



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,
ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – FACFAN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC
MESTRADO - BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

ANA MARIA DE ANDRADE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE EXTRATOS DE ESPÉCIES
DE PLANTAS NATIVAS DO MATO GROSSO DO SUL**

Campo Grande/MS

2021

ANA MARIA DE ANDRADE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE EXTRATOS DE ESPÉCIES
DE PLANTAS NATIVAS DO MATO GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, sob orientação da Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul.

Campo Grande/MS

2021

ANA MARIA DE ANDRADE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE EXTRATOS DE ESPÉCIES
DE PLANTAS NATIVAS DO MATO GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, sob orientação da Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul.

Campo Grande/MS, 06 de Dezembro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul

Instituição: FACFAN/UFMS

Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda

Instituição: INBIO/UFMS

Profº. Dr. Warley de Souza Borges

Instituição: Dep. Química/UFES

**Dedico este trabalho aos meus pais, Valéria e Reginaldo,
meus eternos guias nos preceitos do amor e da ciência.**

AGRADECIMENTOS

O momento da elaboração destes agradecimentos é único e emocionante. Fez-me olhar para meu interior e por toda a trajetória seguida até o momento. Às vezes os caminhos da vida nos fazem esquecer, ou pegar estradas mais longas, mas, na hora certa, sempre encontramos o que é pra ser nosso “destino”. Afinal, há alguns anos, percebi/relembrei o meu maior sonho de criança: ser professora. Era simplesmente demais “brincar” disso, e era a melhor “brincadeira” do mundo todo pra mim. E aqui estou, acredito que no rumo certo, que sempre foi pra ser, e que prefiro chamar de “equilíbrio do meu Universo”.

Agradeço a Deus pela proteção e condução no caminho da sabedoria, e pela luz em todos os momentos.

Nada disso seria possível sem o apoio dos meus pais, que desde quando posso me lembrar, sempre estiveram ensinando-me e sendo exemplos de pais, professores da vida e excelentes profissionais. Sou muito iluminada por tê-los como pais e imensamente grata por tudo que fizeram por mim, desde sempre. Obrigada pelo apoio em seguir meus sonhos, por acreditarem em mim e também por fazerem com que eu mesma acreditasse. Não tenho palavras para expressar tanto. Amo vocês.

Agradeço a minha orientadora, Thalita Bachelli Riul, por ser sempre tão gentil, inteligente, compreensiva e empenhada em ajudar no que fosse necessário para concretizarmos este trabalho. Sou sua fã profe. Gratidão!

Sou grata a meu noivo Augusto, e muito feliz por ter ao meu lado uma pessoa incrível, que me apoia, acalma e confia no meu potencial. Obrigada pela paciência e companheirismo nestes últimos dias que antecedem a defesa, e também pelo café para me manter alerta e os chocolates para acalmar o coração. Amo você.

A todos os familiares pelo carinho, amor, apoio e risadas. Em especial, agradeço ao meu avô, comendador Waldir (*In memoriam*) por sempre sonhar em ver os netos “Drs e cobras”, gostaria de compartilhar esse título com o senhor! Gratidão por tudo.

Agradeço a minha prima/irmã MSc. Liliane pela amizade, conselhos, cumplicidade e por compartilhar sempre as melhores risadas.

A minha tia Márcia pelo apoio, amparo, amor e felicidade. És um exemplo de mulher e mãe. Obrigada por ser minha mãe nº2.

Aos meus amigos de sala, os Biotops: Laís, Guilherme e Raquel. Obrigada pela amizade, compartilhamento de momentos, acalentos, tormentos (hahaha), e por fazerem dessa jornada mais feliz e engraçada.

A minha amiga Camila Maria da DIP, uma pessoa de luz e coração enorme. Grata por ter lhe conhecido, pela amizade e por tudo.

As colegas Amarith e Fernanda do laboratório de parasitologia, apenas gratidão à vocês pela ajuda nos experimentos, pelas risadas, enfim, foi muito bom trabalhar com vocês, Agradeço também a profa. Carla Arruda por abrir as portas do lab e nos ajudar em momentos de correria. Grata ao Pedro e todo pessoal do lab de parasitologia humana.

Aos colaboradores do LAC, em especial a Maria, por sua gentileza e por fazer o café mais saboroso da UFMS. Agradeço aos colegas do LPPFB, em especial ao técnico Vinícius Cristani pela ajuda nas diversas leituras.

A Mel Quideroli, amiga querida e colega de profissão. Obrigada pela parceria e compreensão nos momentos em que precisei conciliar o trabalho e as aulas no início do mestrado.

A minha equipe do Hospital Cassems pelos momentos de leveza e amizade.

A todos os professores que já tive que através de seus dons/mágicas de ensino, possibilitaram-me chegar até aqui. Gratidão!

A UFMS por proporcionar à comunidade e ao MS inserção e progresso da ciência.

Sou grata a todas as pessoas, amigos, colegas, e até desconhecidos, que contribuíram de maneira direta ou indireta para a conclusão deste trabalho e por tornarem meus dias mais felizes.

O Auto-Retrato

No retrato que me faço
– traço a traço –
às vezes me pinto nuvem,
às vezes me pinto árvore...

às vezes me pinto coisas
de que nem há mais lembrança...
ou coisas que não existem
mas que um dia existirão...

e, desta vida, em que busco
– pouco a pouco –
minha eterna semelhança,

no final, que restará?
Um desenho de criança...

Corrigido por um louco!

Mário Quintana

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, consideradas pela OMS como doenças tropicais negligenciadas, responsáveis por cerca de 30.000 mortes por ano, sendo endêmicas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Os tratamentos disponíveis dificultam a adesão pelo alto custo, administração parenteral e diversos efeitos colaterais. Considerando a vasta biodiversidade e levantamentos etnofarmacológicos em nosso país, a busca por tratamentos mais seguros e eficazes com produtos naturais é desafiadora e necessária. Assim, avaliamos a atividade *in vitro* de extratos vegetais da família Rubiaceae de *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata* e *Coutarea hexandra* contra *Leishmania amazonensis*. Observamos uma redução na viabilidade celular das formas promastigotas de *L. amazonensis* e uma redução nas amastigotas intracelulares em macrófagos infectados, e os índices de seletividade foram calculados nos quais os extratos de *Tocoyena formosa*, *Rudgea viburnoides* e *Randia armata* apresentaram valores de 6,7, 3,2 e 2,7, respectivamente. Com o objetivo de investigar algum mecanismo envolvido na atividade anti-*Leishmania*, a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados foi avaliada por meio da reação de Griess. A realização de estudos fitoquímicos e o fracionamento dos extratos serão essenciais para rastrear a atividade anti-*Leishmania* desses extratos.

Palavras-chave: Rubiaceae; *Rudgea viburnoides*; *Diodia kuntzei*; *Tocoyena formosa*; *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoans of the *Leishmania* genus, considered by the WHO as neglected tropical diseases, responsible for about 30,000 deaths per year, being endemic in Mato Grosso do Sul, Brazil. The available treatments make adherence difficult due to the high cost, parenteral administration and several collateral effects. Considering the vast biodiversity and ethnopharmacological surveys in our country, the search for safer and more effective treatments with natural products is challenging and necessary. Thus, we evaluated *in vitro* activity of *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata* and *Coutarea hexandra* plant extracts of the Rubiaceae family against *Leishmania amazonensis*. We observed a reduction in cell viability of promastigotes forms of *L. amazonensis* and a reduction in intracellular amastigotes in infected macrophages, and the selectivity indices were calculated in which *Tocoyena formosa*, *Rudgea viburnoides* and *Randia armata* extracts presented values of 6.7, 3.2, and 2.7, respectively. In order to investigate some mechanism involved in the anti-*Leishmania* activity, the production of nitric oxide by infected macrophages was evaluated using the Griess reaction. The realization of phytochemical studies and the fractionation of extracts will be essential to track the antileishmanial activity of these extracts.

Keywords: Rubiaceae; *Rudgea viburnoides*; *Diodia kuntzei*; *Tocoyena formosa*; *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida heteroxênico dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i> spp.	14
Figura 2 Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>Leishmania</i> spp.	14
Figura 3 Ferida ulcerada e única de Leishmaniose cutânea localizada	17
Figura 4 Feridas múltiplas de Leishmaniose cutânea disseminada	17
Figura 5 Feridas nodulares de Leishmaniose cutânea difusa (LCD)	18
Figura 6 Feridas ulceradas e edemaciadas de Leishmaniose cutâneo-mucosa (LM)	18
Figura 7 Estrutura do antimoniato de meglumina	23
Figura 8 Estrutura da Anfotericina B (AMB)	23
Figura 9 Partes da planta <i>Coutarea hexandra</i> ou Quina-quina. A - casca externa, B - folhas, flores e botões florais, C - flores e botões florais e D - frutos imaturos. .	29
Figura 10 Partes da planta <i>Tocoyena formosa</i> . A - espécimes floridos, B - superfície do tronco e casca interna, C - flores e botões florais e D - frutos próximos da maturação.	30
Figura 11 Flores de <i>Richardia grandiflora</i>	30
Figura 12 Partes da planta <i>Rudgea viburnoides</i> . A - casca externa e cor da casca interna, B - folhas jovens, C - inflorescências e folhas adultas, e D - frutos maduros.	31
Figura 13 Flores de <i>Diodia kuntzei</i>	32
Figura 14 Partes da planta <i>Randia armata</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB - Anfotericina B
ATP - Adenosina trifosfato
CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças
cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DTN's - Doenças tropicais negligenciadas
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EROs - Espécies reativas de oxigênio
EV - Endovenosa
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
IDRM - Teste intradérmico ou intradermorreação de Montenegro
IFI - Imunofluorescência indireta
IM - Intramuscular
LC – Leishmaniose cutânea
LCD - Leishmaniose cutânea difusa
LCL - Leishmaniose cutânea localizada
LD - Leishmaniose cutânea disseminada
LM - Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
LV - Leishmaniose Visceral
NNN - Meio de cultura Neal, Novy e Nicolle
NO - Óxido nítrico
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCR - Reação em cadeia da polimerase
SI - Sistema Imunológico

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 Doenças Negligenciadas	11
1.1.1 Leishmanioses	12
1.1.2 Manifestações clínicas.....	15
1.1.3 Diagnóstico	19
1.1.4 Controle	22
1.1.5 Tratamento	23
2 PRODUTOS NATURAIS NAS LEISHMANIOSES	25
2.1 Família Rubiaceae	27
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Geral:	34
4.1.1 Específico:	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO: <i>In vitro</i> antileishmanial activity of hydroalcoholic extracts from Rubiaceae family plants found in Brazilian Cerrado	40

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Doenças Negligenciadas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou um grupo de 20 doenças tendo origem principalmente infecciosa, causadas por bactérias, vírus, parasitas, dentre outros, como doenças tropicais negligenciadas (DTN's). Estas incluem: Dengue e Chikungunya, Dracunculíase (Doença do verme-da-Guiné), Doença de Chagas, Envenenamento por picada de serpentes, Equinococose, Esquistossomose, Filariose linfática (Elefantíase), Helmintíases transmitidas pelo solo, Leishmanioses, Hanseníase, Micetoma, Cromoblastomicose e outras micoses sistêmicas, Oncocercose, Boubá, Raiva, Escabiose e outros ectoparasitas, Teníase/ Cisticercose, Tracoma, Trematodíases transmitidas por alimentos, Tripanossomíase africana humana (Doença do sono) e Úlcera de Buruli (OMS, 2021a).

As doenças tropicais negligenciadas afetam principalmente países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, acometendo em grande proporção populações de baixa renda e de acesso limitado aos serviços sanitários e de saúde. Foram classificadas como negligenciadas devido ao investimento em pesquisa e erradicação serem insuficientes frente à magnitude e alta morbimortalidade geradas por elas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019)

Recentemente, a OMS publicou um roteiro bastante promissor para o enfrentamento das DTN's, referente ao período de 2021 a 2030. Neste material estão concentradas diversas estratégias que visam melhorar em pontos cruciais o cenário dessas doenças, tais como: prevenção efetiva, diagnóstico precoce e fácil acesso aos tratamentos pela população em risco (OMS, 2021a).

O impacto sobre a saúde causado por essas doenças pode ser subestimado devido ao fato de que muitas infecções são assintomáticas e estão associadas com períodos de incubação mais longos, tornando difícil estabelecer uma conexão entre uma morte particular e a infecção correspondente que está latente durante um longo período de tempo (MARTINS-MELO et al., 2018).

Em 2017, Mitra e colaboradores relataram que mais de um bilhão de pessoas eram portadoras de uma ou mais DTN's, e uma análise de distribuição global apresentou que a maior diversidade dessas doenças localiza-se no Brasil e em alguns países da América Central, África Oriental e no Iêmen, seguido por Índia, Bangladesh e China.

O Brasil registrou o maior número de casos da América Latina em diversas doenças negligenciadas. As distribuições geográficas são variadas, apresentando maiores índices em regiões de maior pobreza e de recursos escassos, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Algumas dessas doenças são classificadas como emergentes ou reemergentes, devido ao seu alto impacto pregresso, momentâneo e futuro, tendo como importantes exemplos a Doença de Chagas, dengue e as leishmanioses (MARTINS-MELO et al., 2018).

