



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



VITÓRIA REGINA BRACHT DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA SP DE
EXTRATOS DE FRUTOS SECOS COLETADOS NO MATO
GROSSO DO SUL**

Campo Grande

2023

VITÓRIA REGINA BRACHT DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA SP DE
EXTRATOS DE FRUTOS SECOS COLETADOS NO MATO
GROSSO DO SUL**

Trabalho de Conclusão de Curso do curso de graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do grau de bacharel em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul

Campo Grande

2023

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas que atinge, principalmente, regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada uma doença endêmica no Brasil. Os medicamentos disponíveis para o tratamento apresentam alta toxicidade, administração parenteral e efeitos adversos significativos. A pesquisa e desenvolvimento de novas opções terapêuticas para a leishmaniose, realizada a partir de produtos naturais, buscando melhor eficácia, menos efeitos adversos, um melhor custo-benefício e seja de fácil administração, seria de grande inovação para o tratamento da doença. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antileishmaniana dos extratos dos frutos secos das seguintes espécies de plantas presentes no cerrado: *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), *Jacaranda cuspidifolia* (Bignoniaceae), *Samanea tubulosa* (Fabaceae) e *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae). Foram realizados ensaios colorimétricos de viabilidade com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e fibroblastos NIH/3T3 para avaliação da atividade antileishmaniana e sua seletividade. Observou-se que os extratos de *Cybistax antisyphilitica* e *Hymenaea stigonocarpa* apresentaram o maior índice de seletividade entre os extratos testados (2,4 e 2,1, respectivamente). Esse índice de seletividade, apesar de baixo, indica a presença de possíveis compostos ativos contra *Leishmania* dentre os extratos testados, o que pode direcionar estudos futuros sobre a composição química e atividades biológicas relacionadas a estas espécies.

Palavras-chave: leishmaniose, *Leishmania amazonensis*, produtos naturais, *Cybistax antisyphilitica*, *Hymenaea stigonocarpa*

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases that mainly affects tropical and subtropical regions and are considered an endemic disease in Brazil. The drugs available for treatment are highly toxic, parenterally administered and have significant adverse effects. The research and development of new therapeutic options for leishmaniasis, based on natural products, seeking better efficacy, fewer adverse effects, a better cost-benefit ratio and easy administration, would be a great innovation for the treatment of the disease. The aim of this study was to evaluate the anti-leishmanial activity of extracts from the dried fruits of the following plant species found in the Cerrado: *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), *Jacaranda cuspidifolia* (Bignoniaceae), *Samanea tubulosa* (Fabaceae) and *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae). Colorimetric viability assays were carried out with promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and NIH/3T3 fibroblasts to assess their anti-leishmanial activity and selectivity. It was observed that the extracts of *Cybistax antisyphilitica* and *Hymenaea stigonocarpa* showed the highest selectivity index among the extracts tested (2.4 and 2.1, respectively). This selectivity index, although low, indicates the presence of possible active compounds against *Leishmania* among the extracts tested, which may lead to future studies on the chemical composition and biological activities related to these species.

Keywords: leishmaniasis, *Leishmania amazonensis*, natural products, *Cybistax antisyphilitica*, *Hymenaea stigonocarpa*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
2.1 Aspectos biológicos.....	7
2.1.1 Ciclo no hospedeiro invertebrado	7
2.1.2 Ciclo no hospedeiro vertebrado	7
2.2 <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	8
2.2.1 Epidemiologia	8
2.2.2 Formas clínicas da doença.....	9
2.3 Diagnóstico.....	10
2.3.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico	10
2.3.1 Diagnóstico laboratorial	10
2.4 Tratamento.....	11
2.4.1 Antimonial Pentavalente.....	11
2.4.2 Anfotericina B	12
2.4.3 Pentamidina.....	13
2.5 Busca de novas alternativas de tratamento	13
2.6 Plantas do cerrado testadas para inibição da atividade do parasita	14
2.6.1 <i>Cybistax antisiphilitica</i> (Bignoniaceae).....	14
2.6.2 <i>Jacaranda cuspidifolia</i> (Bignoniaceae)	14
2.6.3 <i>Samanea tubulosa</i> (Fabaceae).....	14
2.6.4 <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Fabaceae)	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1 Material vegetal e preparação dos extratos.....	16
4.2 Manutenção de <i>Leishmania amazonensis</i>	16
4.3 Atividade antipromastigota.....	17
4.4 Ensaio de citotoxicidade.....	17
4.5 Análise dos resultados	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Atividade antipromastigota.....	18
5.2 Ensaio de citotoxicidade.....	20
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são algumas das doenças mais negligenciadas do mundo, que seguem em ascensão no Brasil, sendo consideradas doenças endêmicas que atingem, principalmente, regiões tropicais e subtropicais, como parte do continente americano, asiático, europeu e africano. Estima-se que existam cerca de 1 bilhão de pessoas vivendo nessas áreas com maior risco de contrair a infecção e que ocorram 2 milhões de novos casos por ano (OPAS, 2022). A doença tem se alastrado por países que antes não apresentavam risco, sendo assim, é considerada um problema de saúde pública substancial (OPAS, 2022). Porém, há uma deficiência de registros oficiais dos casos, sendo difícil de avaliar os dados disponíveis e estabelecer padrões epidemiológicos, o que torna complexo a adoção de medidas de controle da doença.

As leishmanioses são causadas por diferentes tipos de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. São divididas de acordo com os órgãos que acometem, sendo a Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose mucocutânea (LMC) que acomete a pele e as mucosas, e a Leishmaniose Visceral (LV), que acomete principalmente o baço, fígado e a medula óssea (NEVES, 2005 e LINDOSO, 2012).

Atualmente, o tratamento de primeira escolha para leishmaniose é realizado com fármacos que apresentam efeitos adversos graves no coração, rim, pâncreas e fígado, além de ter alto custo e ser de difícil administração, sendo eles o antimonial pentavalente (Glucantime®), anfotericina B e pentamidina. Sendo assim, este trabalho visa a pesquisa de novos compostos com atividade antileishmania, realizada a partir de testes de atividade antileishmania *in vitro* com extratos de plantas, buscando menos efeitos adversos, um melhor custo-benefício e que seja de fácil administração, o que seria de grande inovação para o tratamento da doença.

