



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

SHAKIRA CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE FERREIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Allium sativum*,
Curcuma longa, *Zingiber officinale* e *Glycine max***

Maceió

2022

SHAKIRA CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE FERREIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Allium sativum*,
Curcuma longa, *Zingiber officinale* e *Glycine max***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Cavalcanti de Queiroz.

Maceió

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

F383a Ferreira, Shakira Cavalcante de Albuquerque.
Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida de *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* e *Glycine max* / Shakira Cavalcante de Albuquerque Ferreira. - 2022.
75 f. : il.

Orientadora: Aline Cavalcanti de Queiroz.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 66-75.

1. Leishmaniose. 2. RENISUS. 3. Alho. 4. Curcuma. 5. Gengibre. 6. Soja. I. Título.

CDU: 614:616.993.161

SHAKIRA CAVALCANTE DE ALBUQUERQUE FERREIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Allium sativum*,
Curcuma longa, *Zingiber officinale* e *Glycine max***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Cavalcanti de Queiroz.



Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz

UFAL / Campus Arapiraca

Orientadora

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

UFAL/ Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS



Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte

UFAL / Campus Arapiraca

Dedico este trabalho à minha irmã, Shelda Ferreira e ao meu amor, Matheus Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos depositadas em minha vida e por me ajudar a realizar meus sonhos mais íntimos;

Aos meus pais, Maria Seara e José Luiz, que apesar dos sacrifícios e dificuldades ao longo de nossa vida sempre me incentivaram e apoiaram meus estudos;

À minha irmã, Shelda, por todo o carinho e companheirismo;

Ao meu namorado, Matheus, que além de meu amor é meu melhor amigo. Sou grata por todo seu amor, apoio e carinho desde o nosso ensino médio. Agradeço imensamente por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida, nos momentos de estresse e ansiedade. Obrigada por estar ao meu lado durante todos esses anos. Seu abraço é meu lugar favorito desse universo!

À minha orientadora, Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz que é uma excelente pesquisadora e fonte de inspiração para mim. Sou grata pela confiança depositada ao longo desses anos no laboratório e por todo o aprendizado;

À Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, por ter me acolhido no laboratório com generosidade e também por todo conhecimento compartilhado;

Ao Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte por ser membro da minha banca de TCC e contribuir com o trabalho;

A todos os membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade, em especial Amanda, Kaycke e Márcio. Agradeço também a Izabelly e Hilda, minhas meninas companheiras de experimentos e de pia.

Às minhas amigas Evelyn, Andressa e Camila que me acompanharem desde o início do curso e que levarei para a vida.

Gratidão a todos!

“ Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

Endêmica em 102 países, a leishmaniose é uma doença considerada negligenciada causada por parasitos flagelados do gênero *Leishmania*. Apesar da sua importância epidemiológica, a terapia contra essa enfermidade é limitada e apresenta alta toxicidade e efeitos adversos indesejados. Diante de tal contexto, a busca de novos fármacos leishmanicida é essencial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito leishmanicida das soluções aquosas das plantas *Allium sativum* (alho), *Curcuma longa* (açafreão), *Zingiber officinale* (gingibre) e *Glycine max*(soja), que fazem parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), com o intuito de descobrir novas opções terapêuticas mais acessíveis. A princípio, foi investigada a citotoxicidade das soluções extrativas aquosas sob os macrófagos da linhagem J774.A1 por meio do ensaio colorimétrico de MTT(brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Posteriormente, macrófagos infectados com promastigotas das espécies de *Leishmania* spp. foram tratados com soluções extrativas aquosas das plantas. Em seguida, foram analisados os níveis de óxido nítrico produzido pelos macrófagos infectados. Foi observado que nenhuma das plantas apresentaram efeito citotóxico até a máxima concentração testada (100 µg/mL). Além disso, as espécies vegetais não apresentaram atividade leishmanicida contra amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. *Zingiber officinale* induziu o aumento de óxido nítrico. Desse modo, cabe salientar que estudos com plantas medicinais na forma do uso popular (chá) se faz necessário devido a fácil administração. Ademais, novos estudos devem ser realizados para entender os mecanismos farmacológicos dessas plantas.