As leishmanioses permanecem como uma das doenças mais negligenciadas no mundo, afetando principalmente a África, Ásia e América Latina. O Brasil foi elencado dentre os países que apresentam maior número de casos globais tanto para leishmaniose visceral, quanto para leishmaniose tegumentar (OMS, 2021b).

1.1.1 Leishmanioses

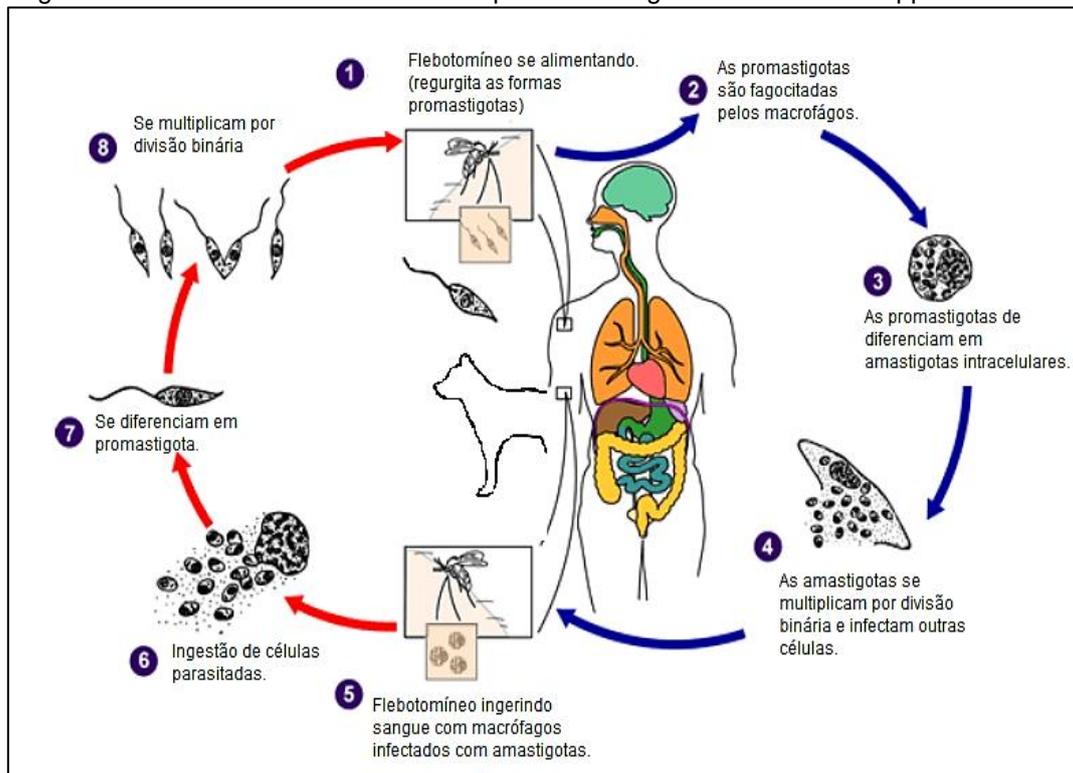
As Leishmanioses são doenças que podem acometer humanos e muitos animais. Ocorrem através da infecção por diferentes espécies de parasitas protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. São responsáveis por diferentes formas clínicas da doença, podendo ser divididas em dois tipos, de acordo com os órgãos que acometem: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que acomete pele e mucosas; e Leishmaniose Visceral (LV), em que a doença apresenta-se de forma sistêmica, principalmente em órgãos como fígado e baço, podendo ser fatal se não tratada (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019).

A transmissão ao homem se dá através da picada de pequenos vetores, insetos dípteros hematófagos da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Popularmente chamados de flebotomíneos ou mosquito-palha,

nas Américas, o gênero *Lutzomyia sp.* é o mais importante em termos de participação direta na transmissão e que demanda maior atenção, havendo mais de 400 espécies já identificadas, no entanto, pouco mais de 10% delas são consideradas como espécies potencialmente ligadas à transmissão das Leishmanioses (OPAS/OMS, 2017). As fêmeas do vetor são as responsáveis por manter o ciclo da doença (Figura 1), possuindo preferencialmente hábitos alimentares noturnos, e se infectam no ato do repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado (MANN et al., 2021).

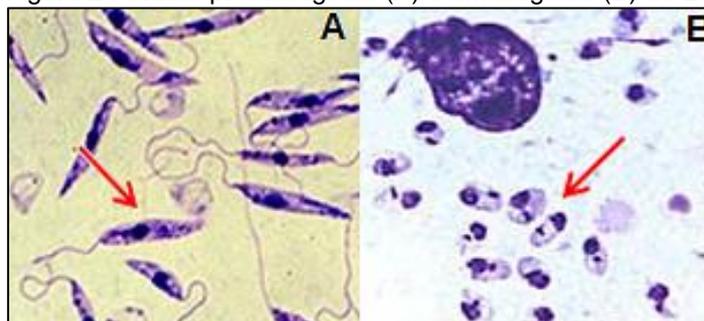
Os protozoários do gênero *Leishmania* se alternam entre duas principais formas morfológicas durante o seu ciclo de vida heteroxênico (Figura 1): amastigotas e promastigotas. No trato digestivo do vetor encontram-se as formas promastigotas dos parasitas (Figura 2A), as quais possuem forma alongada, são móveis (flageladas), possuindo uma organela rica em DNA mitocondrial denominada cinetoplasto, estando localizado entre o núcleo e a extremidade anterior, e, à medida que permanecem no trato digestivo do vetor, essas formas se diferenciam até se tornarem a forma infectante para os humanos, denominadas promastigotas metacíclicas. Após a inoculação dessas formas infectantes no homem, estas são capturadas por células fagocíticas (macrófagos), onde se transformam em uma forma arredondada, com cinetoplasto visível, imóvel (sem flagelo exteriorizado) e são denominadas amastigotas (Figura 2B). As amastigotas se diferenciam intensamente até que haja o rompimento da célula infectada, liberando o conteúdo e infectando novas células (AGUIAR; RODRIGUES, 2017; ANVERSA et al., 2018).

Figura 1 Ciclo de vida heteroxênico dos parasitas do gênero *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de CDC, disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Figura 2 Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* spp.



Fonte: 2A - Adaptado e disponível em: <http://www.faperj.br/?id=816.2.2>; 2B - Adaptado e disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/91195/248379.pdf?sequence=1>

A interação parasita-hospedeiro apresentada no ciclo (Figura 1) tem ampla participação do sistema imunológico (SI), que recruta diversas células e moléculas a fim de evitar que a infecção se instale. Após as formas promastigotas metacíclicas serem inseridas no hospedeiro, estruturas presentes nas células do parasito como o próprio flagelo, lipofosfoglicanos e lipoproteínas se ligam a receptores de superfície de células do SI e são

reconhecidas, gerando diversas modificações morfológicas e bioquímicas nestes fagócitos para que haja a produção de substâncias que podem levar a morte do parasita (ROCHA et al. 2019).

Ao longo dos anos, espécies de *Leishmania* desenvolveram mecanismos de escape em diversas etapas das defesas imunológicas do hospedeiro, tendo algumas formas promastigotas conseguido lidar com o primeiro arsenal imunológico sendo então internalizadas por endocitose no interior dos macrófagos, e transformando-se em formas amastigotas, as quais são mais resistentes à grande liberação de substâncias desse microambiente, podendo inativar enzimas hidrolíticas, a produção de óxido nítrico e metabólitos oxidativos, prejudicando assim a eficiência fagocítica do macrófago (ANVERSA et al., 2018)

Pertencentes ao grupo das doenças tropicais negligenciadas classificadas pela OMS, as Leishmanioses afetam principalmente pessoas com baixo poder aquisitivo em todo o mundo, sendo endêmica em 98 países e presente nos cinco continentes. No mundo, há cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e 0,9 a 1,6 milhões de novos casos são relatados a cada ano. Esse cenário tem acarretado de 20.000 a 30.000 mortes/ano e 350 milhões de pessoas estão em risco de infecção (OPAS/OMS, 2020).

No Brasil, entre 2003 e 2018 foram registrados mais de 300.000 casos de LTA, gerando uma média de 21.158 casos por ano, sendo a região Norte responsável pelo maior número de infecções durante o período, seguido da região Centro-Oeste (ZICKER; ALBURQUERQUE; FONSECA, 2019).

Atualmente, são conhecidas aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem, sendo que *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* são os principais agentes causadores de LTA no Brasil (ANVERSA et al., 2018)

No Estado de Mato Grosso do Sul, a LTA é considerada endêmica, com notificação de 1.659 casos no período de 2007 a 2019, sendo notificados 177 casos apenas no ano de 2014 (BRASIL. DATASUS, 2021).

1.1.2 Manifestações clínicas

Grifferty e colaboradores (2021) definiram as Leishmanioses como: antigas, debilitantes e estigmatizantes, pois podem gerar nos acometidos severa desfiguração ao longo dos anos, redução da qualidade de vida, discriminação, grande impacto psicossocial e problemas de saúde física e mental.

As manifestações clínicas da LTA variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro, sendo estes os fatores de maior relevância para o desfecho das formas clínicas. Desta maneira, a LTA ou cutânea é classificada em: Leishmaniose cutânea localizada (LCL) causada por: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, Leishmaniose cutânea disseminada (LD) causada por: *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*, Leishmaniose cutânea difusa (LCD) causada por: *Leishmania (L.) amazonensis* e Leishmaniose cutâneo-mucosa (LM) causada por: *Leishmania (V.) braziliensis* (ANVERSA et al., 2018).

O período de incubação da doença pode variar de quinze dias a dois meses. Após a picada, que ocorre geralmente em áreas expostas da pele, é formada uma mácula no local de inoculação das promastigotas infectantes, a qual evolui para uma pápula, que aumentará ao longo do tempo até que o local fique ulcerado. Nos estágios iniciais, a úlcera tem aparência mais rasa e com alta densidade de parasitas nas bordas, podendo causar ulceração profunda de bordos salientes. As úlceras apresentadas na Leishmaniose cutânea normalmente são indolores, de base eritematosa e com formato arredondado bem delimitado podendo chegar a poucos centímetros (ANVERSA et al., 2018; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Na Leishmaniose cutânea localizada (LCL) as lesões ulceradas (Figura 3) são restritas à pele e acometem a mesma em grau primário, de tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento. As lesões podem ser únicas ou múltiplas, neste último caso, podendo apresentar até 20 lesões em um mesmo segmento corporal (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 3 Ferida ulcerada e única de Leishmaniose cutânea localizada



Fonte: Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

A Leishmaniose cutânea disseminada (LD) é observada em cerca de 2% dos casos e normalmente, é uma classificação não muito comum. As lesões apresentam-se de forma múltipla em diversos segmentos corporais (Figura 4), preferencialmente no tronco e rosto, com características papulares e acneiformes (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Figura 4 Feridas múltiplas de Leishmaniose cutânea disseminada



Fonte: Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

A Leishmaniose cutânea difusa (LCD) é bastante rara e grave. A não responsividade do sistema imunológico do paciente ou anergia é característica dessa forma clínica, que apresenta lesões nodulares não ulceradas ricas em macrófagos (Figura 5), que não cicatrizam espontaneamente e são resistentes aos tratamentos convencionais (ANVERSA et al., 2018)

Figura 5 Feridas nodulares de Leishmaniose cutânea difusa (LCD)



Fonte: Disponível em:
https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

Na Leishmaniose cutâneo-mucosa (LM), as lesões localizam-se preferencialmente em regiões mucosas das vias aéreas superiores, em maior proporção na mucosa nasal, formando lesões de caráter destrutivo de cartilagens e até de ossos. A forma clássica da LM é proveniente de lesões cutâneas antigas curadas sem tratamento ou com tratamento inadequado que podem gerar metástases anos após a lesão inicial. Essa evolução de LC para LM é relativamente lenta, levando cerca de 2 a 10 anos. As áreas acometidas geralmente são bastante edemaciadas devido ao recrutamento celular e inflamação local (Figura 6). O processo de destruição tecidual tende a gerar distúrbios de desfiguração, deglutição, da fala e anemia moderada, de maneira que tais debilitações prejudicam as defesas específicas do paciente, favorecendo infecções secundárias, podendo levar à morte (ANVERSA et al., 2018; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Figura 6 Feridas ulceradas e edemaciadas de Leishmaniose cutâneo-mucosa (LM)



Fonte: Disponível em:
https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

1.1.3 Diagnóstico

Quando o paciente apresenta lesões características de LTA, sendo essas com aparência ulcerada em regiões expostas da pele, de formato arredondado, base eritematosa e bordas bem delimitadas e elevadas, o diagnóstico clínico normalmente é sugestivo para LTA, contudo, deve-se levar em consideração se o paciente reside em áreas endêmicas ou se esteve em locais de notificação de LTA. O diagnóstico clínico-epidemiológico deve ser associado a outras metodologias para obter-se um diagnóstico conclusivo, pois muitas doenças tais como a Paracoccidiodomicose, Hanseníase Virchoviana, Sífilis terciária, dentre outras, compartilham de características clínicas semelhantes à LTA e o diagnóstico diferencial se faz necessário (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; ROCHA et al., 2019).