Neste contexto, sabe-se que o cerrado brasileiro, em especial no Mato Grosso do Sul, possui flora diversificada e rica em matéria prima para a pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas de tratamento. As plantas cujos frutos secos foram utilizados neste trabalho incluem *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae), *Jacaranda cuspidifolia* (Bignoniaceae), *Samanea tubulosa* (Fabaceae) e *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae), conhecidas como Ipê-verde, Jacarandá, Sete cascas e

Jatobá-do-cerrado, respectivamente. São plantas medicinais, já utilizadas pela população da região, tendo em suas composições ativos farmacológicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos biológicos

As leishmanioses são doenças infecciosas transmitidas através da hematofagia do inseto flebotômíneo fêmea da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e espécie *Lutzomyia*, popularmente conhecidos como “mosquito-palha”. O ciclo biológico é realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e o invertebrado. Os hospedeiros vertebrados incluem uma variedade de mamíferos, como humanos, roedores, cavalos, animais selvagens e répteis (MONTENER-ANGOITE, 2023 e NEVES, 2005).

2.1.1 Ciclo no hospedeiro invertebrado

A infecção dos insetos ocorre quando a fêmea pica o hospedeiro vertebrado e juntamente com o sangue, ingere macrófagos infectados pela forma amastigota, que se transformam em promastigota dentro do inseto, que após rompido o macrófago e em forma livre, se multiplicam por divisão binária (NEVES, 2005). Dependendo da espécie do protozoário, a forma promastigota pode seguir por caminhos distintos. No primeiro, as formas promastigotas migram para o intestino, onde ocorre a transformação em paramastigotas, que ficam aderidas no epitélio intestinal através de seus flagelos, continuando sua multiplicação. Em seguida, são transformadas novamente na forma promastigota infectantes, onde seguem para a faringe do inseto (NEVES, 2005; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

No segundo caminho, as formas promastigotas seguem para a região anterior do estômago, onde ocorre a diferenciação em paramastigota, colonizando a faringe e o esôfago do vetor. Então, sofrem nova transformação para a forma promastigota metacíclica (NEVES, 2005; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

2.1.2 Ciclo no hospedeiro vertebrado

A transmissão ocorre durante o processo de hematofagismo do flebotomíneo, onde as formas promastigotas são introduzidas pelo local da picada. A saliva do vetor contém neuropeptídeos que tem poder para causar uma supressão da resposta imune do hospedeiro vertebrado, facilitando o processo de infecção. Dentro de 4 a 8 horas às formas promastigotas encontram-se no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos (NEVES, 2005).

As formas promastigotas se transformam em amastigotas no interior do macrófago, se multiplicando por divisões binárias, até o citoplasma estar completamente preenchido. Então, há o rompimento da membrana do macrófago, liberando as formas amastigotas no tecido, causando o processo de inflamação. O processo inflamatório varia de acordo com a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da espécie do parasita que foi transmitida, desencadeando diferentes quadros clínicos (NEVES, 2005).

2.2 *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

2.2.1 Epidemiologia

Subdividida em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, totaliza mais de 20 espécies do protozoário parasita, sendo que a leishmaniose tegumentar americana (LTA), encontra-se de forma endêmica em pelo menos 89 países, sendo a maior incidência nos países da América como Brasil, Colômbia e Peru (OPAS, 2022). No Brasil há um alto número de casos, sobretudo em Mato Grosso do Sul, com a transmissão da doença pelas espécies *Leishmania (Viannia) brasiliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, que são amplamente distribuídas no território brasileiro (DORVAL *et al.*, 2006 e NEVES, 2005).

Os principais vetores da *Leishmania (L.) amazonensis* são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva*, que tem hábitos noturnos e vôos baixos, atingindo no máximo 1 metro do chão. A transmissão ocorre com a inoculação, pela saliva do flebotomíneo fêmea, das formas promastigotas metacíclicas, que se ligam aos macrófagos do hospedeiro vertebrado. No interior do fagossoma, as formas promastigotas transformam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão binária, dando início a infecção (NEVES, 2005).

2.2.2 Formas clínicas da doença

As formas clínicas da doença são divididas em lesões cutâneas, cutâneo mucosas e por uma forma menos comum e de difícil tratamento, chamada de cutâneo difusa anérgica. Sendo assim, a leishmaniose tegumentar americana é uma doença de evolução crônica, não contagiosa, sendo considerada uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido a apresentação de estado clínico grave e a dificuldade tanto no diagnóstico quanto no tratamento dos enfermos (DORVAL, 2006).

A leishmaniose cutânea (LC) é identificada pelo aparecimento de lesões na pele, que têm início no local da picada do vetor, onde foram inoculadas as formas promastigotas infectantes (GONTIJO e CARVALHO, 2003). As primeiras lesões cutâneas levam de 2 semanas a 3 meses para aparecerem, podendo permanecer como uma pápula eritematosa ou progredir para um histiocitoma (nódulo). Porém, a forma de apresentação das lesões cutâneas varia de acordo com o estado imunológico do paciente, podendo ser classificadas em nódulos, ulceração inicial, úlcera estabilizada com lesão-satélite e lesão cicatrizada (NEVES, 2005; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021). As lesões da leishmaniose mucocutânea ou cutâneo-mucosa (LCM) são consideradas uma forma tardia da doença, já que podem ocorrer durante lesão cutânea inicial ativa ou anos após sua cicatrização. Acomete principalmente a mucosa nasal, comprometendo o septo, seguindo para a mucosa oral, com possibilidade de deformidades permanentes. Está relacionada à demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inadequado (GONTIJO e CARVALHO, 2003).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma clínica rara e grave, onde não há uma boa resposta aos tratamentos medicamentosos. Ocorre em pacientes com deficiência da resposta imune celular aos antígenos da *Leishmania*. Esta condição inicia-se com lesão única que progride para formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações que recobrem uma grande área cutânea (Ministério da Saúde, 2010). As lesões não cicatrizam de forma espontânea. Ainda, esta forma de leishmaniose, quando crônica, pode causar osteomielite nas extremidades (mãos e pés), levando a perda de substâncias ósseas (SILVEIRA, 2009).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico em fase inicial da leishmaniose tegumentar é de extrema importância para dar início ao tratamento adequado e controlar as complicações dessa doença, já que essa forma de leishmaniose pode desencadear lesões cutâneas crônicas e desfigurantes. É realizado com base na região geográfica, analisando se é uma região endêmica ou não, por exames clínicos e laboratoriais. Normalmente associa-se mais de uma informação para poder chegar ao diagnóstico correto (NEVES, 2005; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