Palavras-chave: Leishmaniose; RENISUS; Alho; Açafreão; Gingibre; Soja

ABSTRACT

Endemic in 102 countries, leishmaniasis is a neglected disease caused by flagellated parasites of the genus *Leishmania*. Although epidemiological importance, the therapy against this disease is limited and has high toxicity and unwanted adverse effects. In this context, the search for new leishmanicidal drugs is essential. The aim of this study was to evaluate the leishmanicidal effect of aqueous solutions of *Allium sativum* (garlic), *Curcuma longa* (turmeric), *Zingiber officinale* (ginger) and *Glycine max* (soybean) plants, which are part of the National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System (RENISUS), with the aim of to discover new accessible therapeutic options. Initially, the cytotoxicity of aqueous extractive solutions on J774.A1 lineage macrophages was investigated by means of the MTT(3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay. Afterwards, macrophages infected with promastigotes of *Leishmania* spp. species were treated with aqueous extractive solutions from the plants. Then, the levels of nitric oxide produced by infected macrophages were analyzed. It was observed that none of the plants showed cytotoxic effect up to the maximum concentration tested (100 µg/mL). Furthermore, plant species did not show leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi* amastigotes. *Zingiber officinale* induced the increase in nitric oxide. Thus, it should be noted that studies with medicinal plants in the form of popular use (tea) is necessary due to easy administration. Furthermore, further studies must be carried out to understand the pharmacological mechanisms of these plants.

Keywords: Leishmaniasis; RENISUS; Garlic; Turmeric; Ginger; Soybean

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	16
Figura 2. Inseto Vetor da Leishmaniose – Flebotomíneo	17
Figura 3. Reservatórios das espécies de <i>Leishmania</i> spp.	18
Figura 4. Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 5. Resposta Th1 e Th2 contra <i>Leishmania</i> spp.	22
Figura 6. Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar	23
Figura 7. Paciente com Leishmaniose Visceral	25
Figura 8. Distribuição mundial da leishmaniose em 2020 - (A) LV (B) LT.	27
Figura 9. Número de casos de leishmaniose na região das Américas - (A) LT (B) LV.	29
Figura 10. Representação Química dos Antimoniais Pentavalentes	32
Figura 11. Estrutura Química da Anfotericina B	33
Figura 12. Estrutura Química da Pentamidina	35
Figura 13. Estrutura da Miltefosina	36
Figura 14. Paramomicina	36
Figura 15. Estrutura Morfológica do alho	39
Figura 16. Estruturas Químicas dos Compostos de <i>Allium sativum</i>	40
Figura 17. Via Metabólica de Produção de Compostos Secundários do Alho	41
Figura 18. Aspectos Morfológicos da <i>Curcuma longa</i>	44
Figura 19. Morfologia da espécie <i>Zingiber officinale</i>	46
Figura 20. Aspectos botânicos da espécie <i>Glycine max</i>	48

Figura 21. Representação ilustrativa do ensaio de MTT.....	53
Figura 22. Ilustração do ensaio de avaliação da carga parasitário <i>in vitro</i>.....	54
Figura 23. Representação do ensaio de dosagem de óxido nítrico.....	55
Figura 24. Efeito de <i>Allium sativum</i>, <i>Curcuma longa</i>, <i>Zingiber officinale</i>, <i>Glycine max</i>, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina no aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos de LT e LV na região nordeste entre 2007 a 2019.....	30
Tabela 2. Número de casos de LT e LV em Alagoas entre 2007 e 2019.....	31
Tabela 3. Efeito citotóxico de <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Glycine max</i> , pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina em macrófagos da linhagem J774.A1.....	57
Tabela 4. Efeito leishmanicida de <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Glycine max</i> , pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina contra amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	58
Tabela 5. Efeito leishmanicida de <i>Allium sativum</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Glycine max</i> , pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina contra amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação Taxonômica da espécie <i>Allium sativum</i>	38
Quadro 2. Classificação Taxonômica de <i>Curcuma longa</i>	43
Quadro 3. Classificação Taxonômica <i>Zingiber officinale</i>	46
Quadro 4. Classificação taxonômica <i>Glycine max</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CI50	Concentração inibitória 50%
DADS	Dissulfeto de dialilo
DATS	Trissulfeto de dialil
DMSO	Dimetilsulfóxido
IFN-γ	Interferon-gama
IL10	Interleucina -10
IL-1β	Interleucina-1 beta
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LDC	Leishmaniose cutânea difusa
LDPC	Leishmaniose dérmica pós calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LR	Leishmaniose recidiva
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MTT	Brometo de 3- [4,5 – dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NA	Não ativo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NO	Óxido nítrico

OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE2	Prostaglandina E2
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sb5+ (V)	Antimônio pentavalente
SFB	Soro fetal bovino
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TXB2	Tronboxano B2
μg	microgramas
μM	micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 O parasito <i>Leishmania</i> , seus vetores e reservatório	16
2.2 Ciclo Biológico e Resposta Imune	19
2.3 Formas Clínicas e Diagnóstico.....	22
2.4 Epidemiologia	26
2.5 Tratamento	32
2.6 Plantas Medicinais da Lista RENISUS	37
2.6.1 <i>Allium sativum</i>	39
2.6.2. <i>Curcuma longa</i>	42
2.6.3. <i>Zingiber officinale</i>	45
2.6.4. <i>Glycine max</i>	48
3. OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo Geral.....	51
3.2 Objetivo Específico	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 Obtenção das plantas medicinais e preparo dos extratos.....	52
4.2 Manutenção da linhagem celular.....	52
4.3 Avaliação da viabilidade celular.....	52
4.4 Avaliação da carga parasitária in vitro.....	53
4.5 Dosagem de óxido nítrico.....	54
4.6 Análise estatística.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de doenças causadas por diferentes agentes etiológicos como parasitos, fungos, bactérias e vírus, que possuem maior prevalência nos países das regiões tropicais e subtropicais. O predomínio destas está relacionado às precárias condições de saneamento básico, higiene, água potável sem contar o fato de que muitas comunidades vivem em áreas rurais, aumentando as chances de contato com vetores e animais possivelmente infectados (MITRA; MAWSON, 2017; ENGELS; ZHOU, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças tropicais negligenciadas são: úlcera de Buruli, doença de Chagas, dengue, dracunculíase, equinococose, infecções por trematódeos de origem alimentar, doença do sono, hanseníase, filariose linfática, micetoma, oncocercose, escabiose e outros ectoparasitoses, esquistossomose, complexo teníase-cisticercose, leishmaniose, entre outras.

A leishmaniose humana é uma parasitose de grande importância na saúde pública mundial, causada por 20 espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae. Sua transmissão ocorre através do repasto sanguíneo de fêmeas de insetos vetores do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (GABRIEL et al., 2019). Essa doença apresenta duas formas clínicas principais, a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral. Estima-se que no mundo há entre 7 a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar e 2 a 4 milhões de novos casos de leishmaniose visceral (OPAS,2019; GEORGIADOU,2015). A leishmaniose tegumentar é endêmica em 18 países das Américas. Entre os anos de 2001-2017 foram registrados 940.396 novos casos de leishmaniose tegumentar e mucosa, enquanto que a leishmaniose visceral é endêmica de 12 países do continente americano, com um total de 59.769 novos casos (OPAS,2019).

Apesar dos elevados números de casos e da gravidade da doença, o arsenal terapêutico é bastante limitado. Os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina) e os de segunda escolha são conhecidos como anfotericina B, pentamidina e miltefosina (KEDZIERSKI, 2010).

Entretanto, a utilização desses fármacos é insatisfatória pois apresenta muitas desvantagens como alta toxicidade, indução a resistência parasitária e custo elevado (GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

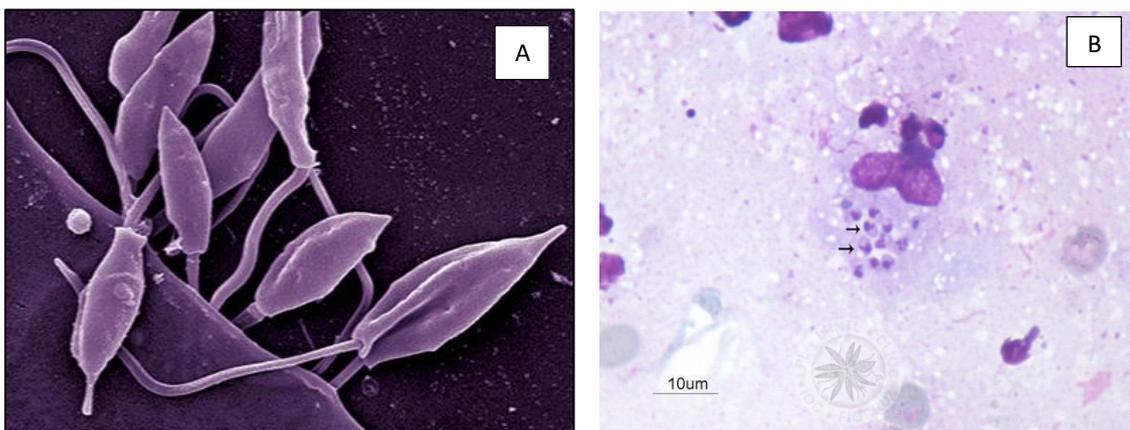
Desse modo, é de grande importância a busca por novos protótipos fármacos leishmanicidas que sejam mais seguros e acessíveis para as populações acometidas. O uso de plantas medicinais é um vultoso aliado na busca desses protótipos, uma vez que extratos e derivados de plantas possuem baixo custo, menores efeitos colaterais e são mais acessíveis para a população, podendo ser aplicado no tratamento da leishmaniose (GHODSIAN et al., 2020). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito leishmanicida das soluções aquosas das partes que são comumente utilizadas das plantas *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* e *Glycine max*, que fazem parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) e que foram selecionadas por apresentarem atividade antiparasitária já descrita na literatura para outros parasitos.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O parasita *Leishmania*, seus vetores e reservatórios