Sendo sugestivo como positivo o diagnóstico clínico-epidemiológico, exames mais acessíveis são inicialmente elegíveis para a confirmação da doença, sendo o teste intradérmico ou intradermorreação de Montenegro (IDRM) e o exame parasitológico direto, indicados como provas fundamentais. A intradermorreação de Montenegro é uma técnica baseada na resposta de hipersensibilidade celular retardada e seu resultado deve ser interpretado com muita atenção, pois em áreas endêmicas, a IDRM positiva pode ser interpretada como leishmaniose anterior ou mesmo por realização anterior desse mesmo teste, também por exposição ao parasito sem doença, por alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças tais como doença de Chagas, tuberculose, entre outras. A IDRM também pode negatizar até seis semanas após o surgimento da lesão cutânea, e após esse período, quando positiva, a IDRM tem cerca de 90% de sensibilidade. Sendo negativa e com a lesão em curso, outras metodologias são indicadas para um diagnóstico diferencial (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Devido à IDRM ser um teste indireto, muitas vezes gera lacunas diagnósticas ou imprecisão, sendo assim, o exame parasitológico direto pode ser definido como padrão ouro no diagnóstico da doença. Este teste é rápido, tem baixo custo e é de fácil execução. A investigação do parasita neste teste pode ser feita através da coleta do material por escarificação da borda da

lesão, biópsia com fragmento da lesão em lâmina e por punção aspirativa. Quando o parasita é visualizado em formas amastigotas através dessa análise, o diagnóstico do processo infeccioso é confirmado, sendo a sensibilidade desta técnica aumentada através da leitura de várias réplicas de lâminas contendo o material em análise. O tempo de evolução da doença faz com que a sensibilidade seja menor, pois quanto maior o tempo de evolução da lesão menor a probabilidade de encontrar o parasita na análise (ANVERSA et al., 2018; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Estas técnicas citadas são rápidas e baratas, contudo, possuem sensibilidade limitada, principalmente em lesões crônicas, e, nos casos em que o diagnóstico não for conclusivo pelos testes anteriormente apresentados, outros testes laboratoriais deverão ser realizados no paciente, empregando-se metodologias diferentes. Além de contribuir para confirmar o processo infeccioso, a utilização de outros métodos é capaz de agregar informações epidemiológicas e genéticas da espécie de *Leishmania* circulante, o que contribui para o avanço no conhecimento da infecção e as medidas empregadas para controlar o agravo e a disseminação da doença (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No cultivo *in vitro* em meio NNN (Neal, Novy e Nicolle) são inoculadas amostras clínicas provenientes de fragmentos cutâneos ou de mucosa obtidos por biópsia da borda ulcerada, contudo, esse método é pouco utilizado na prática clínica, pois demanda mão-de-obra qualificada, apresenta alto custo e o crescimento dos parasitas e a espera para observação e liberação do laudo pode levar meses. O cultivo *in vivo* em animais, geralmente hamsters, melhora a acurácia em comparação com demais testes. Contudo, o cultivo *in vitro* não é rotineiro na prática clínica devido ao longo tempo para conclusão do diagnóstico, alto custo, necessidade de autorização de uso de animais e morosidade envolvida no processo metodológico (ANVERSA et al., 2018; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

Exames histopatológicos também podem ser realizados através da observação em microscopia através de achados na amostra colhida da lesão, que se caracteriza pela visualização de granulomas classificados como tuberculoides, com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário associado. Podem

ocorrer variabilidades e inespecificidades, supostamente relacionadas ao tempo de evolução da doença, o aspecto macroscópico da lesão e a condição imunológica do paciente, entre outros. Por fim, o diagnóstico da LTA é dependente da visualização das formas amastigotas de *Leishmania* intra ou extracelulares, e nem sempre estas são observadas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado altamente promissora no diagnóstico das Leishmanioses por possuir alta sensibilidade e especificidade, pois é baseada na amplificação do DNA dos parasitas em diferentes tipos de amostras de LTA, tais como pele e mucosa. Por utilizar diferentes alvos moleculares, o método permite a caracterização de diferentes espécies de *Leishmania*, em adicional, permite a detecção do DNA do parasita mesmo quando a carga parasitária encontra-se baixa, o que é fator limitante para muitos outros métodos. Essa técnica é largamente utilizada em laboratórios de pesquisa, contudo, ainda não foi popularizada para utilização na prática clínica, devido ao alto custo dos insumos utilizados em técnicas moleculares, o risco eminente de contaminação e infraestrutura laboratorial necessária (ANVERSA et al., 2018; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As provas sorológicas tais como: Imunofluorescência indireta (IFI), Imunoenzimático (ELISA) e aglutinação direta (DAT) são padronizados para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, contudo, apresentam limitações importantes, principalmente para o diagnóstico de LTA, pois o nível de anticorpos geralmente é baixo. Outra limitação é conhecida quando se trata de indivíduos residentes em áreas endêmicas com sorologia positiva; estes podem desenvolver ou não a doença, e a positividade do teste também não está inteiramente relacionada à doença ativa, pois os níveis de anticorpos podem se manter elevados no soro do paciente por um longo período após a cura clínica. Esses testes podem apresentar reação cruzada com outros tripanosomatídeos e, em casos de coinfeccção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), os resultados dos testes apresentam-se frequentemente negativos, pois o HIV causa imunossupressão, o que diminui o nível de anticorpos circulantes que possivelmente positivariam o teste (ANVERSA et al., 2018; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020).

1.1.4 Controle

O controle das leishmanioses é complicado, pois depende de vários fatores, tais como o controle químico vetorial, ambiental, infecção de outros animais reservatórios e também o controle sanitário por meio da diminuição de criadouros em lixos urbanos. O controle químico vetorial é realizado pelo uso de inseticidas de ação residual, sendo esta uma medida recomendada no âmbito da proteção coletiva, apresentando efetividade apenas para o inseto adulto, com finalidade de evitar ou reduzir o contato entre o vetor e a população humana no domicílio, diminuindo assim o risco de transmissão da doença. Em regiões de surto de LTA, a aplicação dos inseticidas é imediatamente recomendada, principalmente nas residências (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Medidas de controle e tratamento de animais doentes, tanto silvestres quanto os domesticados não são recomendadas devido ao potencial risco de selecionar cepas resistentes ao tratamento humano, sendo a eutanásia indicada somente quando os animais infectados apresentarem lesões cutâneas graves, com aparecimento de lesões mucosas e infecções secundárias que poderão conduzir o animal ao sofrimento (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Alguns trabalhos brasileiros demonstraram boa proteção canina à Leishmaniose através do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4%, reduzindo a prevalência, incidência e conseqüentemente, o risco de adoecimento, sendo este, tratado pelos autores como potencial fator indireto para prevenção de Leishmaniose em humanos (KAZIMOTO, 2016; TOLEZANO et al., 2018).

Quanto ao controle sanitário frente acúmulo de lixo urbano para prevenir a reprodução do inseto vetor, estratégias de educação em saúde devem ser amplamente divulgadas para a população. Outro fator importante é o conhecimento da doença por esta população, através de informações sobre a prevenção através do uso de repelentes, mosquiteiros, roupas compridas e evitar habitação em áreas próximas à mata, cabendo as equipes

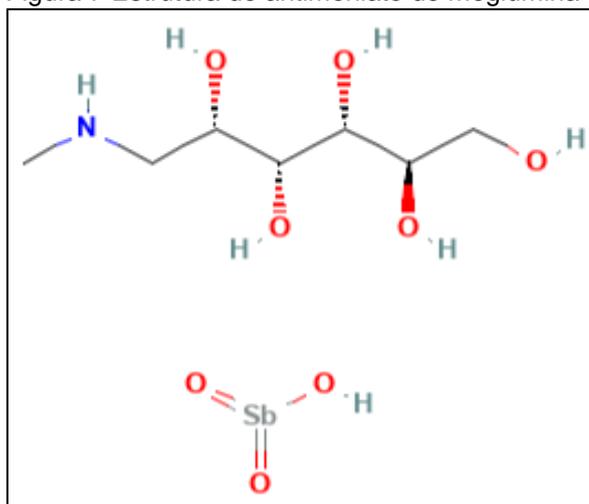
multidisciplinares manter as ações de vigilância epidemiológica para controle e manejo da doença (DIVE/SES/SC, 2018).

1.1.5 Tratamento

Para estabelecer o controle e manejo eficazes para as leishmanioses, o uso de medicamentos é imprescindível, contudo, o arsenal conhecido até o momento deve ser aprimorado, por ser de alto custo, de administração complicada e requerendo diversas doses, podendo chegar a meses de tratamento. Além disso, efeitos colaterais graves como pancreatite, toxicidade cardíaca e renal foram relatados, assim como casos de resistência à terapêutica (CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019).

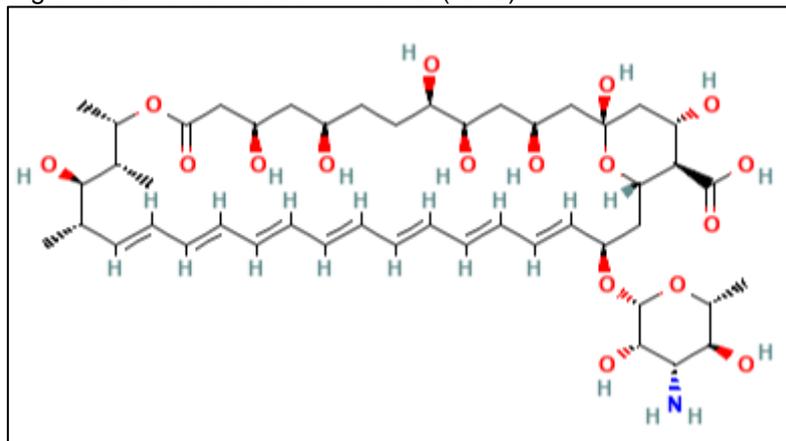
No Brasil, os tratamentos otimizados disponíveis para LTA são constituídos pelo Antimonial pentavalente (antimoniato de meglumina) (Figura 7) e as formulações de Anfotericina B (AMB) (Figura 8), desoxicolato e lipossomal. A escolha terapêutica a ser conduzida depende da forma clínica, diagnóstico diferencial e o perfil do paciente, variando de acordo com a faixa etária, presença de gravidez e de comorbidades (AGUIAR; RODRIGUES, 2017; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 7 Estrutura do antimonialto de meglumina



Fonte: PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glucantime>

Figura 8 Estrutura da Anfotericina B (AMB)



Fonte: PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280965#section=2D-Structure>

Os antimoniais pentavalentes são utilizados como tratamento padrão para leishmanioses em todo mundo há muitos anos, contudo, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado: pressupõe-se que várias enzimas de *Leishmania* sejam inibidas seletivamente, exercendo efeito leishmanicida. Aparentemente, a fosfofrutoquinase é inibida, com conseqüente bloqueio da produção de adenosina trifosfato (ATP) (SANOFI-AVENTIS. GLUCANTIME®, 2011; KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018).

No Brasil, o antimonial pentavalente utilizado é o antimoniato de meglumina, o qual ocasiona ao paciente alta toxicidade, e muitos casos de resistência tem sido relatados com o passar dos anos. No Brasil, o esquema terapêutico recomendado pelo Ministério da saúde é a administração via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV) de 10 mg-20 mg/kg/dia, e em alguns casos faz-se a injeção intralesional por via subcutânea (SC) de aproximadamente 5 mL por sessão, com intervalo de 15 em 15 dias (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019).

A Anfotericina B é um antifúngico poliênico que apresenta altas taxas de cura, tendo ação direta sobre ambas as formas do parasita ao se ligar ao ergosterol da membrana celular levando à formação de poros, o que desencadeará a permeação de íons, água e outras moléculas causando a morte do parasita. Outro possível mecanismo leishmanicida a auto-oxidação, ou seja, a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A apresentação na forma de desoxicolato de AMB tem alta toxicidade por ter baixa seletividade celular com o hospedeiro, gerando muitos efeitos colaterais tais como náuseas,

vômitos, tremores e lesões renais. Já a formulação de Anfotericina B lipossomal tem apresentado maior tolerabilidade no tratamento pelos pacientes, pois os efeitos adversos são bem menos frequentes que a formulação de desoxicolato de AMB, sendo a nefrotoxicidade reduzida em metade dos casos quando comparadas as diferentes apresentações, contudo, esta possui alto custo (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018).

Outros principais fármacos já utilizados para o tratamento da LTA são miltefosina, azitromicina, itraconazol, cetoconazol, alopurinol e paramomicina (CHEUKA et al., 2017; NEVES et al., 2011). Sampaio et al. 2019 compararam os efeitos do uso à longo prazo de miltefosina e antimoniato de meglumina, revelando que a miltefosina pode ser uma boa alternativa no tratamento de LM, sendo de administração facilitada por via oral, boa taxa de cura e segura.

