foi o do extrato FPA (33,78 µg/mL), já para a *L. amazonensis* o extrato que obteve o melhor índice foi o EEM (468,98 µg/mL), seguido pelo FPA (728,36 µg/mL).

O extrato FPA foi considerado 28,83 vezes menos tóxico as células DH82 (macrófagos) do que ao parasito por meio do teste de citotoxicidade. Todos os testes demonstraram inatividade contra *L. amazonensis,* por meio de IC_{50} superior à 250µg/mL. Em ambas as espécies do parasito, a atividade dos extratos aumentam conforme aumenta-se a concentração teste, mas, em nenhuma das concentrações testes obteve-se resultado de inibição do crescimento parasitário superior ao da anfotericina B.

Por fim, foi possível demonstrar neste trabalho o potencial terapêutico dos produtos naturais.

6. REFERÊNCIAS

ADEYEMI, O.; AKANJI, M. A.; OGUNTOYE, S.A.; EKANEM, J.T.; AKANJI, M.A.; ODUTUGA, A.A. Host and parasite derived factors during mammalian African trypanosomiasis. **Biokemistri**. v. 4, p.103-116, 2009.

AJILEYE, O.O.A.; OBUOTOR, E.M.B.; AKINKUNMI, E.O.C.; ADEROGBA, M.A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from Anacardium occidentale L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University Science**. v. 27, p. 244–252, 2015.

ALAMAR BLUE. Product Datasheet, BUF012A/B, **AbD Serotec**, 2008.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. **Plantas que curam.** São Paulo: Ed. Três, 1983.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, K. **Enciclopédia de plantas brasileiras.** São Paulo. Editora:Três,1988.

AMARAL, T. Leishmaniose Visceral Canina: um alerta para saúde pública. **Revista Cães e Gatos**. v. 123, p. 20-25, 2009.

AMIDON, G.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, p.413, 1995.

ANDRADE-NETO, V. V.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ATELLA G. C.; FERNANDES, T. DE A.; COSTA, P. R. R.; TORRES-SANTOSA, E. C. Antileishmanial activity of ezetimibe: inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles and efficacious in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6844-52, 2016.

ARRUDA, G. J. B.; ROSSANEZI, G.; SCARPA, M. V.; DO EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, A. G. Estratégias tecnológicas para formulações de anfotericina B em sistemas lipídicos disponíveis no mercado farmacêutico e outros promissores sistemas de administração. **Infarma**, v. 28, n. 1, p. 59-67, 2016.

ARTACHO, N. S. **A leishmaniose no brasil e o conflito ideológico: eutanásia ou tratamento?.** Trabalho de conclusão do curso de Medicina Veterinária, da UniFMU. São Paulo, 2009.

BALAÑA-FOUCE, R.; REQUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435, 1998.

BARBOSA, T. P.; SOUSA, S. C. O.; AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; ASSIS, P. A. C.; CALDAS, J. P. A.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Bioorg. Med. Chem**. v. 19, p. 4250, 2011.

BARRAL, A; COSTA, J. *Leishmania*s e Leishmaniose Tegumentar nas Américas. **Fundação Osvaldo Cruz** (FIOCRUZ): Bahia, 2011.

BARRATT, J. L. N.; HARKNESS, J.; MARRIOTT, D.; ELLIS, J. T.; STARK, D. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n.4, p. 795–836, 2010.

BARRETT, M.P.; CROFT S.L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Br. Med. Bull**. v.104, p. 175–196, 2012.

BOUTIGNON, F.; HUET, G.; DEMEYER, D.; RICHET, C.; DEGAND, P. Study of proteolytic activities released by incubation of trypanosomes (Trypanosoma brucei brucei). **Biochem. Biophys.** 1990.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmania and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J. Ethnopharmacol**. v.111, n.2, p.396-402, 2007.