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários flagelados que pertencem a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Existem cerca de 53 espécies descritas do parasito, das quais 31 são parasitas de mamíferos e 20 são espécies que apresentam patogenicidade para humanos (ALEMAYEHU e ALEMAYEHU, 2017). Os protozoários do gênero *Leishmania* são digenéticos, ou seja, durante o seu ciclo de vida apresentam duas formas evolutivas, a promastigota e a amastigota. A forma promastigota caracteriza-se por ser a forma móvel do parasito devido à presença de um flagelo, mede entre 20 e 30 μ M e é encontrado no intestino do inseto vetor. A forma amastigota é caracterizada por ser a forma intracelular, aflagelada que possuem tamanho variável de 2 a 5 μ M e infectam as células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente, os macrófagos (OPAS,2019; KAYE, 2011). A Figura 1 representa as formas evolutivas do parasito.

Figura 1. Forma promastigota (A). Forma amastigota (B)



Fonte: Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose IOC- Fiocruz, 2020

A leishmaniose é transmitida por meio do repasto sanguíneo das fêmeas dos insetos denominados flebotomíneos. Os flebotomíneos são classificados na ordem Díptera, classe Insecta, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, que englobam os gêneros *Phlebotomus*, do Velho Mundo, e *Lutzomyia* do Novo Mundo (AKHOUNDI,2016). Os flebotomíneos são holometábolos, pois apresentam metamorfose completa divididas nas seguintes fases de desenvolvimento: ovo, larva (4 estádios), pupa e adulto. As fêmeas adultas põem os ovos em regiões ricas em matéria orgânica e com excrementos no solo para que possam garantir nutrição e umidade adequada para as larvas que emergirão. Os adultos são pequenos, medem de 1 a 3 mm de comprimento, possuem pelos no corpo, suas asas apresentam forma de “V” quando em repouso e sua cor varia de branco ao preto (Figura 2). Esses invertebrados possuem atividade crepuscular e noturna, mas também podem estar ativos durante o dia. Machos e fêmeas adultos alimentam-se de seiva, no entanto, apenas as fêmeas necessitam de sangue para o desenvolvimento dos seus ovos (MAROLI, 2012; BRASIL, 2014).

Figura 2. Inseto Vetor da Leishmaniose - Flebotomíneo



Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2020

Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/vector/en/> Acesso em março, 2020

O sistema de relação parasito-hospedeiro determina os fatores que influenciam na capacidade de infecção das espécies de *Leishmania* de hospedeiros mamíferos, como a idade, sexo, comportamento, características dos parasitos, bioquímica do parasito, entre outros. Assim, pode-se definir que um reservatório compreende uma ou mais espécies de mamíferos responsáveis por manter o parasito na natureza e, portanto, dar continuidade ao ciclo natural da doença (ROQUE e JANSEN, 2014). Os reservatórios desses parasitos incluem os humanos, animais domésticos e da região peridomiciliar, além de animais silvestres. O homem é denominado como principal reservatório da leishmaniose visceral, causada pelas espécies *L. donovani* e da leishmaniose cutânea causada por *L. tropica*, podendo está relacionado como reservatório das espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. paranensis* (WHO,2010).