2.3.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico

O diagnóstico leva em consideração dados epidemiológicos, ou seja, saber se a região do paciente é uma área endêmica ou se ele esteve em locais que há casos de leishmaniose. Além disso, para o diagnóstico clínico é realizada a anamnese do paciente, com avaliação das características das lesões (NEVES, 2005 e VASCONCELOS, 2018). Somente a análise clínica não é suficiente, já que há diversos tipos de manifestações clínicas, como as lesões cutâneas, lesões mucocutâneas e a forma cutânea difusa.

O diagnóstico diferencial deve ser feito, já que doenças como tuberculose cutânea, hanseníase, sífilis e neoplasias, podem ser confundidas com a leishmaniose por conta das semelhanças entre as lesões. Sendo assim, o diagnóstico laboratorial é imprescindível para o diagnóstico final (NEVES, 2005 e VASCONCELOS, 2018).

2.3.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é realizado por exame parasitológico direto, através de escarificação, impressão por aposição ou aspirado por agulha fina para análise histológica, testes sorológicos pelo método de ELISA e o teste cutâneo com antígenos de leishmania, conhecido como reação de Montenegro (MINISTERIO DA SAÚDE, 2017).

Na escarificação é feita uma raspagem superficial na borda da lesão com a utilização de um bisturi. Com o material coletado, faz-se um esfregaço em lâmina que é levado para coloração (COSTA, 2000). A impressão por aposição é realizada com a coleta de uma parte do tecido da lesão, obtido por biópsia, que é colocado sobre a

lâmina de vidro, fixado e corado. Em ambos os métodos, é utilizado a técnica de coloração de *Giemsa* ou *Leishman* (ANDRADE, 2018).

O diagnóstico por histopatologia depende da identificação de amastigotas nas amostras coletadas, porém, não confirmam qual a espécie do parasita encontrada. Não são considerados testes sensíveis, já que para confirmação diagnóstica por esses métodos, as lesões devem ser recentes e com cargas parasitárias altas. Quanto mais antiga a lesão, menor a probabilidade de se encontrar os parasitas na derme (COSTA, 2000 e ANDRADE, 2018).

Para confirmação da espécie do parasita, é utilizado o teste microbiológico de cultivo para isolamento da forma promastigota, em meio de cultura NNN (Neal, Novy, Nicolle) associado ao LIT (*Liver Infusion Triptose*) Esse método apresenta sensibilidade reduzida, já que as espécies de *Leishmania* apresentam crescimento variável, levando quase 30 dias para a obtenção de quantidade suficiente de promastigotas para investigação, já que deve ser realizado três repiques, com intervalo de 10 dias entre um e outro (COSTA, 2000 e NEVES, 2005).

Um método que tem sido utilizado, é a pesquisa de DNA do parasita através do método de PCR (reação em cadeia da polimerase), que apresentou alta sensibilidade, permitindo identificar o gênero do agente etiológico. É realizado a partir do material coletado para biópsia (NEVES, 2005; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

A reação de Montenegro é um teste imunológico, que apresenta alta sensibilidade. É realizado a partir de uma reação de hipersensibilidade, onde é inoculado, de forma intradérmica, o antígeno contendo promastigotas mortas. Nos casos de resposta positiva, ocorre um processo de inflamação no local, formando um nódulo avermelhado (NEVES, 2005).

2.4 Tratamento

2.4.1 Antimonial Pentavalente

O fármaco de primeira escolha utilizado no Brasil é o Antimoniato-N-metilglucamina (Glucantime), disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes não foi esclarecido ainda, mas sabe-se tem relação com a inibição da via glicolítica do parasita e a diminuição da adenosina trifosfato (ATP). (COSTA, 2000 e VASCONCELOS, 2018).

A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 10mg a 20mg Sb⁵⁺/Kg/dia, para adultos e crianças, administrado via endovenosa ou intramuscular, por 20 dias consecutivos para lesões cutâneas e 30 dias para lesões mucosas. Até a sexta semana após o fim do tratamento, as lesões devem começar o processo de cicatrização, sendo concluído ao fim do terceiro mês. Caso isso não ocorra, a droga de segunda escolha deve ser utilizada. (COSTA, 2000 e VASCONCELOS, 2018).

Esse medicamento apresenta alta toxicidade, tendo muitos efeitos adversos, não sendo recomendado para adultos maiores de 50 anos, que tenham cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e sejam portadores da doença de Chagas. Não deve ser administrado para gestantes, pois o antimônio é abortivo. (COSTA, 2000; NEVES, 2005 e VASCONCELOS, 2018).

Os efeitos adversos variam entre mialgia, cefaleia, alterações gastrointestinais, alterações eletrocardiográficas, aumento das enzimas pancreáticas e hepáticas, insuficiência renal aguda. Já foram relatados casos de pancreatite medicamentosa e parto prematuro, após o uso do medicamento em questão. Sendo assim, o acompanhamento do paciente deve ser rigoroso, analisando as alterações que o paciente pode apresentar e, se necessário, deve-se suspender o uso do medicamento (SILVEIRA, 2003; RIGO, 2008 e VASCONCELOS, 2018).