BRAND, C.S.; HOCKER, H.J; GORFE, A.A.; CAVASOTTO, C.N.; DESSAUER, C.W. Isoform selectivity of adenylyl cyclase inhibitors: Characterization of known and novel compounds. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. v. 347, p. 265–275, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: **recomendações clínicas para redução da letalidade / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

CAROSELLI, E. E. **Caracterizacao da atividade peptidasica de lisado e celulas integras de amastigotas e promastigotas de** *Leishmania* ***(L.)*** *amazonensis***.** Tese de doutorado, UNIFESP, 2012.

CHANNON, J.Y.; ROBERTS, M.B.; BLACKWELL, J.M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**; 53: 345-355, 1984.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S. PEELING, R.W. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol**. v. 5, n.11, p.873-82, 2007.

COGOA, J. J.; CANTIZANIB, J.; COTILLOB, I.; SANGIC, D. P.D.; CORRÊA, A. G.; UEDA-NAKAMURAA, T.; DIAS FILHO, B. P.; MARTÍNB, J. J.; NAKAMURAA C. V. Quinoxaline derivatives as potential antitrypanosomal and antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.26, p. 4065–4072, 2018.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of Eugenia uniflora (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **J. Ethnopharmacol**. v. 81, n.1, p. 57-63, 2002.

COUTINHO, H.D.M; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA Jr, J.P.; LIMA E.O. Potentiation of antibiotic activity by Eugenia uniflora and Eugenia jambolanum. **J. Med. Food**. v.13, n.4, p.1024-6, 2010 (a).

COUTINHO, H.D.M; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA Jr, J.P.; LIMA E.O. In vitro screening by phototoxic properties of Eugenia uniflora L., Momordica charantia L., Mentha arvensis L. and Turnera ulmifolia L. **Rev Bras Bioci**. v.8, n.3, p.299-301, 2010 (b).

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, p. 132-141, 2002.

DA SILVA, R.P.; HALL, B.F.; JOINER, K.A.; SACKS, D.L. CR1, the C3b receptor mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **J. Immunol**. n.143, p.617-622, 1989.

DENNY, C.; MELO, P.S.; FRANCHIN, M. Guava pomace: a new source of anti-inflamatory and analgesic bioactives. **BMC Compl Altern**.; v.13, p.2–7, 2013.

DORLO, T.P.; THIEL, V.P.P.; HUITEMA, A.D.; KEIZER, R.J.; VRIES, H.J. DE; BEIJNEN, J.H. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.8, p.2855-60, 2008.

EKANEM, J.T. Extracellular fractions derived from Trypanosoma brucei activate erythrocyte Ca2+- ATPase. **Med. Sci. Res.** v.17, p. 739-740,1989.

EKANEM, J.T.; AKANJI, M.A.; ODUTUGA, A.A. Extracellular proteins of Trypanosoma brucei origin lyse erythrocytes of rats in vitro. **Biokemstri**. v. 6, p. 21-29, 1996.

EMBRAPA. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Sistemas de produção: cultivo do cajueiro. Versão eletrônica, n. 1. 2003. Disponível em: < https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckhw7l702wx5eo0a2ndxydw61k0r.html > Acesso em: 29 set. 2013.

FARIA, F.A.; BUENO, C.J.; PAPA, M.F.S. Atividade fungitóxica de Momordica charantia L. no controle de Sclerotium rolfsii Sacc. **Acta Scientiarum Agr**. v. 31, n. 3, p. 383-389, 2009.

FERNANDES, N.P.C.; LAGISHETTY, C.V.; PANDA, V.S.; NAIK, S.R. An experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized Momordica charantia fruit extract. **BMC Complement Altern Med**. v. 7, p.1-8, 2007.

FRANCA, F.; CUBA, C.A.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.; ALMEIDA, M.; Das VIRGENS, M.L.; MARSDEN, P.D. Evolution of the effect of a bark extracts from

the cashew (*A. occidentale* L.) on infection by *L.(viannia) brasilienses*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 26, p.151-155, 1993.

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 243-248, 1993.