Dentre outras opções terapêuticas estão a pentoxifilina e o isetonato de pentamidina. A pentoxifilina tem seu uso de maneira coadjuvante, apresentando potencial efeito imunomodulador, gerando um tempo de cura reduzido quando comparado ao tratamento convencional isolado. Já a pentamidina é de uso preconizado em áreas endêmicas e em casos de LTA que não respondem aos antimoniais pentavalentes, ou na impossibilidade de seu uso, porém apresenta diversos efeitos colaterais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; NEVES et al., 2011).

2 PRODUTOS NATURAIS NAS LEISHMANIOSES

Os tratamentos atualmente utilizados para as leishmanioses são de alto custo, difícil manejo, apresentam casos de resistência e possuem muitos efeitos deletérios aos indivíduos em tratamento. Tais limitações encontradas nos tratamentos evidenciam a necessidade de busca de novas opções de medicamentos antiprotozoários efetivos e seguros, principalmente através de estratégias inovadoras no ramo de produtos naturais, pois há muitos relatos em literatura à respeito do potencial de flavonoides, alcaloides, fitosteróis e saponinas apresentando atividade no combate as leishmanioses (ORYAN, 2015; SANDJO et al., 2016).

O uso de plantas para diminuir processos dolorosos e buscar a cura para doenças possivelmente foi um dos primeiros indícios do uso destas ervas para fins medicinais, e pode-se relacionar essa prática como parte da própria evolução humana. Nos países da América Latina, as plantas geralmente são utilizadas como tratamento alternativo, mas em muitas comunidades de baixa renda tem sido uma forma eficaz de atenção primária à saúde, em que muitos pesquisadores têm mostrado grande interesse em estudar o conhecimento tradicional adquirido por essas populações, pois este tem se mostrado como potencial ponto de partida na descoberta de novos fármacos. Contudo, estudos para elucidar seus metabólitos, segurança e toxicidade são necessários e dispendiosos (SARQUIS et al., 2019; PASSERO et al., 2021; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Passero e colaboradores (2021) elencaram diversos trabalhos que tratam sobre o uso de plantas medicinais em leishmanioses, sendo as folhas as partes mais utilizadas, e a principal via de administração foi a tópica, principalmente em lesões de LTA. Em adicional, demonstraram como é vasto o conhecimento tradicional nas formas de utilização dessas plantas, seja no preparo dos extratos, loções, cremes, mas muito além disso, é que muitas dessas ervas apresentam ações comprovadas em estudos realizados em laboratórios, comprovando a importância dos estudos etnofarmacológicos.

Há inúmeros relatos na literatura de atividade anti-*Leishmania* utilizando produtos naturais, em que possíveis mecanismos de ação são apresentados de acordo com a classe de compostos presentes nas plantas em estudo. É importante destacar que na maioria desses estudos os testes são realizados *in vitro*, trazendo resultados de atividade leishmanicida apenas em formas promastigotas, as quais são as células do parasita que habitam o vetor, mas que são largamente utilizadas em laboratórios pela sua praticidade e não necessitar do uso de animais em testes iniciais, sendo esses importantes para determinar a citotoxicidade das plantas em análise (BONIFACE; FERREIRA, 2019).

Extratos vegetais contendo flavonoides com atividade anti-*Leishmania* são largamente estudados, por apresentarem efeitos imunomoduladores no hospedeiro através do aumento de óxido nítrico (NO) em macrófagos, inibirem

a da síntese de DNA do parasita e induzir a produção de desencadeamento de ERO's induzindo a apoptose do parasita (MORAIS et al., 2020; SARKAR et al., 2008; ULLAH et al., 2016).

Outros mecanismos com ação anti-*Leishmania* foram relatados em plantas que possuem compostos como as chalconas que agem no parasita a nível mitocondrial gerando inibição de sua cadeia respiratória. As saponinas tiveram ação contra o parasita em sua membrana, fazendo com que sua integridade seja perdida, gerando a morte do parasita. As quinonas agem aumentando a geração de radicais livres, induzindo a morte do parasita. Já a atividade antiparasitária mediada pela ação dos alcaloides está envolvida por mecanismos enzimáticos, geração de radicais livres e produção de NO. Outros compostos como as lignanas, taninos, terpenóides e oxilipinas também tiveram suas ações anti-*Leishmania* descritas (MORAIS et al., 2020; ORYAN, 2015; SAKYI et al., 2021).

2.1 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae é uma das mais diversas dentre as angiospermas, podendo apresentar espécies de grandes folhagens, belas flores, ervas, arbustos ou árvores, se mostrando presentes em regiões tropicais e subtropicais, e largamente distribuídas no Cerrado Brasileiro (JUNIOR; VIEIRA, 2015).

Com os avanços nos estudos filogenéticos, moleculares e taxonômicos das últimas décadas, a família Rubiaceae sofreu várias reorganizações. Atualmente, é dividida em 650 gêneros e 13.000 espécies (DELPRETE; JARDIM, 2012). Muitas espécies detêm importância econômica, sendo utilizadas nos ramos alimentício e ornamental, também tendo importância terapêutica em diversas localidades do mundo. Exemplos populares são: *Coffea arábica* L. (café) e também a *Cinchona pubescens* (produtora de quinina) utilizada no tratamento de malária (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

As espécies contêm grande diversidade de metabólitos secundários: iridóides, alcaloides indólicos, antraquinonas, flavonoides, derivados fenólicos,

diterpenos, triterpenos, dentre outros alcaloides, porém, o perfil fitoquímico de seus compostos ainda é muito pouco explorado (VALLI; YOUNG; BOLZANI, 2016). Na medicina popular, espécies da família Rubiaceae são utilizadas para tratar hematomas, entorses, dores, problemas reumáticos e outros processos inflamatórios. Entretanto, estudos químicos e farmacológicos adicionais são necessários para comprovar tais atividades. Algumas pesquisas isoladas já demonstram as propriedades antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral (CESÁRIO et al., 2019; OLMEDO et al., 2007; VALLI; YOUNG; BOLZANI, 2016).

Alguns estudos empregando plantas da família Rubiaceae apresentam potencial efeito anti-*Leishmania*, tais como o de Bolivar e seus colaboradores (2011) que testaram a espécie *Galium mexicanum* neste contexto e obtiveram a elucidação de diversos compostos bioativos em extratos hexanólicos e metanólicos, tendo o primeiro apresentado forte atividade contra os parasitas e a fração metanólica foi capaz de reduzir o processo inflamatório induzido por macrófagos.

Baldé et al. (2010) foram o primeiro grupo de pesquisa a relatar atividade anti-*Leishmania* na espécie *Pavetta crassipes*, declarando como responsáveis por tal efeito a presença de alcaloides nesses extratos, ao qual também foram ativas contra cepas de *Trypanosoma* spp. tendo relatado também a ação antiproliferativa em cânceres de diferentes linhagens celulares e outros microrganismos estudados.

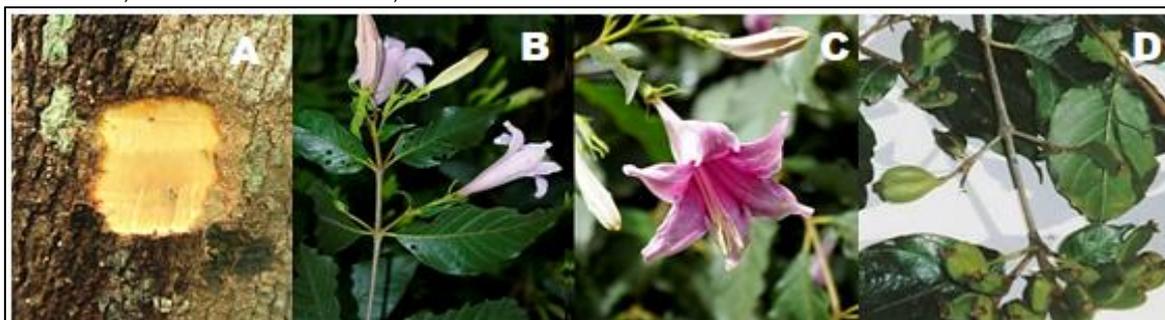
Trabalhos envolvendo as espécies *Gardenia ternifolia* e *Morinda lucida* apresentaram efeito atividade anti-*Leishmania*, contudo, maiores evidências precisam ser construídas, principalmente em relação à segurança e toxicidade destas plantas (ADEWOLE; ATTAH; ADEBAYO, 2021; AHUA et al., 2007).

Um estudo utilizando plantas africanas conduzido por Bapela et al. (2017) os extratos de *Vangueria infausta* em fração de diclorometano apresentaram altos efeitos anti-*Leishmania* e seletividade inicial satisfatória, assim como demonstrado na espécie *Rothmannia hispida*, que também é presente na África, e em algumas regiões da Ásia, em que seus extratos exibiram compostos com potente atividade anti-*Leishmania* e excelentes índices de seletividade (NKWENTI WONKAM et al., 2020).

O Brasil é um país que possui vasta biodiversidade de espécies da família Rubiaceae e um crescente aumento nos levantamentos etnofarmacológicos vem ocorrendo nos últimos anos (BOTSARIS, 2007; CARVALHO; CONTE-JUNIOR, 2021).

O Cerrado brasileiro é conhecido por possuir uma abundante variedade de espécies da família Rubiaceae, e estas vem sendo estudadas para tratar diversas patologias que acometem a população, um exemplo é a *Coutarea hexandra* (Figura 9), amplamente conhecida como Quina-quina ou Quina-brava. Suas cascas quando utilizadas demonstram como principais atividades o efeito antimalário e antitérmico, e o uso de suas frutas demonstrou ação citotóxica em células tumorais por conterem curcubitacinas (BOTSARIS, 2007; OLMEDO et al., 2007).

Figura 9 Partes da planta *Coutarea hexandra* ou Quina-quina. A - casca externa, B - folhas, flores e botões florais, C - flores e botões florais e D - frutos imaturos.



Fonte: Adaptado e disponível em: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2018/02/04/coutarea-hexandra-jacq-k-schum/>

Cesário e seus colaboradores (2018a, 2018b, 2019) estudaram amplamente a espécie *Tocoyena formosa* (Figura 10), popularmente conhecida como Genipapo-Bravo, a qual apresentou propriedades antioxidantes, significativa atividade gastroprotetora, ação anti-inflamatória sistêmica e antiedematogênica em modelos animais, possuindo baixa toxicidade aguda. Além disso, indicaram possíveis efeitos antinociceptivos, inidicando a participação de mecanismos opioides, glutamatérgicos, de óxido nítrico, dentre outros. O perfil químico também foi estudado, sendo muitos compostos identificados, tais como: taninos, flavonoides (rutina, quercetina e luteolina), saponinas, ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico e elágico.

Figura 10 Partes da planta *Tocoyena formosa*. A - espécimes floridos, B - superfície do tronco e casca interna, C - flores e botões florais e D - frutos próximos da maturação.



Fonte: Adaptado e disponível em: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2017/08/06/tocoyena-formosa-cham-schtdl-k-schum/>

A espécie *Richardia grandiflora* (Figura 11) tradicionalmente conhecida como ervanço, poaia ou ipeca-mirim, possui indícios etnofarmacológicos através do uso de seu decocto no alívio das hemorroidas e como vermífugo. As informações sobre esta espécie ainda são bem escassas, contudo, um estudo fitoquímico contribuiu para a elucidação e isolamento de alguns de seus constituintes químicos, sendo uma mistura de esteroides: β - sitosterol e estigmasterol, o ácido *o*-hidroxibenzóico, o ácido *m*-metoxi-*p*-hidroxi-benzóico e a feofitina A (DE TOMAZ et al., 2008).

Figura 11 Flores de *Richardia grandiflora*



Fonte: Adaptado e disponível em: <https://faunaefloradorn.blogspot.com/2014/10/poaia-rasteira-richardia-grandiflora.html>

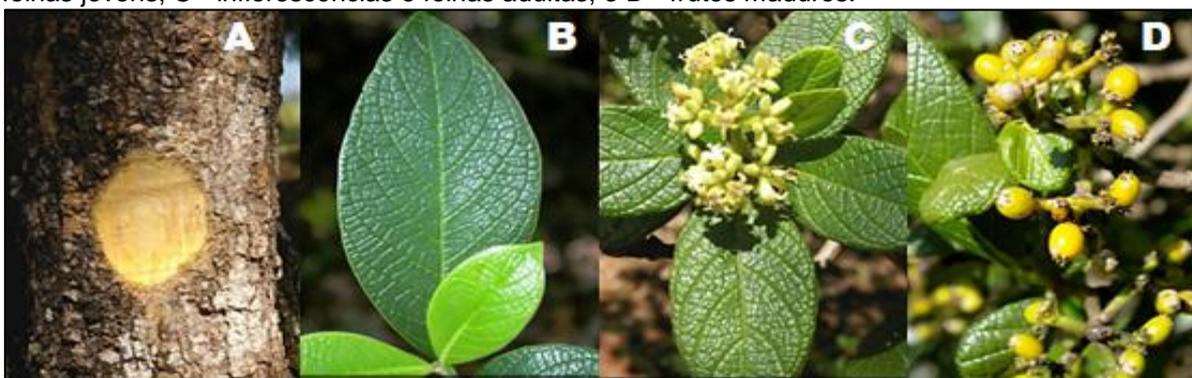
A planta *Rudgea viburnoides* (Figura 12) é popularmente conhecida e utilizada como congonha-de-bugre ou erva de bugre, possuindo relatos de ação hipotensora, depurativa do sangue, antirreumática, diurética e no tratamento de dor nos rins e bexiga. Moreira Galdino *et al.* (2017) avaliaram a melhora na função renal após estimularem nefrotoxicidade *in vivo* e confirmaram o efeito renoprotetor dessa planta. A ação diurética com extrato de

Rudgea viburnoides também foi revelada *in vivo* através do aumento de parâmetros urinários tais como volume de urina em 24 h, maior excreção dos eletrólitos sódio, potássio e cloreto (PUCCI et al., 2010).