2.4.2 Anfotericina B

A anfotericina B é o tratamento de segunda escolha para leishmaniose cutânea, utilizada quando há falha terapêutica com o antimonial ou na impossibilidade do uso. Anfotericina B interage com o ergosterol, que constitui o principal esterol da membrana plasmática do microrganismo, alterando a permeabilidade da membrana (GONÇALVES, 2011). É o tratamento de primeira escolha para pacientes imunossuprimidos e em gestantes, pois seu poder teratogênico está em categoria B. Deve ser realizado o acompanhamento da paciente e feto (FERREIRA, 2016). A administração é feita com o paciente hospitalizado, na dose de 1mg/Kg/dia, por via endovenosa, em dias alternados, respeitando o limite de 50mg por aplicação. (PELISSARI, 2011)

Seus efeitos adversos são febres, tremores, náuseas, hipotensão, tromboflebite, anemia, hepatite, hipocalemia, alterações cardíacas e nefrotoxicidade. Deve-se avaliar a função renal, cardíaca do paciente uma vez por

semana, sendo que em idosos a avaliação é feita duas vezes por semana. Deve ser realizado também, a dosagem de K⁺ sérico, fazendo a reposição quando houver necessidade (COSTA, 2001; CARVALHO, 2011; MANN et al., 2021)

2.4.3 Pentamidina

Também considerado como tratamento de segunda escolha, as pentamidinas pertencem ao grupo das diamidinas aromáticas. Seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido, mas é de conhecimento que o ativo induz alterações estruturais nas mitocôndrias do parasito, atingindo o cinetoplasto, inibindo a transformação de amastigota em promastigota (LINDOSO, 2012 e SAMPAIO, 2013).

Podem ser administradas de forma endovenosa ou intramuscular, em dose diária de 4mg/Kg/dia, de 2 em 2 dias, não ultrapassando a dose total de 2g. O medicamento apresenta ação no metabolismo da glicose, sendo assim, podem ocorrer crises de hipoglicemia, seguida de hiperglicemia quando feito o uso. Recomenda-se que o paciente se alimente antes da administração do medicamento e permaneça em repouso por 15 minutos ao fim (SAMPALIO, 2013).

As reações de toxicidade da pentamidina incluem apneia, taquicardia, tontura, cefaleia, vômitos, hipoglicemia, hiperglicemia, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade. A manifestação de diabetes mellitus pode ocorrer, já que o efeito é acumulativo e dose-dependente (COSTA,1993; MANN et al., 2021; SAMPAIO, 2013).

2.5 Busca de novas alternativas de tratamento

Todos os tratamentos disponíveis para a Leishmaniose Tegumentar Americana apresentam inúmeros efeitos colaterais, com alta toxicidade. Além disso, os medicamentos apresentam alto custo, são de difícil administração, já que todos devem ser realizados por um profissional da saúde ou em âmbito hospitalar. Sendo assim, o estudo de plantas medicinais, vem sendo reconhecido como um dos melhores caminhos para a descoberta de novos ativos que tenham função farmacológica. Portanto, a pesquisa de plantas que possuem atividade antileishmania, preferencialmente com número menor de efeitos colaterais, com administração facilitada, índice terapêutico elevado e que apresentem um custo-benefício melhor, pode ser de grande importância para o desenvolvimento de um novo medicamento, visando o bem-estar do paciente (MANN et al., 2021).

2.6 Plantas do cerrado testadas para inibição da atividade do parasita

2.6.1 *Cybistax antisyphilitica* (Bignoniaceae)

Conhecida popularmente como Ipê-verde, é uma planta com aspecto arbóreo, sendo de pequeno porte, muito encontrada nas áreas abertas do Cerrado. Suas cascas e folhas são utilizadas para fins medicinais, pois apresentam ativos farmacológicos com ação anti-inflamatória, larvicida, analgésica, anticoagulante, antissifilítica e antiepiléptica (LORENZI, 2001 e GONÇALVES, 2022)

Foi identificado o composto 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) -1,4- naftoquinona conhecido como lapachol, que possui ação larvicida em combate a larvas de *Aedes aegypti* com três dias de vida. Além disso, possuem flavonóides, saponinas e alcalóides em sua composição (GONÇALVES, 2022).

2.6.2 *Jacaranda cuspidifolia* (Bignoniaceae)

Caracterizada como árvore de médio porte, conhecida como jacarandá, é uma planta considerada ornamental pela presença de suas flores roxas. É amplamente utilizada pela população do cerrado para o tratamento de infecções e para febre (ARRUDA, 2012). Sua raiz é utilizada no tratamento da sarna e suas folhas são utilizadas para produção de inseticidas caseiros. É utilizada em infecções bacterianas, como sífilis e tuberculose, já que possui metabólitos ativos com ação antimicobacteriana. Apresentam em sua composição taninos, flavonoides, terpenos, cumarinas e esteroides, que justificam a ação farmacológica desta planta (FERNANDES, 2021).

2.6.3 *Samanea tubulosa* (Fabaceae)

Com nome popular de sete cascas, é uma espécie nativa do pantanal e Amazônia, sendo uma planta cultivada com propósitos ornamentais. Tem importância econômica, já que em alguns países é utilizado os frutos para produção de farinhas para alimentação de animais, como vacas, cabras e galinhas, pelo alto teor proteico presente nesta planta (SALES, 2015).

As folhas contêm compostos ativos como alcalóides, triterpenos, taninos, flavonóides e cumarinas. Estudos observaram que o extrato metanólico das folhas

apresenta atividade antioxidante, protegendo contra algumas doenças crônicas. É utilizada na medicina popular para tratamento de infecções cutâneas, parasitárias e gástricas (SALES, 2015).

2.6.4 *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae)

Conhecida popularmente por jatobá do cerrado, é uma árvore amplamente distribuída no cerrado brasileiro. Essa árvore apresenta grande importância econômica pois sua madeira é de alta qualidade e seus frutos são utilizados pela indústria alimentícia para produção de farinhas (BRAGA, 2015).

Os frutos de *H. Stigonocarpa* são utilizados popularmente para o tratamento de inflamações, úlceras, dores abdominais e disenterias, sendo que em sua composição há compostos fenólicos e taninos (DIMECH, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*Leishmania* sp de extratos de frutos secos coletados no Mato Grosso do Sul por ensaios colorimétricos de viabilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos extratos dos frutos secos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne (Fabaceae), *Jacaranda cuspidifolia* Mart. Ex A. DC. (Bignoniaceae), *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J.W. Grimes (Fabaceae) e *Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae) por meio de ensaios colorimétricos de viabilidade com formas promastigotas;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos em linhagem celular de fibroblastos de camundongo NIH/3T3 por meio de ensaio colorimétrico de viabilidade celular;
- Calcular as concentrações inibitórias (IC50) e citotóxicas (CC50) de cada extrato, e os respectivos índices de seletividade.