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). **Fiocruz desenvolve novo medicamento contra leishmaniose cutânea. Publicação 2013.** Disponível em: https://agencia.fiocruz.br/fiocruz-desenvolve-novo-medicamento-contra-leishmaniose-cutanea. Acesso em: 16 de Setembro de 2018. (B)

Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos (FIOCRUZ). Publicado em 2014. Disponível em: https://www.bio.fiocruz.br/index.php/43-produtos/reativos/450-leishmaniose-sintomas-transmissao-e-prevencao-ifi-humana. Acesso em: 23 de Maio de 2019.

Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunomodulação. (FIOCRUZ). Publicado em 1997. Disponível em: < http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm>. acesso em: 23 de Maio de 2019.

FURTADO T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J, **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda. p. 319-328, 1994.

GIL, E.S.; PAULA, J.R.; NASCIMENTO, F.R.F.; BEZERRA, J.C.B. Produtos Naturais com potencial leshimanicida. **Ver. Ciênc. Far. Básica e Apl**. v. 29, n.3, p. 223-230, 2008.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GRAJEK, K.; WAWRO, A.; KOKOCHA, D. Bioactivity of *Morus alba* L. extracts an overview. **IJPSR**. v. 6, p. 3110–3122, 2015.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 494, 2002.

GRUPTA, S.; RAYCHAUDHURI, B.; BANERJEE, S. DAS B.; MUKHOPADHAYA, S.; DATTA, S.C. Momordicatin purified from fruits of Momordica charantia is effective to act as a potent antileishmania agent. **Parasitol Int.** v. 59, n. 2, p.192-197, 2010.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** v. 97, n.7, p.1027-31, 2002.

IQBAL, H. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. **Asian Journal of Tropical Disease**, v. 15, p. 60975-60976, 2016.

JOLY, V.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; SAINTJULIEN, L.; BOLARD, J.; CARBON, C.; YENI, P. Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture. **The Journal of Infectious Diseases**, v.165, p.337, 1992.

JOSEPH, B.; PRIYA, M. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Guava (Psidium guajava Linn). **Int J Pharm Biol Sci.** v.2, p. 53–69, 2011.

JUVEKAR, A.R.; HULE, A.K.; SAKAT S.S.; CHAUGHULE, V.A. In vitro and in vivo evaluation of immunomodulatory activity of methanol extract of Momordica charantia fruits. **Drug Inv Today**. v.1, p.89-94, 2009.

KHALID, N.; FAWAD, S.A.; AHMED, I. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (Morus nigra L.) fresh juice. **Pak. J. Bot**. v. 43, p.91–96, 2011.

KOSTIC, D.A.; DIMITRIJEVIC, D.S.; MITIC, S.S.; MITIC, M.N.; STOJANOVIC, G.S. A survey on macro- and micro-elements, phenolic compounds, biological activity and use of Morus spp. (Moraceae). **Fruits**. v. 68, p. 333–347. 2013.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, 2007.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica **Rev. Pan-Amaz Saude** v.1, n.2, p.13-32, 2010.

LAINSON, R. The american leishmaniasis: some observations and on their and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 7: 569, 1993.

LEAL, G. G. de A. **Efetividade da coleira impregnada com deltametrina na redução da incidência da leishmaniose visceral canina.** Tese de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto . Ouro Preto, 2017.

LLANOS-CUENTAS, ELMER A. *et al*. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil: an area of *Leishmania* braziliensis braziliensis transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, n. 4, p. 169-177, 1984.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa.** Editora: Plantarum, 1995.

MACHADO, A.J.T.; SANTOS, A.T.L.; MARTINS, G. M. A. B.; CRUZ, R.P.; COSTA, M.S.; CAMPINA, F.F.; FREITAS, M. A.; BEZERRA, C.F.; LEAL, A.L.A.B.L.; CARNEIRO, J.N.P.; CORONEL, C.; ROLON, M.; GOMEZ, C.V.; COUTINHO, H.D.M.H.; MORAIS-BRAGA, M.F.B. Antiparasitic effect of the

Psidium guajava L. (guajava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC. (araçá-de-verde) extracts. **Food and Chemicaal toxicology,** v. 119, p.275-280, 2018.