Análises *in vivo* e perfil fitoquímico foram realizados por Paulin *et al.* (2021) com o objetivo de elucidar os relatos etnofarmacológicos já relatados para a espécie *Rudgea viburnoides*, sendo estes positivos neste estudo em que mostrou redução o avanço da doença cardiorrenal em ratos hipertensos, esta importante contribuição pode estar relacionada com diminuição do estresse oxidativo, inibição da enzima de conversão da angiotensina e ativação da via NO/ Monofosfato cíclico de guanosina (cGMP).

Num estudo conduzido Almeida *et al.* (2018) foi avaliado o potencial de extratos da planta *Rudgea viburnoides* para reverter a obesidade, ou mais precisamente, a síndrome metabólica, em que muitos outros processos inflamatórios ocorrem de forma associada, desta maneira, ocorreu a redução do tamanho das células gordurosas, melhora na tolerância e uso celular da glicose frente a insulina, redução dos níveis de colesterol e de outros marcadores inflamatórios, sendo esse desempenho comprovado através de achados de compostos como ácidos clorogênico e cafeico e flavonoides (rutina e quercetina).

Figura 12 Partes da planta *Rudgea viburnoides*. A - casca externa e cor da casca interna, B - folhas jovens, C - inflorescências e folhas adultas, e D - frutos maduros.



Fonte: Adaptado e disponível em: <http://www.arvoresdobiomacerrado.com.br/site/2019/02/05/rudgea-viburnoides-cham-benth/>

Santos *et al.* (2013) testaram extratos de diversas plantas encontradas no Pantanal para avaliar potencial acaricida na espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e observaram que dentre outras, *Diodia kuntzei* (Figura

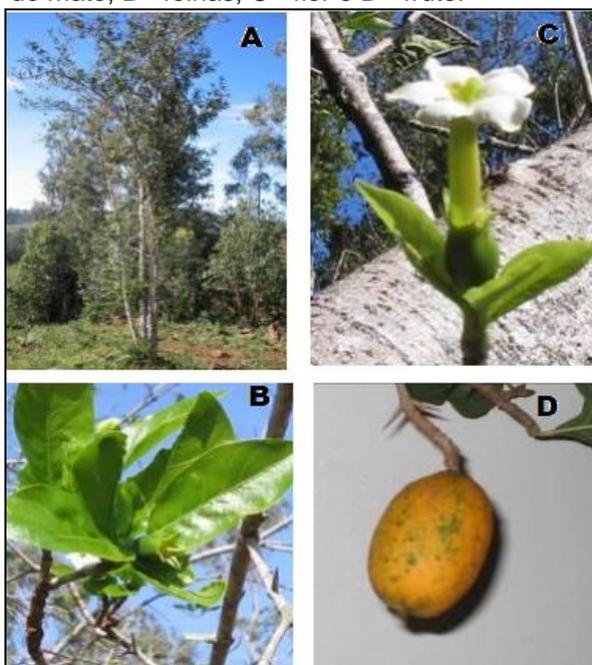
13), *Richardia grandiflora* e *Tocoyena formosa* apresentaram atividade acaricida maior que 95% contra o estágio larval para os extratos na concentração 40% (m/v), e *Randia armata* (Figura 14) apresentou eficácia moderada.

Figura 13 Flores de *Diodia kuntzei*



Fonte: Adaptado de Souza, 2020; e disponível em: <https://plantidtools.fieldmuseum.org/pt/nlp/catalogue/3669583>

Figura 14 Partes da planta *Randia armata*. A - espécime da planta limão do mato, B - folhas, C - flor e D - fruto.



Fonte: Adaptado de Paulus, 2005

O estudo e levantamento destas plantas do Cerrado é de suma importância para valorizar a biodiversidade local e nacional, além disso, nos encoraja a bioprospecção por tratamentos promissores utilizando extratos de plantas, visto que, as plantas *Coutarea hexandra*, *Diodia kuntzei*, *Randia armata*, *Richardia grandiflora*, *Rudgea viburnoides* e *Tocoyena formosa* não possuem ensaios e nem relatos na literatura como analisadas ou utilizadas no tratamento das leishmanioses.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas plantas têm sido estudadas como possíveis fontes de novos medicamentos, e os produtos naturais ainda são um excelente ponto de partida, ou triagem para essas pesquisas pela indústria farmacêutica (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Diante da ampla utilização de espécies de plantas da família Rubiaceae na medicina popular, principalmente na América do Sul, bem como no emprego destas na busca de compostos bioativos para o tratamento de doenças de caráter inflamatório, tumoral e gastroprotetor, por exemplo, não há dúvidas de que essa família representa uma importante fonte de compostos bioativos naturais que poderão ser utilizados na indústria farmacêutica após conhecimento detalhado de suas propriedades (BOTSARIS, 2007; CESÁRIO et al., 2019; OLMEDO et al., 2007).

O estudo da atividade antiparasitária dessas espécies de Rubiaceae nativas do Mato Grosso do Sul pode revelar informações preliminares relacionadas aos dados de seu potencial bioativo, uma vez que ainda não temos tais informações. Considerando a importância dos dados etnofarmacológicos e potenciais terapêuticos apresentados pelas espécies da família Rubiaceae, neste trabalho foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* dos extratos de *Coutarea hexandra*, *Diodia kuntzei*, *Randia armata*, *Richardia grandiflora*, *Rudgea viburnoides* e *Tocoyena formosa* nativas do Mato Grosso do Sul.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral:

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania in vitro* de extratos de plantas da família Rubiaceae nativas do Mato Grosso do Sul;

4.1.1 Específico:

- Analisar a ação dos extratos sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* através de ensaio colorimétrico de viabilidade;
- Avaliar a ação dos extratos sobre formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em macrófagos infectados;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos sobre fibroblastos murinos (NIH/3T3), para se estimar seu índice de seletividade;
- Analisar possível mecanismo de ação dos extratos através da dosagem de óxido nítrico produzido pelas células infectadas e tratadas.

REFERÊNCIAS

ADEWOLE, K. E.; ATTAH, A. F.; ADEBAYO, J. O. *Morinda lucida* Benth (Rubiaceae): A review of its ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 276, n. March, p. 114055, 2021.

AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 191–204, 2017.

AHUA, K. M. et al. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 99–104, 2007.

ALMEIDA, J. M. A. et al. Effects of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae) Leaves on Metabolic and Inflammatory Dysfunction Induced by High Refined Carbohydrate-Containing Diet in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 21, n. 12, p. 1266–1275, 2018.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.

BALDÉ, E. S. et al. In vitro antiprotozoal, antimicrobial and antitumor activity of *Pavetta crassipes* K. Schum leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 529–535, 2010.

BAPELA, M. J.; KAISER, M.; MEYER, J. J. M. Antileishmanial activity of selected South African plant species. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 342–345, 2017.

BOLIVAR, P. et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 141–147, 2011.

BONIFACE, P. K.; FERREIRA, E. I. Flavonoids as efficient scaffolds: Recent trends for malaria, leishmaniasis, Chagas disease, and dengue. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 10, p. 2473–2517, 2019.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: The archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [recurso eletrônico]– Brasília : Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde

aos dias atuais. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - DATASUS** - Tabnet. Disponível em: Tabnet – DATASUS (saude.gov.br). [Acesso em 22 de novembro de 2021].

CAPELA, R.; MOREIRA, R.; LOPES, F. An overview of drug resistance in protozoal diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, 2019.

CARVALHO, A. P. A. DE; CONTE-JUNIOR, C. A. Health benefits of phytochemicals from Brazilian native foods and plants: Antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, and risk factors of metabolic/endocrine disorders control. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, n. December 2020, p. 534–548, 2021.

CESÁRIO, F. R. A. S. et al. Evaluation of the antioxidant and gastroprotective activity and HPLC analysis of the hydroalcoholic extract of *Tocoyena formosa* leaves (Cham. & Schlecht) K. Schum. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, n. 2018, p. 355–362, 2018a.

CESÁRIO, F. R. A. S. et al. Phytochemical profile and mechanisms involved in the anti-nociception caused by the hydroethanolic extract obtained from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum (Jenipapo-bravo) leaves in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. October 2017, p. 321–329, 2018b.

CESÁRIO, F. R. A. S et al. Chemical fingerprint, acute oral toxicity and anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of leaves from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 873–880, 2019.

CHEUKA, P. M. et al. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.

COELHO, V. P. DE M.; AGRA, M. DE F.; BARBOSA, M. R. DE V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 170–177, 2006.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. Leishmania Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–14, 2019.

DE TOMAZ, A. C. A. et al. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 47–52, 2008.

- DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 101–128, mar. 2012.
- DIVE/SES/SC. Estado de Santa Catarina. Diretoria De Vigilância Epidemiológica: guia de orientação **Guia De Orientação Para a Vigilância Da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**., n. Lvc, p. 40, 2018.
- SARQUIS, R. D. S. et al. The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- GRIFFERTY, G. et al. Vulnerabilities to and the Socioeconomic and Psychosocial Impacts of the Leishmaniasis: A Review. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. Volume 12, p. 135–151, 2021.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.
- JUNIOR, M. F.; VIEIRA, A. O. S. Espécies arbóreo-arbustivas da família Rubiaceae Juss . na bacia do. **Hoehnea**, v. 42, n. 2, p. 289–336, 2015.
- KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 339–367, 2018.
- KAZIMOTO, T. A. Uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% em cães no controle da leishmaniose visceral. **Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA**, p. 1–66, 2016.
- MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1–24, 2018.
- MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burden. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 3, 2017.
- MORAIS, L. S. et al. Antileishmanial compounds from *Connarus suberosus*: Metabolomics, isolation and mechanism of action. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. 1–22, 2020.
- MOREIRA GALDINO, P. et al. Nephroprotective effect of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth leaves on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 201, p. 100–107, 2017.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092–1101, 2011.

NKWENTI WONKAM, A. K. et al. Rothmanniamide and other constituents from the leaves of *Rothmannia hispida* (K.Schum.) fagerl. (Rubiaceae) and their chemophenetic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 93, n. June, p. 104137, 2020.

OLMEDO, D. et al. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 7, p. 625–631, 2007.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Poner fin a la desatención para alcanzar los objetivos de desarrollo sostenible: hoja de ruta sobre enfermedades tropicales desatendidas 2021-2030. **Organización Mundial de la Salud**. 2021a. [Internet] Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/346561>

OMS. Organização Mundial da Saúde. **O observatório global de saúde**. [Internet]. 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis>

OPAS/OMS. Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the Americas 2017-2022. **Communicable Diseases and Health Analysis Department** [Internet]. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34147/PlanactionLeish20172022-eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y>

OPAS/OMS. Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses. **Organização Pan-Americana da Saúde**; 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.

PASSERO, L. F. D. et al. The Potential of Traditional Knowledge to Develop Effective Medicines for the Treatment of Leishmaniasis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. June, 2021.

PAULIN, F. V. et al. Prolonged administration of *Rudgea viburnoides* (Cham.) benth. prevents impairment of redox status, renal dysfunction, and cardiovascular damage in 2k1c- hypertensive rats by inhibiting ace activity and no- gmpc pathway activation. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, 2021.

PUCCI, L. L. et al. Avaliação da toxicidade aguda oral e da atividade diurética da *Rudgea viburnoides* (cham.) benth. (congonha-de-bugre). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 30–37, 2010.

SAMPAIO, R. N. R. et al. A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 52 2019.

ROCHA, T. M. D. D., Silveira, M. B.; Quixabeira, V. B. L. Leishmaniose tegumentar americana em humanos: uma revisão dos aspectos envolvidos na doença. **Saúde & ciência em ação**, 5(1), 1-13, 2019.

SAKYI, P. O. et al. **The Search for Putative Hits in Combating Leishmaniasis: The Contributions of Natural Products Over the Last Decade**. [s.l.] Springer Singapore, v. 11, 2021.

SANDJO, L. P. et al. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1772–1775, 2016.

SANOFI-AVENTIS. Antimoniato de meglumina (Glucantime®) **[bula]**. São Paulo: Sanofi-Aventis. 2011. Disponível em: <https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/glucantime.pdf>

SANTOS, L. B. DOS et al. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 532–538, 2013.

SARKAR, A. et al. An ethanolic extract of leaves of Piper betle (Paan) Linn mediates its antileishmanial activity via apoptosis. **Parasitology Research**, v. 102, n. 6, p. 1249–1255, 2008.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253–272, 2020.