4. METODOLOGIA

4.1 Material vegetal e preparação dos extratos

Os materiais vegetais foram coletados em diferentes localidades do estado de Mato Grosso do Sul, devidamente identificados por especialistas e depositados no herbário da UFMS. Os frutos secos foram coletados, limpos, seco em uma estufa de ar circulante e, em seguida, pulverizados com um moinho de facas. Os materiais em pó foram armazenados no vácuo, sem luz e a 8°C até a extração. Os extratos foram colocados em contato com o solvente, coberto com etanol 70% por 24 horas. Após esse período, os materiais foram extraídos por percolação exaustiva a uma taxa de 20 gotas por minuto. Os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo (Büchi® Rotavapor R-153) e, posteriormente, foram secos por liofilização. Assim, foram obtidos os extratos hidroetanólicos com o seguinte rendimento: *C. antisyphilitica* (7,6%), *S. tubulosa* (43,5%), *J. cuspidifolia* (2,0%), e *H. stigonocarpa* (13,2%) O procedimento para a obtenção dos extratos foi feito pela equipe do Laboratório de Produtos Naturais e Espectroscopia de Massas (LaPNEM/FACFAN/UFMS), em especial pelo aluno MSc. Bruno de Oliveira Leonel e a Profa. Dra. Denise Brentan da Silva, os quais gentilmente nos cederam o extrato seco para análises de atividade biológica. Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril (Sigma-Aldrich) na concentração de 25 mg/mL para o uso nos ensaios biológicos *in vitro*.

4.2 Manutenção de *Leishmania amazonensis*

Foi utilizada para os experimentos *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/1967/PH8). Formas promastigotas dos parasitos foram cultivadas em repiques semanais em estufa a 26°C em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich/EUA), contendo soro bovino fetal a 20% (Cultilab/ Brasil), 10 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich/EUA) em tubos de vidro com tampa de rosca. Foram utilizadas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento para os experimentos de viabilidade.

4.3 Atividade antipromastigota

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram distribuídas em placas de 96 poços, contendo os extratos dos frutos secos nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL que foram testadas. As placas foram incubadas durante 48 horas a 26°C, quando foram adicionados 5 µL de solução de resazurina 0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich/EUA) em cada poço, e as placas foram incubadas por mais 4 horas a 26°C. Controles de poços contendo somente meio e parasitas e meio com anfotericina B 5µM (Sigma-Aldrich/EUA) também foram feitos. Após 4 h de incubação a 26°C, a absorbância dos poços foi obtida em 570 e 600 nm (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Scientific) no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB/FACFAN/UFMS). Para a resazurina, o cálculo da viabilidade de todos os poços foi realizado baseando-se na fórmula e instruções do site do fabricante AlamarBlue® (BioRad) (BIO-RAD, 2020), conforme segue:

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

Sendo O1 o coeficiente de extinção molar (ϵ) da resazurina oxidada em 570 nm, O2 o ϵ da resazurina oxidada em 600 nm, A1 a absorbância do poço teste em 570 nm, A2 a absorbância do poço teste em 600 nm, P1 a absorbância do poço controle sem tratamento em 570 nm e P2 a absorbância do poço controle sem tratamento em 600 nm. A média da leitura dos controles utilizando somente meio de cultura foi considerada em 100% de viabilidade e o cálculo da porcentagem de viabilidade dos tratamentos com foi feito baseando-se na leitura dos controles. O cálculo da concentração inibitória (IC₅₀) foi feito por regressão linear, plotando o log₁₀ de cada concentração de inibidor em relação à atividade percentual com o Prism 5 (software GraphPad, Boston, MA).

4.4 Ensaio de citotoxicidade

As células NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, linhagem de fibroblastos de camundongo) foram cultivadas em placas de 96 poços (1x10⁵ células/mL) em meio

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com soro bovino fetal a 10% (Cultilab/Brasil), 10 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich/EUA) e aderidas durante a noite a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi substituído RPMI fresco com concentrações dos extratos de 1000 a 15,625 µg/mL e a placa foi incubada nas mesmas condições por 48 horas. Fibroblastos cultivados apenas com meio foram usados como controle de vida/viabilidade. Em seguida, 5 µl de solução de resazurina 0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionados a cada poço e incubados por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. A absorbância dos poços foi obtida a 570 e 600 nm (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Scientific). O cálculo da viabilidade de todos os poços foi realizado com base na fórmula e nas instruções fornecidas pelo site do fabricante do AlamarBlue® (BioRad) (BIO-RAD, 2020). A viabilidade celular foi avaliada a partir da densidade óptica e comparada às células não tratadas. O cálculo da concentração citotóxica (CC₅₀) foi feito por regressão linear, plotando o log₁₀ de cada concentração de inibidor em relação à atividade percentual com o Prism 5 (software GraphPad, Boston, MA). O índice de seletividade (IS) foi obtido calculando-se a razão entre CC₅₀ e IC₅₀ de cada extrato.

4.5 Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata e foram calculados a média e o desvio padrão para cada uma das determinações. Quando necessário comparar variâncias, foi utilizado teste de ANOVA suplementado pelo teste paramétrico “t”, com intervalo de confiança de 95%. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0. O nível de significância foi de 5%.