MAHMOUDVAND H.; DEZAKI E.S.; EZATPOUR B.; SHARIFI I.; KHEIRANDISH F.; RASHIDIPOUR M. In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activities of Pistacia vera Essential Oil. Published online. **Planta Med** © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York, 2015.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Nota Técnica nº 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa. **Coordenação De Fiscalização De Produtos Veterinários**. Bairro Zona Cívico-Administrativa - DF, 2016.

MARCONDES M. Leishmanioses. In: Larsson e Lucas, **Tratado de Medicina Externa**. 1. ed. São Paulo. Interebook Editorial. pp. 313-344, 2016.

MAYRINK, W. *et al*. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**. v. 39, n .1, p.14-21, 2006.

MENDES, C. S. *et al*. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 263-272, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana.** Versão eletrônica, 2017.

MONTEIRO, S. G**. Parasitologia na medicina veterinária.** São Paulo: Roca, 2011 (1). 356 p.

MORAIS, R. C. S. de *et al*. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania*. 2015.** Tese de Doutorado.

MOSSER DM, BURK SK, COUTAVAS EE, WEDGEWOOD, JF, EDELSON PJ. *Leishmania* species: mecanisms of complement activation by five strains of promastigotes. **Exp Parasitol**, v.62, p.394-404, 1986.

MOSSER, D.M.; EDELSON, P. J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. **J Immunol**, v.132, p.1501-1505, 1984.

MURRAY H.W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **J Exp Med.** v.153, p.1302-1315, 1981.

NAKAMURA, C. V. *et al*. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NAKAGAYA, Y. The Structure of the Biomolecular Complex between Amphotericin B and Ergosterol in Membranes Is Stabilized by Face-to-Face van der Waals Interaction with Their Rigid Cyclic Cores. **Biochemistry**, v. 55, p. 3392-3402, 2016.

NASCIMENTO, R.J. **Potencial antioxidante de resíduo agroindustrial de goiaba**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos). Universidade de Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

NDJONKA, D.; AGYRE, C.; LÜERSEN, K.; HENSEL, A.; LIEBAU, E. In vitro Anti-leishmanial Activity of Traditional Medicinal Plants from Cameroon and Ghan Int. **International Journal of Pharmacology**, v.6, n.6, p.863-871, 2010.

NEUBER, H. *Leishmania*sis. **Journal der Deutchen Dermatologischen** Gesellschaft, v.9, p.754-765, 2008.

NEVES, D. P. *et al*. **Parasitologia Humana**. 12ª ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016.

NOGUEIRA, F. Dos S. **Tratamento da leishmaniose visceral canina:** Resultados preliminares, Manifestação Clínica. Simpósio paulista de leishmaniose visceral**,** São Paulo, SP. Ago, 2015.

NWAGWU, M.; OKENU, D.M.N.; OLUSI, T.A.; MOLOKWU, R.I. Trypanosoma brucei releases proteases extracellularly. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 82, p. 577, 1987.

OJEWOLE, J.A. Potentiation of the antiinflammatory effect of Anacardium occidentale L. stem bark extract by grape fruit juice. **J. Clin. Pharmacol.** v.26, p.183-188, 2004.

OLIVEIRA, G.G.S.; SANTORO, F.; SADIGUSKY, M. OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. The subclinical form of Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica,** v. 118, n.2, p. 87-96, 2011.

OLLIARO, P.L.; GUERIN, P.J.; GERSTL, S.; HAASKJOLD, A.A.; ROTTINGEN, J.A.; SUNDAR, S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **Lancet Infect Dis**., v. 5, n.12, p.763-74, 2005.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitol**. v. 29, n.7, p. 339-45, 2013.

OZGEN, M.; SERCE, S.; KAYA, K. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyaninrich *Morus nigra* L. and *Morus rubra* L. fruits. Sci. Hortic. v.119, p.275–279, 2009.