TOLEZANO, J. E. et al. Avaliação da efetividade do uso de coleiras impregnadas com deltametrina no controle da leishmaniose visceral no município de Votuporanga, Estado de São Paulo, Brasil, 2014 - 2016 TT - Evaluation of the effectiveness of using deltamethrin impregnated coll. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n. 77, p. 1–10, 2018.

ULLAH, N. et al. Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 12, p. 1905–1925, 2016.

VALLI, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. The invisible beauty of the biodiversity: The Rubiaceae taxon. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 296–310, 2016.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

ZICKER, F.; ALBURQUERQUE, P. C.; FONSECA, B. DE P. F. E. Doenças tropicais negligenciadas 3. **Departamento de molestias Infeciosas e Parasitarias**, p. 1- 45., 2019.

ANEXO: Artigo formatado conforme requerido pela revista Phytochemistry (normas aos autores em anexo).

***In vitro* antileishmanial activity of hydroalcoholic extracts from Rubiaceae family plants found in Brazilian Cerrado**

Ana Maria de Andrade Oliveira^a, Fernanda da Silva^b, Amarith Rodrigues das Neves^b, Carla Cardozo Pinto de Arruda^b, Renata Trentin Perdomo^a, Denise Brentan da Silva^c, and Thalita Bachelli Riul^{a*}

^a *Laboratory of Clinical Parasitology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil;* ^b *Laboratory of Human Parasitology, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil;* ^c *Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

Correspondent author

***Prof. Dra. Thalita Bachelli Riul**

Laboratório de Parasitologia Clínica – LAC – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Avenida Costa e Silva s/n – Setor 2, Bloco 17 – Bairro Universitário

CEP 79070-900 – Campo Grande – MS – Brazil

thalita.rul@ufms.br

***In vitro* antileishmanial activity of hydroalcoholic extracts from Rubiaceae family plants found in Brazilian Cerrado**

Abstract

Leishmaniasis are diseases caused by protozoans of the *Leishmania* genus, considered by the WHO as neglected tropical diseases, responsible for about 30,000 deaths per year, being endemic in Mato Grosso do Sul, Brazil. The available treatments make adherence difficult due to the high cost, parenteral administration and several collateral effects. Considering the vast biodiversity and ethnopharmacological surveys in our country, the search for safer and more effective treatments with natural products is challenging and necessary. Thus, we evaluated *in vitro* activity of *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata* and *Coutarea hexandra* plant extracts of the Rubiaceae family against *Leishmania amazonensis*. We observed a reduction in cell viability of promastigotes forms of *L. amazonensis* and a reduction in intracellular amastigotes in infected macrophages, and the selectivity indices were calculated in which *Tocoyena formosa*, *Rudgea viburnoides* and *Randia armata* extracts presented values of 6.7, 3.2, and 2.7, respectively. In order to investigate some mechanism involved in the anti-*Leishmania* activity, the production of nitric oxide by infected macrophages was evaluated using the Griess reaction. The realization of phytochemical studies and the fractionation of extracts will be essential to track the antileishmanial activity of these extracts.

Keywords: Rubiaceae; *Rudgea viburnoides*; *Diodia kuntzei*; *Tocoyena formosa*; *Leishmania amazonensis*.

1. Introduction

Leishmaniasis are considered by the World Health Organization (WHO) to be a neglected tropical disease, primarily affecting people with low purchasing power worldwide, and is endemic in 98 countries on five continents. There are an estimated 700,000 to 1 million new cases reported each year, and 20,000 to 30,000 deaths per year (WHO, 2021). Currently, approximately 20 species of *Leishmania* capable of infecting humans are known, with *L. (V.)*

braziliensis and *L. (L.) amazonensis* are the main causative agents of tegumentar leishmaniasis in Brazil. Given the complicated therapies available, the search for new molecules with potential safety and activity against the leishmaniasis becomes indispensable (Roatt et al., 2020).

The Rubiaceae family is one of the most diverse among angiosperms, and can present species with large foliage, beautiful flowers, herbs, shrubs or trees, being present in tropical and subtropical regions, and widely distributed in the Brazilian Cerrado. With the advances in phylogenetic, molecular and taxonomic studies in recent decades, the Rubiaceae family has undergone several reorganizations. Currently, it is divided into 650 genera and 13,000 species (Martins & Nunez, 2015). Many species have economic importance, being used in the food and ornamental branches, also having therapeutic importance in various parts of the world. Popular examples are: *Coffea arabica* L. (coffee) and also *Cinchona pubescens* (producer of quinine) used in the treatment of malaria (Martins & Nunez, 2015).

The species contain a great diversity of secondary metabolites: iridoids, indolic alkaloids, anthraquinones, flavonoids, phenolic derivatives, diterpenes, triterpenes, among other alkaloids, however, the phytochemical profile of its compounds is still very little explored. In folk medicine, species of the Rubiaceae family are used to treat bruises, sprains, pain, rheumatic problems and other inflammatory processes. However, additional chemical and pharmacological studies are needed to prove such activities. Some isolated research already demonstrates antifungal, anti-inflammatory antihypertensive and antitumor properties (Almeida et al., 2018; Balde et al., 2010; Bolivar et al., 2011; Fabri, Nogueira, Braga, Coimbra, & Scio, 2009; Paulin et al., 2021).

The study of the antiparasitic activity of these Rubiaceae species native to Mato Grosso do Sul may reveal preliminary information related to data on their bioactive potential, since we still do not have such information. Considering the importance of ethnopharmacological data and therapeutic potential presented by species of the Rubiaceae family, we aimed to evaluate the antileishmania activity of the extracts from *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata* and *Coutarea hexandra*.

2. Results and discussion

The plant materials related to the species *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata* and *Coutarea hexandra* were collected in the state of Mato Grosso do Sul and data regarding parts of each plant used is shown in Table 1. Each plant extract was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and sterilized by filtration at concentration of 25 mg/mL. Subsequently, the extracts were diluted in Schneider's insect medium for the *L. amazonensis* promastigotes viability experiment.

Promastigotes of *L. amazonensis* were cultured in the presence of different concentrations (1000, 500, 250 and 125 µg/mL) of *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata* and *Coutarea hexandra* extracts, and cell viability was assessed by the resazurin method after 72 hours (Figure 1). Controls were made using medium only and 2% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO, viability higher than 95%) and all samples were tested in sextuplicates. We observed a reduction in the cell viability of *L. amazonensis* promastigotes when treated with *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora* and *Tocoyena formosa*

extracts at different concentrations compared to the control (Figure 1). *Randia armata* inhibited promastigote viability at only the higher concentration, and *Coutarea hexandra*, showed no activity against *L. amazonensis* under the conditions tested. The IC_{50} of each extract were calculated and is showed in Table 1.

We also evaluated the effects of Rubiaceae plant extracts in intracellular amastigote forms, which is the parasite form found in mammalian hosts, by treating *L. amazonensis*-infected mice macrophages. Infected cells were treated with 200, 100, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$ of each extract for 24 hours. After fixing and staining the slides, the number of amastigotes forms inside 200 macrophages per coverslip were determined by optical microscopy. We observed a reduction in the average number of amastigote forms inside each macrophage treated with *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora* and *Tocoyena formosa* extracts at different concentrations compared to the control (Figure 2). *Randia armata* and *Coutarea hexandra*, showed no activity against amastigote *L. amazonensis* under the conditions tested. The IC_{50} of each extract were calculated and is showed in Table 1.

The cytotoxicity of each plant extracts was also evaluated by treating NIH/3T3 cells for 24 hours, determining cell viability and calculating its CC_{50} , which is shown in Table 1. Most of the extracts exhibited cytotoxicity in concentrations higher than 100 $\mu\text{g/mL}$, and some showed CC_{50} similar to its IC_{50} against promastigote forms, resulting in low selectivity indexes for this parasite form. However, regarding the selectivity index to intracellular amastigote forms, *Rudgea viburnoides*, *Tocoyena formosa* and *Randia armata* extracts showed selectivity indexes of 3.2, 6.7 and 2.7, respectively (Table 1).

Finally, in order to investigate some mechanism involved in anti-*Leishmania* activity, we assessed nitric oxide production by infected and treated macrophages analyzing nitrite levels in culture supernatant by Griess reaction (Figure 3). Most of extracts and controls showed similar nitrite levels to the controls, infected macrophages without treatment. Only *Rudgea viburnoides* and *Diodia kuntzei* extracts at the highest concentration (200 µg/mL) exhibited nitrite levels higher than the control cells, together with 12,5 µM of pentamidine.

Several studies reported antiparasitic effect from Rubiaceae plant extracts, including *Leishmania* species (Almeida-Souza, de Oliveira, Abreu-Silva, & da Silva Calabrese, 2018; Balde et al., 2010; Bolivar et al., 2011; Cardona et al., 2020). The plants used in this study have not been tested to date to assess anti-*Leishmania* activity, but some of them have their popular use reported, such as *Rudgea viburnoides*, traditionally used for kidney problems and adjuvant in weight loss. Recent studies also explored its nephroprotective effect and treatment of metabolic and inflammatory disarrangement caused by obesity (Almeida et al., 2018; Moreira Galdino et al., 2017). Alves and collaborators (2004) conducted a study that bring ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological characteristics of several species of the Rubiaceae family: *Coutarea hexandra* was cited for having vitamins, flavonoids and coumarins, having its popular use to treat bronchitis, dandruff, inflammation in general, flu and malaria. *Richardia grandiflora* was also reported with popular use for respiratory and gastrointestinal ailments. The species *Tocoyena formosa*, on the other hand, is traditionally used to treat inflammatory problems, mainly of a joint and kidney nature. They also reported the presence of tannins, flavonoids, triterpenes and

saponins by thin layer chromatography of *Rudgea viburnoides* (R. M. S. Alves, Stehmann, Isaias, & Brandão, 2004).

Santos and collaborators (2013) tested extracts of several plants found in the Pantanal to evaluate the acaricidal potential on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, and observed that among others, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora* and *Tocoyena formosa* showed acaricidal activity greater than 95% against the larval stage for extracts at 40% (w/v) concentration (dos Santos et al., 2013). Some reports also explored the phytotoxic effect of *Tocoyena formosa* and *Rudgea viburnoides* (Vargas, Coelho, Cowo, Orrillo, & Spiller, 2019) and *Rudgea viburnoides* on *Spodoptera frugiperda* development, with poor effects (D. S. Alves, Carvalho, Oliveira, & Corrêa, 2018).

Recently, the aqueous extract from *Rudgea viburnoides* was described reduce the progression of cardiorenal disease in hypertensive rats, and the analysis of this extract showed glycosylated iridoids, chlorogenic acids, glycosylated triterpenes, O-glycosylated flavonols, and triterpenoid saponins (Paulin et al., 2021). Iridoids were recently revised as a potencial class of antileishmanial molecules. Also, phytochemical investigation of *Morinda lucida* Benth. (Rubiaceae) leaves yielded the isolation of three tetracyclic iridoids with anti-promastigote activity (Arrache Goncalves, Eifler-Lima, & von Poser, 2021). Purified clorogenic acid (CGA) showed in vitro activity against promastigotes and intracellular amastigotes into RAW264.7 macrophages inducing cell cycle arrest (Majumder et al., 2020). Triterpenes are known to be a representative group of phytochemicals with broad range of pharmacological effects, including antileishmanial activity (Cortes, Bruno de Sousa, Morais, Lago, & Campino, 2020). Also, flavonols can act as arginase inhibitors, which has emerged as a

potential therapeutic target against *Leishmania* (Carter et al., 2021). The structures and action of several plant neoflavonoids were revised. The structure of a 4-phenylcoumarin found in *Coutarea hexandra*, coutareagenin, has been reported for antidiabetic effect in rats (Padam Kumar, 2020).

Despite all the recent literature regarding the phytochemical composition and biological activities of several plants from Rubiaceae family, this is the first description of antileishmanial activity for these species. The nitric oxide production was detected in some extracts, but this is only one potential mechanism against parasites, which could involve membrane disruption, inhibition of enzymes, cell cycle arrest, and so on (Raj, Sasidharan, Balaji, & Saudagar, 2020). Also, the selectivity indexes obtained here for these extracts are low, as SI higher than 10 are desirable regarding promising extracts and molecules with therapeutic potential (Gervazoni, Barcellos, Ferreira-Paes, & Almeida-Amaral, 2020; Katsuno et al., 2015). A more elaborate phytochemical study and the fractionation of extracts will be essential to track the antileishmanial activity of these extracts.

3. Concluding remarks

The study of the antiparasitic activity of these Rubiaceae species native to Mato Grosso do Sul may reveal preliminary information related to data on their bioactive potential against *Leishmania*. Considering the importance of ethnopharmacological data and therapeutic potential presented by species of the Rubiaceae family, future phytochemical study and the fractionation of extracts will be essential to track the antileishmanial activity of these extracts.

4. Experimental

4.1 *Plant material and extracts*

The plant materials related to the species *Rudgea viburnoides*, *Diodia kuntzei*, *Richardia grandiflora*, *Tocoyena formosa*, *Randia armata* and *Coutarea hexandra* were collected in the state of Mato Grosso do Sul (Fazenda São Bento - municipality of Sidrolândia), properly identified by and deposited in the herbarium of University of Mato Grosso do Sul (UFMS). Data regarding parts of each plant used is shown in Table 1. Plant materials were dried in a circulating air oven, crushed and extracted using a Dionex ASE 150 pressurized fluid extractor, using ethanol:water (7:3), which were previously extracted with hexane:acetone (8:2) to remove apolar substances. Each plant extract was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and sterilized by filtration.