Os cães, domésticos e outros canídeos, são reservatórios da *L. chagasi*, outra espécie causadora da leishmaniose visceral. Existem algumas razões para que esses animais sejam potenciais reservatórios, como o fato desses estarem presentes nas casas e também nas ruas, devido ao crescente abandono, alta taxa de reprodução desses animais juntamente com a maior adaptação do vetor ao ambiente urbano aumentando, assim, as chances de transmissão doméstica da leishmaniose. No ambiente silvestre, os reservatórios são representados por animais: da ordem Didelphimorpha, como as espécies *Didelphi marsupialis* e *Didelphi albiventris*; da ordem Rodentia animais dos gêneros *Proechimys* spp. e *Thrichomys* spp.; além da ordem Primata, gêneros *Cebus* spp. e *Aotus* spp., como pode ser visto na Figura 3 (BASTOS; MADRID; LINHARES, 2015; DANTAS-TORRES, 2007; ROQUE e JANSEN, 2014).

Figura 3. Reservatórios das espécies de *Leishmania* spp. (A) *Didelphi albiventris* (B) *Thrichomys pachyurus* (C) *Canis lupus familiaris*



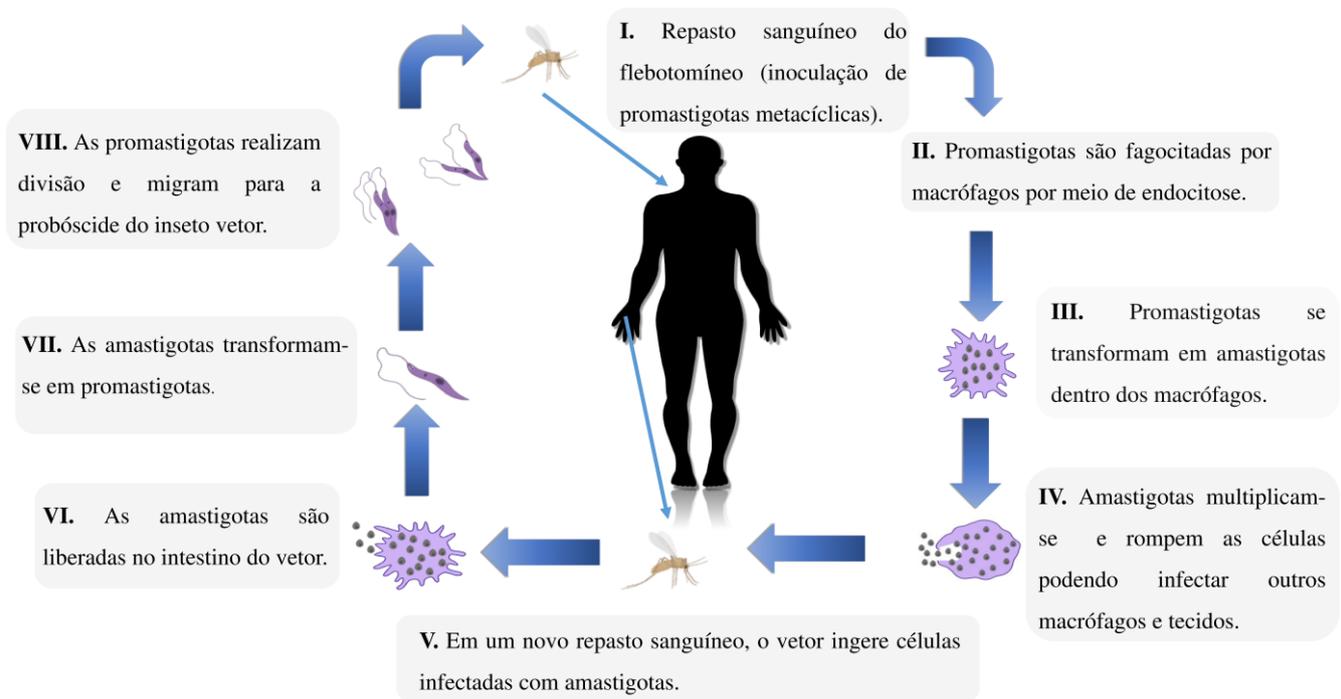
2.2 Ciclo Biológico e Resposta Imune

O ciclo de vida no hospedeiro mamífero tem início quando a fêmea do inseto vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas (forma infectante do parasito) através de seu repasto sanguíneo. Na corrente sanguínea, essas promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente os macrófagos. Após o processo de fagocitose, as promastigotas se transformam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária (Figura 4). Devido à grande multiplicação das amastigotas intracelulares, as células infectadas sofrem lise e essas amastigotas podem infectar novas células e diferentes tecidos do corpo (PATIL et al, 2012).