PEARSON, R.D. Manual MSD. Leishmaniose. 2014. Disponível em: https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios-extraintestinais/leishmaniose>. Acesso em: 16 de Março de 2019.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p.970–974, 2008.

PHILIP,K.;MALEK,S.N.A.;SANI,W.;SHIN,S.K.;KUMAR,S.;LAI,H.S.;SERM,L.G.; RAHMAN,S.N.S.A. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Malaysia. **Am. J. Appl. Sci**. v. 6, p. 1613–1617, 2009.

PIMENTA, P.F.; SILVA, R. da; SACKS, D.L.; SILVA, P. da. Cell surface nano nanatomy of *Leishmania major* as reveled by fractureflip. A suface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. **Eur J Cell Biology**; v. 48, p.180-190, 1989.

PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science,** v. 256, n.5065, p.1812-1815. 1992.

PINTO, N.C.C. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas das folhas de *Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE**). 2016. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

PINTO, N.D.C.C.; SCIO, E. The biological activities and chemical composition of Pereskia species (Cactaceae). A review. **Plant Food Hum. Nutr**. v. 69, p.189–195, 2014.

PLANO, D.; BAQUEDANO, Y.; MORENO-MATEOS, D.; FONT, M.; JIMÉNEZ-RUIZ, A.; PALOP, J. A.; SANMARTÍN, C. **Eur. J. Med. Chem**. v. 46, p. 3315, 2011.

POMMER, C.V.; MURAKAMI, K.R.N.; WATLINGTON, F. Goiaba no mundo. **O Agrônomo**, Campinas, v.58, p.22-26, 2006.

PURKAIT, B.; KUMAR, A.; NANDI, N.; SARDAR, A. H.; DAS, S.; KUMAR, S.; PANDEY, K.; RAVIDAS, V.; KUMAR, M.; DE, T.; SINGH, D.; DAS, P. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.1031, 2012.

QADIR, M.I.; ALI, M.; IBRAHIM, Z. Anticancer activity of *Morus nigra* leaves extract. **Bangladesh J. Pharmacol**. v.9, p.496–497. 2014.

RAMESH, H.L.; SIVARAM, V.; YOGANANDA MURTHY, V.N. Antioxidant and medicinal properties of mulberry (*Morus* sp.): a review. **WJPR**. v. 3, p.320–343. 2014.

ROOPASHREE, T.S.; DANG, R.; SHOBHA, R.; NARENDRA, C. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: Cassia tora, Momordica charantia and Calendula officinalis. **Int J Appl Res Nat Prod**. v.1, n.3, p. 20-28, 2008.

ROZANE, D. E.; OLIVEIRA, D.A.; LIRIO, V.S. **Importância econômica da cultura da goiabeira.** Disponível em:< http://www.nutricaodeplantas.agr.br/site/ensino/pos/Palestras_William/Livrogoiaba_p df/13_importanciaeconomica.pdf> Acesso em: 25 de Maio de 2019.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845, 2002.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Rev Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SAKAGAMI, H.; ASANO, K.; SATOH, K.; TAKAHASHI, K.; KOBAYASHI, M. Anti-stress, anti-HIV and vitamin C-synergized radical scavenging activity of mulberry juice fractions. **In vivo**. v. 21, p. 499–506, 2007.

SANTOS, K.K.A.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; DE ARIAS, A.R.; DA COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v. 34, p. 47-50, 2013.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-*Leishmania* drug discovery and development. **Open Med Chem J***. v.5*, p. 31-39, 2011.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESTRE, J.L. Effi cacy of second line drigs on antimonyl-resistant amastiogotes of *Leishmania* infantum. **Acta Trop**. v.74, p.25-31. 2000.

SHARIF, K.M.; RAHMAN, M.M.; ZAIDUL, I.S.M.; JANNATUL, A.; AKANDA, M.J.H.; MOHAMED, A.; SHAMSUDIN, S.H. Pharmacological relevance of primitive leafy Cactuses *Pereskia*. **Res. J. Biotechnol**. v. 8, p.134–142, 2013.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **J. Ethno. Pharmacol**. v.104, n. 3, p. 367-73, 2006.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Tropical Ciências Agrarias e Biologia**, v.1, n.1, p. 20-31, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 1104, 2010.