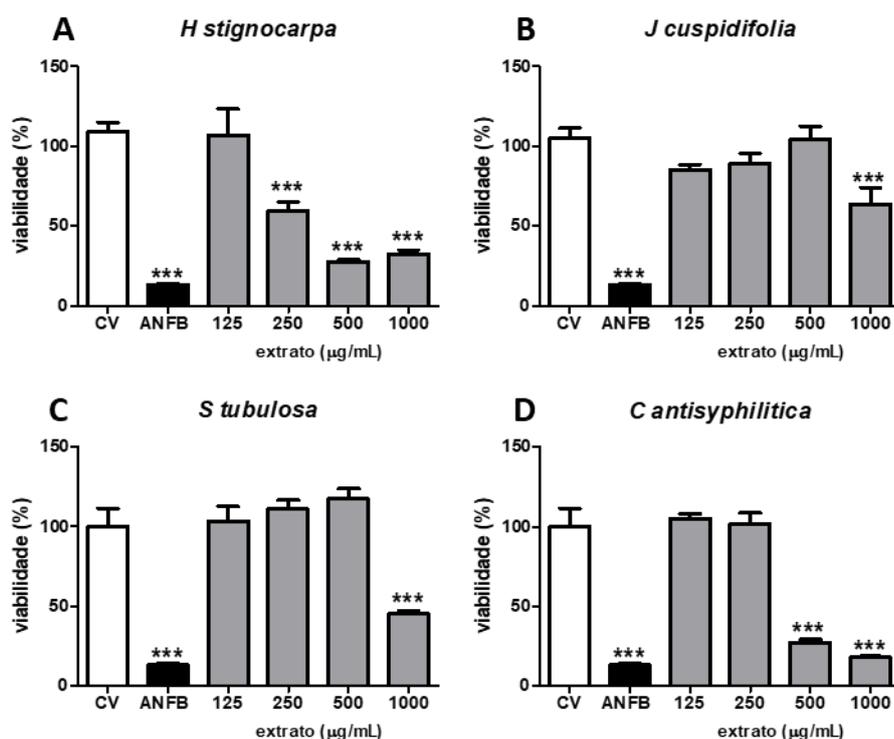
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade antipromastigota

Os extratos de frutos secos foram avaliados quanto sua atividade anti-*Leishmania* frente a formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Para tanto, os parasitos foram tratados com os extratos diluídos em meio Schneider devidamente suplementado nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL. Após 48 horas, a viabilidade foi analisada por espectrofotometria pelo método da resazurina, e os

resultados estão ilustrados na Figura 1. Controles positivos de morte com formas promastigotas tratadas com anfotericina B na concentração de 5 μM também foram feitas, assim como os controles de viabilidade (CV), em que os parasitos foram incubados apenas com meio Schneider, sendo esses poços considerados como 100% de viabilidade no ensaio.

Figura 1: Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de extratos de frutos secos. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos de frutos secos e a viabilidade foi avaliada após 48 horas pelo método espectrofotométrico da resazurina. A: *Hymenaea stigonocarpa*; B: *Jacaranda cuspidifolia*; C: *Samanea tubulosa*; e D: *Cybistax antisyphilitica*. CV: controle de vida; ANFB: anfotericina B. *** indica $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).



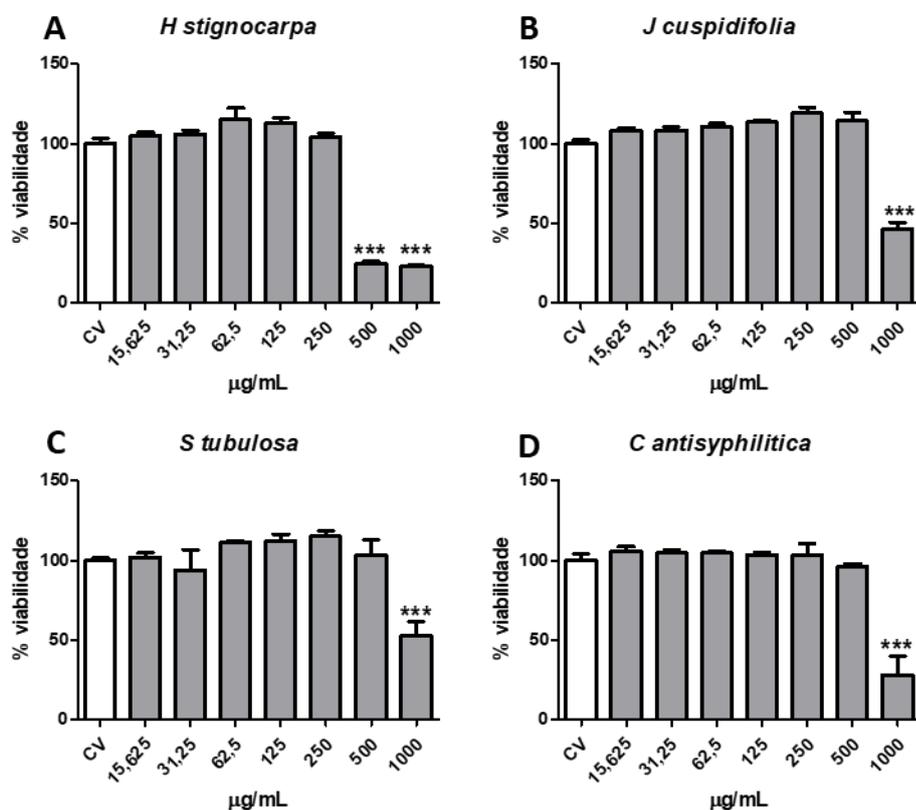
Podemos observar na Figura 1 que os extratos de *Jacaranda cuspidifolia* e *Samanea tubulosa* reduziram a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* apenas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1, gráficos B e C). Já o extrato de *Cybistax antisyphilitica* reduziu a viabilidade dos parasitos nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1D), enquanto para *Hymenaea stigonocarpa* foi observada a redução de viabilidade das formas promastigotas nas concentrações de 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$ para todas as concentrações em

que foram observadas reduções da viabilidade das células, inclusive para anfotericina B, em relação ao controle de viabilidade – CV).

5.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos de frutos secos também foi avaliada em linhagem de fibroblastos de camundongo NIH/3T3. Neste ensaio, os fibroblastos foram adicionados em meio RPMI suplementado em placas de 96 poços no dia anterior para aderir na placa. No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI suplementado contendo os extratos diluídos em nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 $\mu\text{g/mL}$. Após 48 horas, a viabilidade foi analisada por espectrofotometria pelo método da resazurina, e os resultados estão ilustrados na Figura 2. Controles de viabilidade (CV) foram feitos em poços com os fibroblastos NIH/3T3 incubados apenas com meio RPMI, sendo esses poços considerados como 100% de viabilidade no ensaio.