A infecção do vetor ocorre quando o mesmo realiza um repasto sanguíneo em um indivíduo infectado. Desse modo, o flebotomíneo ingere macrófagos que contêm amastigotas em seu interior. As formas amastigotas são envoltas por uma matriz peritrófica que é caracterizada por uma malha proteica produzida pelo epitélio do intestino médio do inseto vetor. Devido às mudanças fisiológicas, como a diminuição da temperatura e o aumento do pH, há o desencadeamento de transformações morfológicas do parasito, assim, as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas, essas apresentam flagelos curtos e pouco móveis. Posteriormente, as promastigotas procíclicas multiplicam-se e migram para a região da válvula estomedeal, localizada no intestino médio do inseto. Ademais, há a transformação dessas em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. O ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp. se repete quando, ao realizar um novo repasto sanguíneo, a fêmea regurgita as formas infectantes e inocula em um novo hospedeiro mamífero (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

A resposta imune contra o parasito *Leishmania* spp. depende dos mecanismos que envolvem a imunidade inata e imunidade adquirida (CARNEITO; NUNES-PINHEIRO, 2013). Quando injetadas na pele, através do repasto sanguíneo dos flebotomíneos, as promastigotas interagem com células dérmicas como os macrófagos, células de Langerhans e queratinócitos. As promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos por meio do mecanismo CR3 dependente e se transformam em amastigotas. Logo, vacúolos parasitóforos são formados com a presença de lisossomas marcados com proteína de membrana associada ao lisossoma 1 e 2 (LAMP-1, LAMP-2) e Rab7p (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

Figura 4. Ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp.



Fonte: Autora, 2021

Nas primeiras horas da infecção, os macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) como mecanismo primário de combate ao parasito. Os dois principais produtores de espécies reativas em macrófagos são NADPH oxidase 2 (NOX2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que produzem superóxido e óxido nítrico, respectivamente (ILES; FORMAN,2002). Além dos macrófagos, os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da infecção e produzem o que são chamadas de armadilhas extracelulares de neutrófilos, uma rede de fibrilas extracelulares composta por DNA e proteínas antimicrobianas que auxiliam no combate do parasito. Entretanto, o efeito dos neutrófilos sob o parasito é, provavelmente, espécie específico: *L. amazonensis* é mais facilmente morta pelas armadilhas; enquanto *L. infantum* e *L. donovani* são mais resistentes (ROSSI; FASEL, 2018).

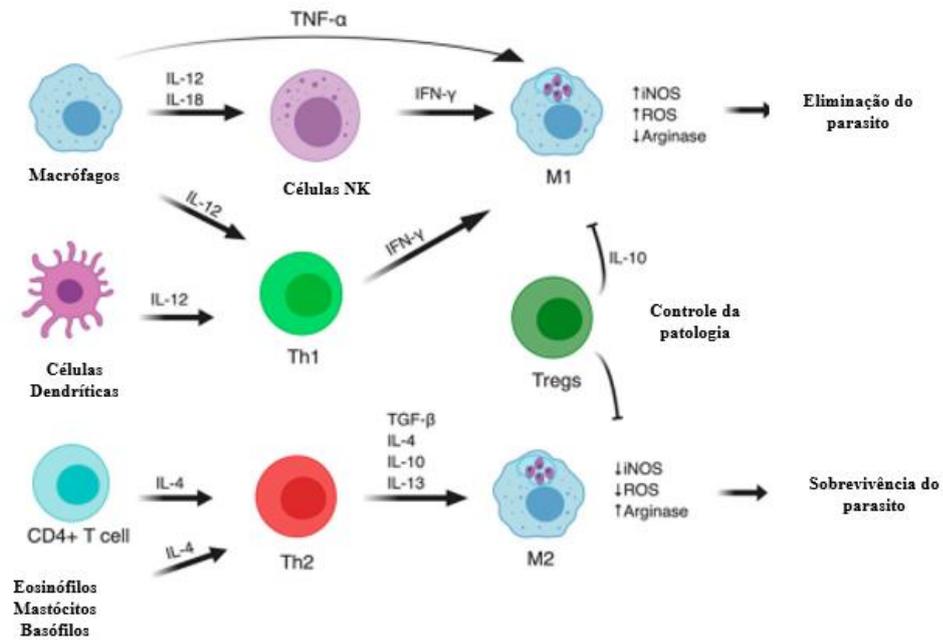
O sistema complemento é um outro componente importante na resposta imune inata contra *Leishmania* spp. O sistema complemento é formado por um grupo de proteínas solúveis que estão envolvidas no combate a infecções por patógenos invasores do corpo. No entanto, os efeitos protetores contra a infecção são contornados por mecanismos de evasão e fatores de virulência. Um dos fatores de virulência que burlam o sistema complemento é a molécula de

superfície das promastigotas metacíclicas, o lipofosfoglicano (LPG). O LPG protege o parasito por meio da inibição de NADPH oxidase nos fagossomas. Outro fator de virulência é a glicoproteína 63 (GP63), caracterizada por ser uma metaloprotease que cliva C3b em iC3b, evitando a lise do parasito por meio da ação do complemento, além de poder atuar como uma opsonina, que auxilia a *Leishmania* spp. a interagir com os macrófagos, favorecendo, assim, sua internalização (PODIINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; OLIVIER et al, 2012).