SINDERMANN H.; ENGEL J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **R. Soc. Trop. Med. Hyg**. v.10, n.1, p.17-20, 2006.

SINGH B.; SUNDAR S. *Leishmania*sis: vaccine candidates and perspectives. v. 30, p.3834-3842, 2012.

SOBARZO-SANCHEZ, E., BILBAO-RAMOS, P., DEA-AYUELA, M., GONZALEZ-DIAZ, H., YANEZ, M., URIARTE, E., SANTANA, L., MARTINEZ-SERNANDEZ, V., BOLAS-FERNANDEZ, F., UBEIRA, F.M. Synthetic oxoisoaporphine alkaloids: in vitro, in vivo and in silico assessment of antileishmanial activities. **PLoS One** 8, e77560, 2013.

SOTO, J.B; ARANA A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEJA, J.C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARSOLEDA, M.; BEKMAN, J.D.; JUNGE, R; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. Miltefosine for the new world cutâneos leishmaniasis. **Clinical infections Diseases.** v.38, n.9, p. 1266-1272, 2004.

SOUZA, L. F.; CAPUTO, L.; De BARROS, I.B.I.; FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; De FEO, V. Pereskia aculeata Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **Int. J. Mol. Sci**. v. 17, p. 1478, 2016.

SUNDAR S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**; v.6, n.11, p.849-854. Erratum in: Trop Med Int Health 2002a; v.7, n.3, p.293, 2001.

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

SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, p. 394, 2005.

TARIQ S.; SOMAKALA K.; AMIR M. Quinoxaline: an insight into the recent pharmacological advances. **Eur. J. Med. Chem.** v.143, p. 542–557, 2017.

TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. A. E.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SILVA J.I. Avaliação da capacidade leishmanicida de espécies vegetais do cerrado. **Rev. Patol. Trop**. v.44, n.1, p.45-55, 2015

THAPANON, S.; SUPAPORN, K.H.; SOMCHAI, L.; JAROON, J.; GARY, D.C.; KATE, G. Exploiting guava leaf extract as an alternative natural reagent for flow injection determination of iron. International Conference on Flow Injection Analysis Talanta. v. 68, n. 2, 2005.

TRISTÁN-MANZANO M.; GUIRADO A.; MARTÍNEZ-ESPARZA M.; GÁLVEZ J.; GARCÍA-PEÑARRUBIA P.; RUIZ-ALCARAZ A.J. Quinoxalines potential to target pathologies. **Curr Med Chem**. v. 22, p.3075–3108, 2015.

UMUKORO, S.; ASHOROBI, R.B. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of aqueous leaf extract of Momordica charantia in rats. **Afr J Biomed Res**. v. 9, n.2, p.119 -124, 2006

VELAZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**. v. 74, n. 1-2, p. 91-7, 2003.

WHO - World Health Organization. ***Leishmania*sis**, Publication 2018. Disponível em: http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis. Acesso em: 26 de Março de 2019.

WILSON, R.; BATES, M. D.; DOSTALOVA, A.; JECNA, L.; DILLON, R. J.; VOLF, P.; BATES, P. A. Stagespecific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4(9), 1–9, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniases**: Report of a meeting March 2010, WHO Technical report series; 949, Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Health topics:** *Leishmania*sis, 2011. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/en. Acesso em: 26 de Março de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**.** *Leishmania*sis, **Publication** 2016. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en. Acesso em: 07 de Abril de 2019.

WRIGHT, S.D.; SILVERSTEIN, S.C. Receptor for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J. Exp. Med**., v.158, p.2016-2023, 1983.

ZUO, X.; *et al*. Miltefosine induces apoptosis-like cell death in yeast viaCox9p in cytochrome c oxidase. Mol**. Pharmacol**. v. 80, p. 476–485, 2011.

ZURLO, C.; MITZI, B. Ervas daninhas do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Globo, 1989.