Figura 2: Avaliação da citotoxicidade de extratos de frutos secos. Células da linhagem NIH/3T3 foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos de frutos secos e a viabilidade foi avaliada após 48 horas pelo método espectrofotométrico da resazurina. A: *Hymenaea stigonocarpa*; B: *Jacaranda cuspidifolia*; C: *Samanea tubulosa*; e D: *Cybistax antisyphilitica*. CV: controle de vida; ANFB: anfotericina B. *** indica $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).



A avaliação da citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células de mamíferos é um ensaio importante na avaliação de atividade antiparasitária de produtos naturais e sintéticos, e a linhagem de fibroblastos de camundongos NIH/3T3 é bastante usada para essa finalidade. (BHATTACHARYA et al., 2020; IMANOL PEÑA et al., 2015). Dessa forma, é possível ter uma primeira avaliação da seletividade do composto testado para reduzir a viabilidade de células de parasitos em relação à viabilidade de células de mamíferos. Pelos resultados expressos na Figura 2, podemos observar que os extratos de *Jacaranda cuspidifolia*, *Samanea tubulosa* e *Cybistax antisyphilitica* reduziram a viabilidade dos fibroblastos NIH/3T3 de maneira significativa ($p < 0,001$ em relação aos controles de viabilidade tratados apenas com meio de cultura RPMI, CV) apenas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o extrato de *Hymenaea stigonocarpa* reduziu a viabilidade dos fibroblastos nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Para uma melhor avaliação da atividade antileishmania e seletividade dos extratos testados, foi calculada a concentração inibitória (IC_{50}) e a concentração citotóxica (CC_{50}) de cada extrato. A concentração inibitória (IC_{50}) é o valor de concentração capaz de inibir a viabilidade das células do parasito em 50% em relação aos controles de 100% de viabilidade. Já a concentração citotóxica (CC_{50}) é o valor de concentração capaz de inibir a viabilidade das células da linhagem de mamíferos (fibroblastos NIH/3T3 neste caso) em 50% em relação aos controles de 100% de viabilidade (BALAÑA-FOUCE et al., 2019; ORYAN, 2015). O cálculo da concentração inibitória (IC_{50}) e a concentração citotóxica (CC_{50}) dos extratos foi feito por regressão linear, plotando o \log_{10} de cada concentração de extrato em relação à atividade percentual de viabilidade observada, e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1.

Após calcular a concentração inibitória (IC_{50}) e a concentração citotóxica (CC_{50}) de cada extrato, o índice de seletividade (IS) foi obtido calculando-se a razão entre CC_{50} e IC_{50} de cada extrato (BALAÑA-FOUCE et al., 2019; ORYAN, 2015). O índice de seletividade indica o quanto cada extrato tem atividade seletiva contra os parasitos em relação a uma linhagem de células de mamíferos, e os resultados também estão na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de concentração inibitória (IC₅₀), concentração citotóxica (CC₅₀) e índice de seletividade (IS) de extratos de frutos secos. Os valores das concentrações são dados em µg/mL

Extrato	IC ₅₀ <i>L. amazonensis</i>	CC ₅₀ NIH/3T3	IS
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	128,8	275,0	2,1
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	458,1	780,9	1,7
<i>Samanea tubulosa</i>	802,6	717,4	0,9
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	355,6	851,4	2,4

O índice de seletividade, na pesquisa com produtos naturais, é um parâmetro que avalia a seletividade de um composto ou produto para determinados alvos biológicos. Esse índice é fundamental na identificação de substâncias promissoras para a criação de medicamentos, pois indica a capacidade do composto de agir especificamente sobre o organismo desejado, minimizando o impacto sobre células saudáveis ou não alvo. Uma alta seletividade sugere que o produto possui um potencial terapêutico mais direcionado e menos efeitos adversos, tornando-se um critério valioso na busca por novos tratamentos na área da saúde (BALAÑA-FOUCE et al., 2019).

Considerando os resultados obtidos, podemos observar que os extratos de *Cybistax antisyphilitica* e *Hymenaea stigonocarpa* apresentaram o maior índice de seletividade entre os extratos testados (2,4 e 2,1, respectivamente). Esse índice de seletividade ainda é baixo em relação aos índices que constam na literatura: alguns autores relatam que um fármaco antileishmania ou um composto natural é seguro quando o índice de seletividade é maior que 10 (HOSSEIN MAHMOUDVAND et al., 2014; ORYAN, 2015). Porém, esse é um dado de atividade biológica inédito na literatura, e nos dá uma ideia de onde podemos refinar a busca de compostos ativos contra *Leishmania* dentre os extratos testados para ensaios futuros, já que não há nenhum trabalho na literatura que foi realizado com essas espécies em relação a atividade anti-*Leishmania*.

Outro estudo realizado com extratos de onze frutos secos do Cerrado, incluindo *C. antisyphilitica* e *H. stigonocarpa*, foram avaliados contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (LEONEL, 2022). Os extratos *H. stigonocarpa*, *Q. grandiflora* e *M. foetidus* apresentaram atividade de inibição de formação de biofilme de *S. aureus* a uma concentração de 200 µg/mL. O extrato de *H. stigonocarpa* foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo

de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) para a anotação de seus metabólitos secundários, e foram anotados flavonoides, diterpenos e triterpenos (LEONEL, 2022). Tais classes de moléculas são descritas em extratos de plantas que apresentam atividade antileishmania na literatura (ORYAN, 2015).

Diversas atividades biológicas do gênero *Hymenaea*, incluindo a espécie *H. stigonocarpa*, foram revisadas recentemente (BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017). Os autores trazem a informação de que mais de 130 compostos, como ácidos graxos, flavonoides, terpenoides, esteroides, ftalídeos, ácidos fenólicos, procianidinas e cumarinas, foram identificados nessas espécies de plantas. Evidências experimentais apoiam o uso potencial da *Hymenaea* spp. no tratamento de distúrbios inflamatórios, asma, diarreia e determinadas infecções microbianas, inclusive antileishmania. No entanto, as informações sobre a toxicidade das espécies de *Hymenaea* são limitadas (BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017).