4.2 *Antipromastigote assay*

Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* strain PH8 (IFLA/BR/67/PH8) in logarithmic phase in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich - appropriately supplemented) were distributed in 96-well plates (1×10^5 promastigotes/100 μL /well) containing the extracts at concentrations of 1000, 500, 250 and 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each extract. The plates were incubated for 72 hours at 26°C, after this step, 5 μL of a 0.2 mg/mL resazurin solution (Sigma-Aldrich/USA) was added to each well. After 4 hours of incubation at 37°C, absorbance reading of the wells was performed by spectrophotometry at 570 and 600 nm. Control wells with DMSO 2.5% (v/v) and Amphotericin B 1 μM (Sigma-Aldrich/USA) were also made. Wells containing only the parasites and culture medium were considered as 100% viability (live control - VC). The viability of all wells was

calculated according to the information and formula available by manufacturer. The calculation of the inhibition concentration (IC_{50}) was done by linear regression plotting the \log_{10} of each inhibitor concentration against the percent activity with the GraphPad Prism 5 software.

4.3 Anti-intracellular amastigotes assay

Peritoneal macrophages from Balb/c mice (Ethics certificate CEUA/UFMS nº 1.041/2019) were adhered to circular coverslips at the bottom of 24-wells plates, maintained at 37°C and 5% CO₂ humidified atmosphere, RPMI supplemented medium, infected with *L. amazonensis* promastigotes and treated with 200, 100, 50 and 25 µg/mL of each extract for 24 hours. Then the coverslips with cells were fixed with Bouin solution, stained with Giemsa, and mounted with Entellan on microscope slides to assess, by optical microscopy, the number of amastigote forms inside 200 macrophages per coverslip. Each concentration of plant extract and controls were tested in sextuplicate. The calculation of the inhibition concentration (IC_{50}) was done by linear regression plotting the \log_{10} of each inhibitor concentration against the percent activity with the GraphPad Prism 5 software.

4.4 Cytotoxicity assay

NIH/3T3 cells (ATCC CRL-1658, mouse fibroblasts lineage) were cultured in 96-well plates (1×10^4 cells in 100 µL per well) in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin, streptomycin, and 10% fetal bovine serum and adhered overnight at 37°C and 5% CO₂. The medium was replaced by fresh RPMI medium with different concentrations of each plant extract (2000 at 31.25 µg/mL) in quintuplicate and incubated for 24 hours. Fibroblasts treated with

doxorubicin (100 to 1.56 μM) were used as a death control, as well as fibroblasts cultured with culture medium alone were used as a life/viability control. Then 10 μl of 5 mg/ml MTT solution (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, USA) was added to each well and incubated for 4 h 37°C and 5% CO₂. The medium was discarded and 80 μl of dimethylsulfoxide was added to each well to dissolve the formazan crystals and then the plate was read at 570 nm (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Scientific). Cell viability was evaluated from optical density at 570 nm and compared to untreated cells. The calculation of the cytotoxic concentration (CC₅₀) was done by linear regression plotting the log₁₀ of each inhibitor concentration against the percent activity with the GraphPad Prism 5 software.

4.5 NO determination.

To determine NO levels in the supernatant of infected macrophages cultures, the concentration of nitrite was determined by the Griess reaction (Gilliam, Sherman, Griscavage, & Ignarro, 1993; Vespa, Cunha, & Silva, 1994). Briefly, 50 μL of each culture supernatant were mixed with 50 μL of Griess reagent [1:1 (v/v) 0,1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEED, Sigma-Aldrich) in water: 1% sulfanilamide (Sigma-Aldrich) in 3% phosphoric acid (Sigma-Aldrich)] in 96-well plates (Costar). After 5 minutes of incubation, the absorbance was recorded at 554 nm in a spectrophotometer. RPMI was used as blank reaction and a calibration curve was made with known concentrations of NaNO₂ (Sigma-Aldrich) diluted in RPMI. The assay was performed in sextuplicate.

4.6 Statistical analysis

All experiments were performed in sextuplicate and the mean and standard deviation were calculated for each of the determinations. When necessary to compare variances, ANOVA was used, supplemented by the parametric "t" test, with a 95% confidence interval. The statistical tests were performed with the GraphPad Prism 5.0 software. The significance level was 5%.

Acknowledgements: Federal University of Mato Grosso do Sul, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

The authors declare no competing interests.

TABLES

Table 1. Activity of Rubiaceae plant extracts against *Leishmania amazonensis*.

Plant species	Nº Herbarium UFMS	Parts of plant	IC ₅₀ ± SD (µg/mL) promastigotes forms	IC ₅₀ ± SD (µg/mL) intracellular amastigotes forms	CC ₅₀ ± SD (µg/mL) NIH/3T3 fibroblasts	SI _{pro}	SI _{ama}
<i>Rudgea viburnoides</i>	CGMS 74319	L	101.1 ± 0.11	40.25 ± 0.07	128.9 ± 0.15	1,27	3,20
<i>Diodia kuntzei</i> K.Schum.	CGMS 34921	TP/FL	350.6 ± 0.06	89.77 ± 0.07	109.7 ± 0.10	0,31	1,22
<i>Richardia grandiflora</i> (Cham. & Schlttdl.) Steud.	CGMS 34929	AP/FL	404.1 ± 0.08	123.8 ± 0.14	238.7 ± 0.12	0,59	1.93
<i>Tocoyena formosa</i> (Cham. & Schlttdl.) K.Schum.	CGMS 34946	L/TB	209.7 ± 0.16	57.57 ± 0.07	384.9 ± 0.17	1,83	6,69
<i>Randia armata</i> (Sw.) DC	CGMS 34943	L/FR/TB	> 1000	230.1 ± 0.33	627.4 ± 0.15	0,62	2,72
<i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K.Schum.	CGMS 38933	B/L/TB	> 1000	296.7 ± 0.18	151.6 ± 0.15	0,15	0,51
Amphotericin B (µM)	-	-	-	1.196 ± 0.08	19.26 ± 0.1	-	16,10
Pentamidine (µM)	-	-	-	7.925 ± 0.05	13.67 ± 0.1	-	1,72
Doxorubicin (µM)	-	-	-	-	7.71 ± 0.3	-	-

Notes: (-): not tested. TP: total parts (root, leaves, thin branches); FL: flowers; AP: aerial parts; TB: thin branches; L: leaves; B: bark; FR: fruits. CC₅₀ = half-maximal cytotoxic concentration ± standard deviation on NIH/3T3 cells. IC₅₀ = half-maximal inhibitory concentration ± standard deviation in promastigote or amastigote forms. SI_{pro} = CC₅₀ on NIH-3T3 cells / IC₅₀ on promastigotes; SI_{ama} = CC₅₀ on NIH-3T3 cells / IC₅₀ on amastigotes.

FIGURES

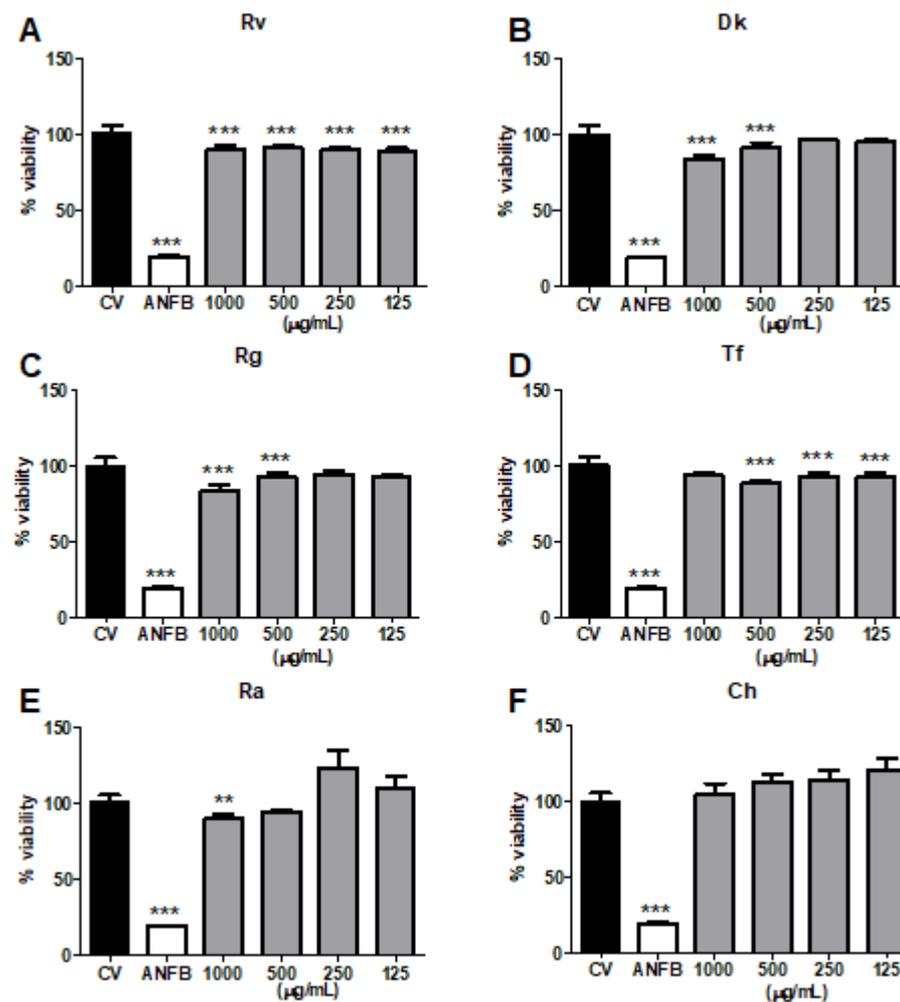


Figure 1. Effect of Rubiaceae plants hydroalcoholic extracts on promastigotes forms of *L. amazonensis* and a reference drug amphotericin B. A) *Rudgea viburnoides* (Rv); B) *Diodia kuntzei* (Dk); C) *Richardia grandiflora* (Rg); D) *Tocoyena formosa* (Tf). E) *Randia armata* (Ra); F) *Coutarea hexandra* (Ch); CV: control of viability (medium only); ANFB: amphotericin B 1µM. Significant differences between non-treated controls and treatments are expressed as * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA).

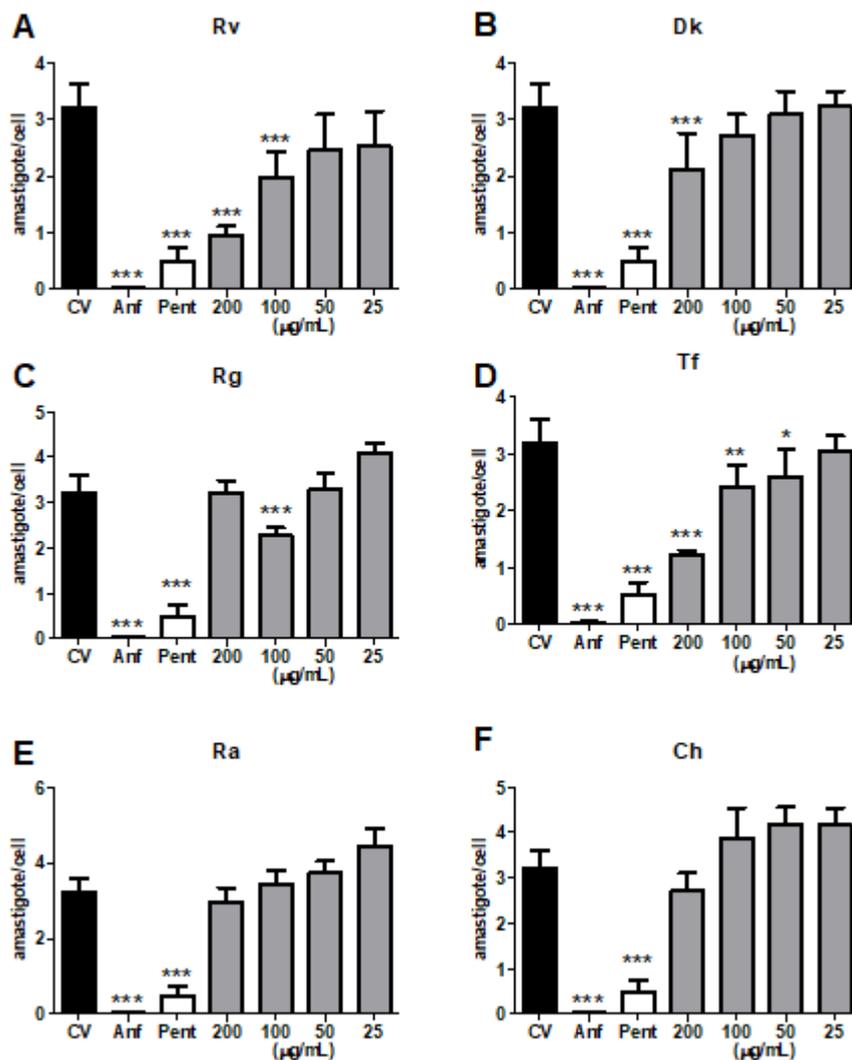


Figure 2. Effect of Rubiaceae hydroalcoholic extracts on amastigote forms of *L. amazonensis*-infected macrophages and reference drugs anphotericin B (Anf) and pentamidin (Pent). A) *Rudgea viburnoides* (Rv); B) *Diodia kuntzei* (Dk); C) *Richardia grandiflora* (Rg); D) *Tocoyena formosa* (Tf). E) *Randia armata* (Ra); F) *Coutarea hexandra* (Ch); CV: control of viability (medium only); Significant differences between non-treated controls and treatments are expressed as * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA).