Para que ocorra uma defesa eficiente contra a infecção é necessário o estabelecimento da resposta imune adaptativa. O desenvolvimento da resposta imune capaz de levar a cura da leishmaniose está relacionada com a ativação e diferenciação dos linfócitos T, que estimulam a produção de citocinas, ativando os fagócitos mononucleares e, assim, eliminação do parasito. Existe um paradigma entre as respostas Th1 e Th2 (Figura 5), na qual a primeira induz a morte do parasito e a segunda está relacionado a suscetibilidade da infecção e replicação do parasito (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018).

As células T CD4⁺ se diferenciam em células T helper do tipo Th1 e desenvolve uma resposta pró-inflamatória, culminando na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e TNF- α , que induzem a polarização M1 de macrófagos. Como resultado dessa resposta, há a produção de ROS e, conseqüentemente, aumento da fagocitose que leva ao controle da infecção. Por outro lado, a resposta Th2 caracteriza pela produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-13, IL-10 e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), que estimula a polarização M2 de macrófagos, aumentando a biossíntese de poliamina e arginase, além de diminuir a produção de iNOS, favorecendo a proliferação do parasito e progressão da doença (DOS SANTOS MEIRA; GEDAMU, 2019; ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018).

Figura 5. Resposta Th1 e Th2 contra *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de DOS SANTOS MEIRA; GEDAMU, 2019

2.3 Formas Clínicas e Diagnóstico

A leishmaniose apresenta diversas manifestações clínicas que estão relacionadas a mecanismos imunológicos, suscetibilidade do hospedeiro e virulência do parasito. Desse modo, considera-se a leishmaniose não uma doença, mas sim um complexo de doenças. Ela pode ser dividida em dois grupos, a leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV).

A leishmaniose tegumentar é a forma menos grave da doença, causada por algumas espécies como *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* nas regiões da América Central e do Sul. A LT caracteriza-se por apresentar lesões ulcerativas ou nodulares no local da picada do inseto vetor e são encontradas em locais descobertos do corpo, como braço, rosto, mãos e pernas. Assim, a LT pode ser classificada nas seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose recidiva (LR) e leishmaniose dérmica pós- calazar (LDPC) (ANVERSA, et al 2018; MCGWIRE e SATOSKAR, 2013; GOTO e LINDOSO, 2012). Ver Figura 6.

Figura 6. Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar - (A) LCL; (B) LCD ; (C)LMC; (D) LD ; (E) LR; (F) LDPC



Fonte: GOTO e LINDOSO, 2012; MCGWIRE e SATOSKAR,2013; OPAS,2019

A leishmaniose cutânea localizada é a manifestação clínica mais prevalente das leishmanioses. Após a inoculação do parasito pelo inseto, os sintomas são manifestados entre 2 a 8 semanas. Esse tempo varia de acordo com a espécie de *Leishmania* spp que o indivíduo se infectou. Passado o período de incubação, o local da picada apresenta aumento da temperatura e inchaço, posteriormente, há a formação de uma pápula eritematosa que varia de 1 a 10 mm de diâmetro. Essa transforma-se em uma vesícula e depois em pústula, que resulta em úlceras únicas ou múltiplas, arredondadas de bordos altos com fundo glanuloso. Essas são indolores, no entanto, podem apresentar dor devido a infecções secundárias, como por *Staphylococcus* spp. Em muitos casos, as lesões causadas pela LCL são curadas sem o auxílio de tratamento, mas essa cura pode se estender de meses a anos e, conseqüentemente, resulta em cicatrizes hipopigmentadas (TORRES-GUERRERO et al, 2017; SCORZA et al, 2017).