Extratos de *C. antisyphilitica* também apresentaram atividade contra larvas de mosquito *Aedes aegypt* (RODRIGUES et al., 2005) e a presença uma quinona denominada lapachol (CASTILLO; ROSSINI, 2010; RODRIGUES et al., 2005). Há relatos recentes na literatura sobre a atividade antileishmania de lapachol (CUNHA, et al., 2019; FERNANDES et al., 2023), o que pode explicar em parte a atividade antileishmania observada para o extrato de *C. antisyphilitica*. No entanto, o fracionamento dos extratos testados e a análise metabolômica dos mesmos é fundamental para a elucidação e o entendimento da possível atividade antileishmania observada.

6. CONCLUSÃO

De acordo com o estudo realizado, os extratos de *C. antisyphilitica* e *H. stigonocarpa*, apresentaram resultados significativos na inibição do crescimento da *Leishmania amazonensis*, sendo a última espécie a mais seletiva. Esse resultado de atividade biológica é inédito para essas plantas. Diante disso, a utilização de plantas nativas do cerrado para a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias no tratamento da leishmaniose, além de apresentar importância econômica, tende a trazer conhecimento sobre a composição química e atividades biológicas relacionadas a estas espécies.

7. REFERÊNCIAS

- CASTILLO, L.; ROSSINI, C. Bignoniaceae Metabolites as Semiochemicals. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7090–7105, 14 out. 2010.
- ANDRADE, Bruno B. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.
- ARRUDA, A. L. A. et al. Análise fitoquímica e atividade antimicobacteriana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.(Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 276-281, 2012.
- BALANÇA-FOUCE, R. et al. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 5, p. 1209–1216, 1 maio 2019.
- BHATTACHARYA, A. et al. Of Drugs and Trypanosomatids: New Tools and Knowledge to Reduce Bottlenecks in Drug Discovery. **Genes**, v. 11, n. 7, p. 722–722, 29 jun. 2020.
- BRAGA, Ramilla dos Santos et al. Genética geográfica de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae). 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- CARVALHO, Ricardo Fontoura de. Estudo in vivo da ação de nanocápsulas de PLGA contendo anfotericina B, DMSA e nanopartículas magnéticas no tratamento da leishmaniose cutânea experimental em camundongos C57BL/6 causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2011.
- COSTA, J. M. L. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2000.
- COSTA, Jackson Mauricio L. O uso clínico das pentamidinas com especial referência nas leishmanioses. **Acta Amazônica**, v. 23, p. 163-172, 1993.
- CUNHA, A. et al. Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 67–73, 1 abr. 2019.
- DA SILVA, Cléber José et al. Biological activities associated with tannins and flavonoids present in *Hymenaea stigonocarpa* and *Hymenaea courbaril*: A systematic review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e174111234196-e174111234196, 2022.
- DIMECH, Gustavo Santiago et al. Phytochemical and antibacterial investigations of the extracts and fractions from the stem bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and effect on ultrastructure of *Staphylococcus aureus* induced by hydroalcoholic extract. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- DORVAL, Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 43-46, 2006.

FERNANDES, C. et al. In vitro effects of lapachol and β -lapachone against *Leishmania amazonensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 56, 1 jan. 2023.

FERNANDES, José. MORFOLOGIA DE *Jacaranda copaia* (AUBL.) D. DON (BIGNONIACEAE): UMA ESPÉCIE MEDICINAL EM ALTA FLORESTA, MATO GROSSO. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 37, 2021.

FERREIRA, Cassio Porto et al. Descrição de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes com esporotricose e leishmaniose tegumentar americana, com ênfase em mulheres grávidas. 2016. Tese de Doutorado.

GONÇALVES, Anete Honorato. Mecanismo de ação e toxicidade da anfotericina B no tratamento de micoses. 2011.

GONÇALVES, Ludmylla Borges et al. CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, HISTOQUÍMICAS E FITOQUÍMICAS DE *Cyathostemma axillare* (Mart.) Mart. (Bignoniaceae). 2022.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

HOSSEIN MAHMOUDVAND et al. Antifungal, Antileishmanial, and Cytotoxicity Activities of Various Extracts of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and Its Active Principle Berberine. **ISRN Pharmacology (Print)**, v. 2014, p. 1–6, 10 mar. 2014.

IMANOL PEÑA et al. New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening Against Three Kinetoplastid Parasites: An Open Resource. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 5 mar. 2015.

LEONEL, B.O. **Frutos secos do Cerrado como fontes de substâncias ativas contra bactérias e biofilmes**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, p. 68. 2022. Resumo disponível em: <https://repositorio.ufms.br/handle/123456789/4635>

LINDOSO, José Angelo Lauletta et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine**, v. 3, p. 69, 2012.

LORENZI, H.; **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Inst. Plantarum, v. 1, 3 ed., p. 352, 2000.

MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 17 mar. 2021.

MONTANER-ANGOITI, Esperanza; LLOBAT, Lola. Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world?. **Veterinary Research Communications**, p. 1-23, 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.: il.

NEVES, David Pereira. Parasitologia humana. In: Parasitologia humana. 11. ed; 2005.

- ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian journal of veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.
- OPAS. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Nº 11 (Dezembro de 2022).
- PELLISSARI, Daniele Maria et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.
- RIGO, Rosângela S.; RIGO, Leonardo; HONER, Michael R. Alteração na função renal e pancreatite: efeitos adversos do tratamento da leishmaniose visceral. **Arq. ciênc. saúde**, p. 139-141, 2008.
- RODRIGUES, A. S. et al. Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 755–757, 1 dez. 2005.
- SALES, PA B. et al. Toxicidade reprodutiva do extrato hidroalcoólico de *Samanea tubulosa* Benth em ratas wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 599-603, 2015.
- SAMPAIO, Gilmara de Souza et al. **Estudo comparativo entre o antimoniato-Nmetilglucamina (Glucantime®) e o isotionato de pentamidina (Pentacarinat®) em lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar**. 2013. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.
- SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 7 abr. 2021.
- SILVEIRA, Bruna Pinheiro et al. Parto prematuro após uso de antimonial pentavalente: relato de um caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 523-525, 2003.
- SILVEIRA, Fernando T. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Gazeta médica da Bahia**, n. 79, 2009.
- VASCONCELOS, Jairla Maria et al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018.