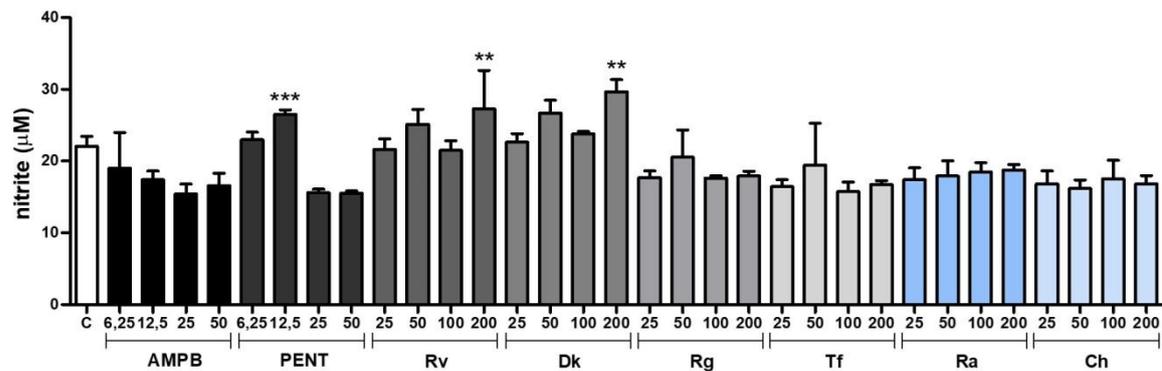
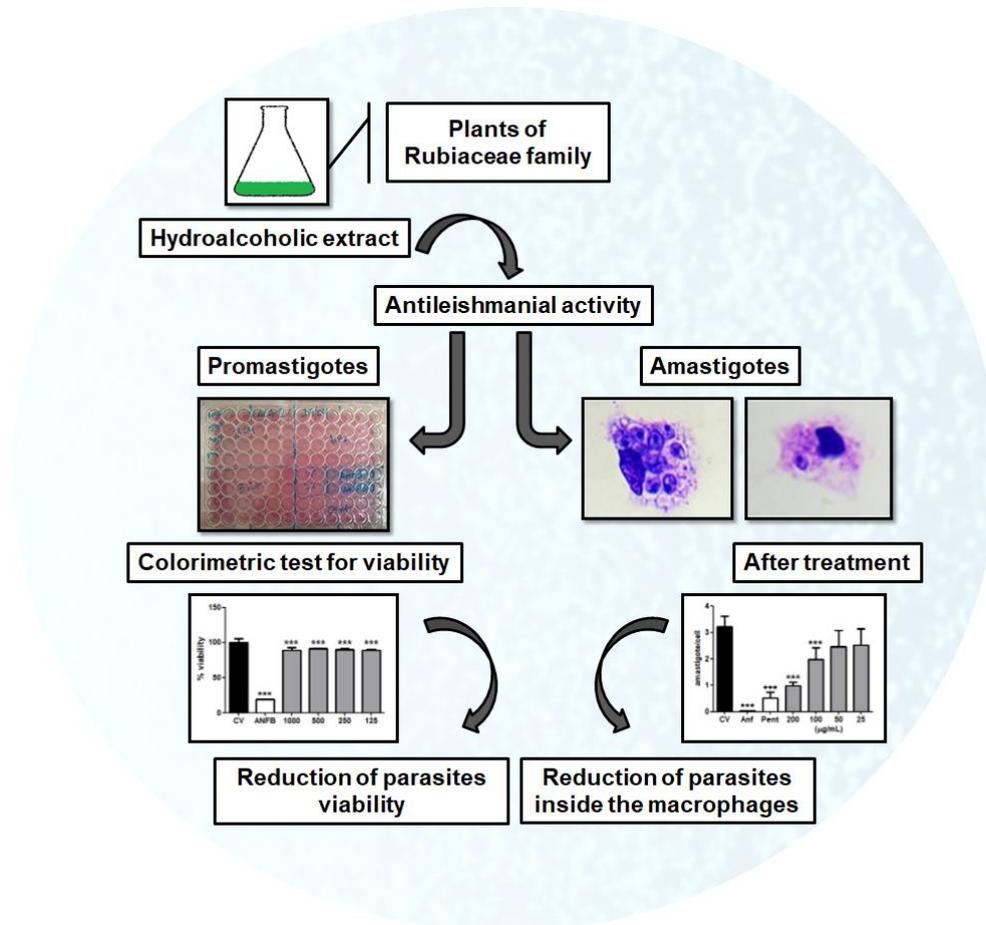


Figure 3. Effect of Rubiaceae hydroalcoholic extracts on nitric oxide production by *L. amazonensis*-infected macrophages and reference drugs anphotericin B (AMPB) and pentamidin (Pent). *Rudgea viburnoides* (Rv); *Diodia kuntzei* (Dk); *Richardia grandiflora* (Rg); *Tocoyena formosa* (Tf); *Randia armata* (Ra); *Coutarea hexandra* (Ch); C: control (medium only); Significant differences between non-treated controls and treatments are expressed as ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA).

Graphical abstract



Highlights

- Leishmaniasis are caused by *Leishmania* sp. protozoan, considered by the WHO as neglected tropical diseases.
- Available treatments make patient adherence difficult due to the high cost, parenteral administration and several collateral effects.

- Considering the vast biodiversity and ethnopharmacological surveys in our country, we evaluated in vitro activity of plant extracts of the Rubiaceae family against *Leishmania amazonensis*

- We observed the reduction of cell viability of promastigotes forms of *L. amazonensis* and reduction of intracellular amastigote in infected macrophages. The realization of phytochemical studies and assays with intracellular amastigotes could contribute to perfect the pharmacological profile of these extracts.

References

- Almeida-Souza, F., de Oliveira, A. E. R., Abreu-Silva, A. L., & da Silva Calabrese, K. (2018). In vitro activity of *Morinda citrifolia* Linn. fruit juice against the axenic amastigote form of *Leishmania amazonensis* and its hydrogen peroxide induction capacity in BALB/c peritoneal macrophages. *BMC Res Notes*, *11*(1), 492. doi:10.1186/s13104-018-3555-7
- Almeida, J. M. A., Ferreira, A. V. M., Oliveira, V. B., Oliveira, M. C., Teixeira, M. M., & Brandao, M. G. L. (2018). Effects of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Rubiaceae) Leaves on Metabolic and Inflammatory Dysfunction Induced by High Refined Carbohydrate-Containing Diet in Mice. *J Med Food*, *21*(12), 1266-1275. doi:10.1089/jmf.2018.0016
- Alves, D. S., Carvalho, G. A., Oliveira, D. F., & Corrêa, A. D. (2018). Screening of Brazilian plant extracts as candidates for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, *44*(1), 32-38. doi:<https://doi.org/10.25100/socolen.v44i1.6539>
- Alves, R. M. S., Stehmann, J. R., Isaias, R. M. S., & Brandão, M. G. L. (2004). Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *14*(1), 49-56. doi:<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2004000100007>
- Arrache Goncalves, G., Eifler-Lima, V. L., & von Poser, G. L. (2021). Revisiting nature: a review of iridoids as a potential antileishmanial class. *Phytochem Rev*, 1-26. doi:10.1007/s11101-021-09750-8
- Balde, E. S., Megalizzi, V., Traore, M. S., Cos, P., Maes, L., Decaestecker, C., . . . Balde, A. M. (2010). In vitro antiprotozoal, antimicrobial and antitumor activity of *Pavetta crassipes* K. Schum leaf extracts. *J Ethnopharmacol*, *130*(3), 529-535. doi:10.1016/j.jep.2010.05.042
- Bolivar, P., Cruz-Paredes, C., Hernandez, L. R., Juarez, Z. N., Sanchez-Arreola, E., Av-Gay, Y., & Bach, H. (2011). Antimicrobial, anti-

- inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *J Ethnopharmacol*, 137(1), 141-147. doi:10.1016/j.jep.2011.04.069
- Cardona, G. W., Robledo, S., Alzate, F., Yepes, A. F., Hernandez, C., Velez, I. D., . . . Tabares, I. V. (2020). Antileishmanial and cytotoxic activities of four Andean plant extracts from Colombia. *Vet World*, 13(10), 2178-2182. doi:10.14202/vetworld.2020.2178-2182
- Carter, N. S., Stamper, B. D., Elbarbry, F., Nguyen, V., Lopez, S., Kawasaki, Y., . . . Roberts, S. C. (2021). Natural Products That Target the Arginase in Leishmania Parasites Hold Therapeutic Promise. *Microorganisms*, 9(2). doi:10.3390/microorganisms9020267
- Cortes, S., Bruno de Sousa, C., Morais, T., Lago, J., & Campino, L. (2020). Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World - a review of in-vitro studies. *Pathog Glob Health*, 114(4), 170-182. doi:10.1080/20477724.2020.1754655
- dos Santos, L. B., Souza, J. K., Papassoni, B., Borges, D. G., Damasceno, G. A., Jr., de Souza, J. M., . . . Borges Fde, A. (2013). Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 22(4), 532-538. doi:10.1590/S1984-29612013000400013
- Fabri, R. L., Nogueira, M. S., Braga, F. G., Coimbra, E. S., & Scio, E. (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresour Technol*, 100(1), 428-433. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.053
- Gervazoni, L. F. O., Barcellos, G. B., Ferreira-Paes, T., & Almeida-Amaral, E. E. (2020). Use of Natural Products in Leishmaniasis Chemotherapy: An Overview. *Front Chem*, 8, 579891. doi:10.3389/fchem.2020.579891
- Gilliam, M. B., Sherman, M. P., Griscavage, J. M., & Ignarro, L. J. (1993). A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal Biochem*, 212(2), 359-365. doi:10.1006/abio.1993.1341
- Katsuno, K., Burrows, J. N., Duncan, K., Hooft van Huijsduijnen, R., Kaneko, T., Kita, K., . . . Slingsby, B. T. (2015). Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov*, 14(11), 751-758. doi:10.1038/nrd4683
- Majumder, N., Ganguly, S., Ghosh, A. K., Kundu, S., Banerjee, A., & Saha, S. (2020). Chlorogenic acid acts upon *Leishmania donovani* arresting cell cycle and modulating cytokines and nitric oxide in vitro. *Parasite Immunol*, 42(6), e12719. doi:10.1111/pim.12719
- Martins, D., & Nunez, C. V. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20(7), 13422-13495. doi:10.3390/molecules200713422
- Moreira Galdino, P., Nunes Alexandre, L., Fernanda Pacheco, L., de Souza Lino Junior, R., de Paula, J. R., Rodrigues Pedrino, G., . . . Maria Ferreira, P. (2017). Nephroprotective effect of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth leaves on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol*, 201, 100-107. doi:10.1016/j.jep.2017.02.035
- Padam Kumar, T. A., Devendra Pratap Mishra and Mohammad Faheem Khan. (2020). Plant Neoflavonoids: Chemical Structures and Biological Functions. *Plant-derived Bioactives*, 36-53. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-15-2361-8_3

- Paulin, F. V., Palozi, R. A. C., Lorencone, B. R., Macedo, A. L., Guarnier, L. P., Tirloni, C. A. S., . . . Silva, D. B. (2021). Prolonged Administration of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Prevents Impairment of Redox Status, Renal Dysfunction, and Cardiovascular Damage in 2K1C-Hypertensive Rats by Inhibiting ACE Activity and NO-GMPC Pathway Activation. *Pharmaceutics*, *13*(10). doi:10.3390/pharmaceutics13101579
- Raj, S., Sasidharan, S., Balaji, S. N., & Saudagar, P. (2020). An overview of biochemically characterized drug targets in metabolic pathways of *Leishmania* parasite. *Parasitol Res*, *119*(7), 2025-2037. doi:10.1007/s00436-020-06736-x
- Roatt, B. M., de Oliveira Cardoso, J. M., De Brito, R. C. F., Coura-Vital, W., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., & Reis, A. B. (2020). Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, *104*(21), 8965-8977. doi:10.1007/s00253-020-10856-w
- Vargas, S. H., Coelho, M. d. F. B., Cowo, E. S., Orrillo, H. M., & Spiller, C. (2019). Phytotoxic potential of aqueous leaf extract of *Tocoyena formosa* and *Rudgea viburnoides*. *Revista Ceres [online]*. *66*(5), 380-386. doi:<https://doi.org/10.1590/0034-737X201966050007>
- Vespa, G. N., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*, *62*(11), 5177-5182.