A LCD é uma das formas raras da doença causadas pelas espécies *L. amazonensis*, *L. aethiopica* e *L. mexicana*. É conhecida como leishmaniose lepromatosa, pois há a formação de

pápulas ou nódulos não ulcerantes no indivíduo acometido. No Brasil, relata-se incidência de 2,4% e aumento de três vezes ao longo de 20 anos e destaca-se a espécie *L. amazonensis* como responsável pelos casos no país. Já a LD é caracterizada pela presença de 10 ou mais lesões mistas em duas ou mais partes do corpo, está relacionada com a presença de imunossupressão no paciente (KEVRIC,2015; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A LMC está relacionada a infecções com *L. braziliensis*, espécie responsável por um grande número de casos no Brasil, caracterizada pela capacidade do parasito se disseminar para os tecidos mucosos através da corrente sanguínea. Inicialmente, os acometidos queixam-se de obstrução nasal, epistaxe com eritema e dificuldade na respiração. Após o início da inflamação nasal, ocorre ulceração da mucosa nasal. Pode haver o comprometimento de septo nasal, lábios, bochecha, faringe, laringe, causando necrose e destruição da cartilagem (DA SILVA VIEIRA et al., 2019; MOKNI,2019; REITHINGER, 2007).

A LR é uma forma rara e crônica da leishmaniose tegumentar caracterizada pelo aparecimento de lesões ao redor da borda ou adjacências das cicatrizes das lesões primárias. Essas são frequentemente indolores, mas contém substâncias inflamatórias granulomatosas. Existe a hipótese de que o aparecimento dessas novas lesões seja devido a um pequeno número de parasitos que sobrevivem na pele e, conseqüentemente, levam à ativação das lesões após o período de cura. As espécies relacionadas com esse tipo de leishmaniose são a *L. tropica*, *L. major* e *L. braziliensis*, sendo a última responsável por causar essa forma no Brasil. Estudos realizados em camundongos mostram que a IL-10 e TGF- β são fatores que auxiliam na permanência de *L. tropica* após o indivíduo apresentar a cura, no entanto, em humanos ainda não foi relatado (MCWIRE e SATOSKAR,2013; SCORZA et al, 2017).

A LDPC caracteriza-se por ser uma complicação na pele que ocorre após o tratamento da leishmaniose visceral causada por *L. donovani*. É muito comum em pacientes que apresentam desnutrição ou tiveram tratamento para LV incompleto. É muito comum no sul da Ásia, região da Índia, Nepal e Bangladesh e na África Oriental, principalmente, no Sudão. Nessa forma, há o aparecimento de lesões maculares difusas, papulares ou nodulares no corpo do indivíduo acometido. LDPC é frequente em cerca de 20% dos pacientes com leishmaniose visceral na Índia, com lesões que apareceram de 2 a 10 anos após o tratamento efetivo contra a forma visceral da doença (MOKNI,2019; MUKHOPADHYAY et al, 2014).

A LV, também conhecida como Kala-azar, caracteriza-se por ser a forma mais grave da doença, endêmica nas áreas tropicais e subtropicais da Eurásia, África e América Latina. O

principal agente etiológico é a espécie *L. donovani*. Já no Brasil a forma visceral é causada pela *L. chagasi* (MARAN et al., 2016; JUNIOR et al., 2018). Logo após o período de incubação que é entre 2 a 6 meses, os pacientes apresentam sintomas como febre, fadiga, perda de apetite e emagrecimento. Por ser uma doença de caráter crônico e sistêmico, os acometidos apresentam hepatoesplenomegalia com distensão abdominal, trombocitopenia, leucopenia e hipoalbuminemia, além de apresentarem grande risco de otite média, infecções gastrointestinais e pneumonia (Figura 7) (ZACARIAS et al, 2017; ANVERSA et al, 2018; GRIENSVEN; DIRO, 2012).

Figura 7. Paciente com Leishmaniose Visceral



Fonte: CHAPPUIS et al, 2007

A leishmaniose apresenta um grande espectro clínico que muitas vezes pode ser confundida com outras enfermidades, principalmente, as lesões da forma tegumentar. Diante desse fato, o diagnóstico precoce e correto é imprescindível para que seja possível dar início ao tratamento, possibilitando assim, o alívio dos sintomas, controle da evolução da doença e melhores condições de vida ao paciente. Além disso, o diagnóstico é de grande importância no controle epidemiológico e na confirmação de novos casos (OPAS,2019).

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar, em laboratório, consiste na pesquisa do parasito por meio de esfregaço corado com Giemsa. A coleta do material biológico é realizada por meio de escarificação, punção, aspiração por impressão ou biopsia da borda das lesões. Assim, é possível observar as formas amastigotas como estruturas ovais ou redondas, com núcleo e

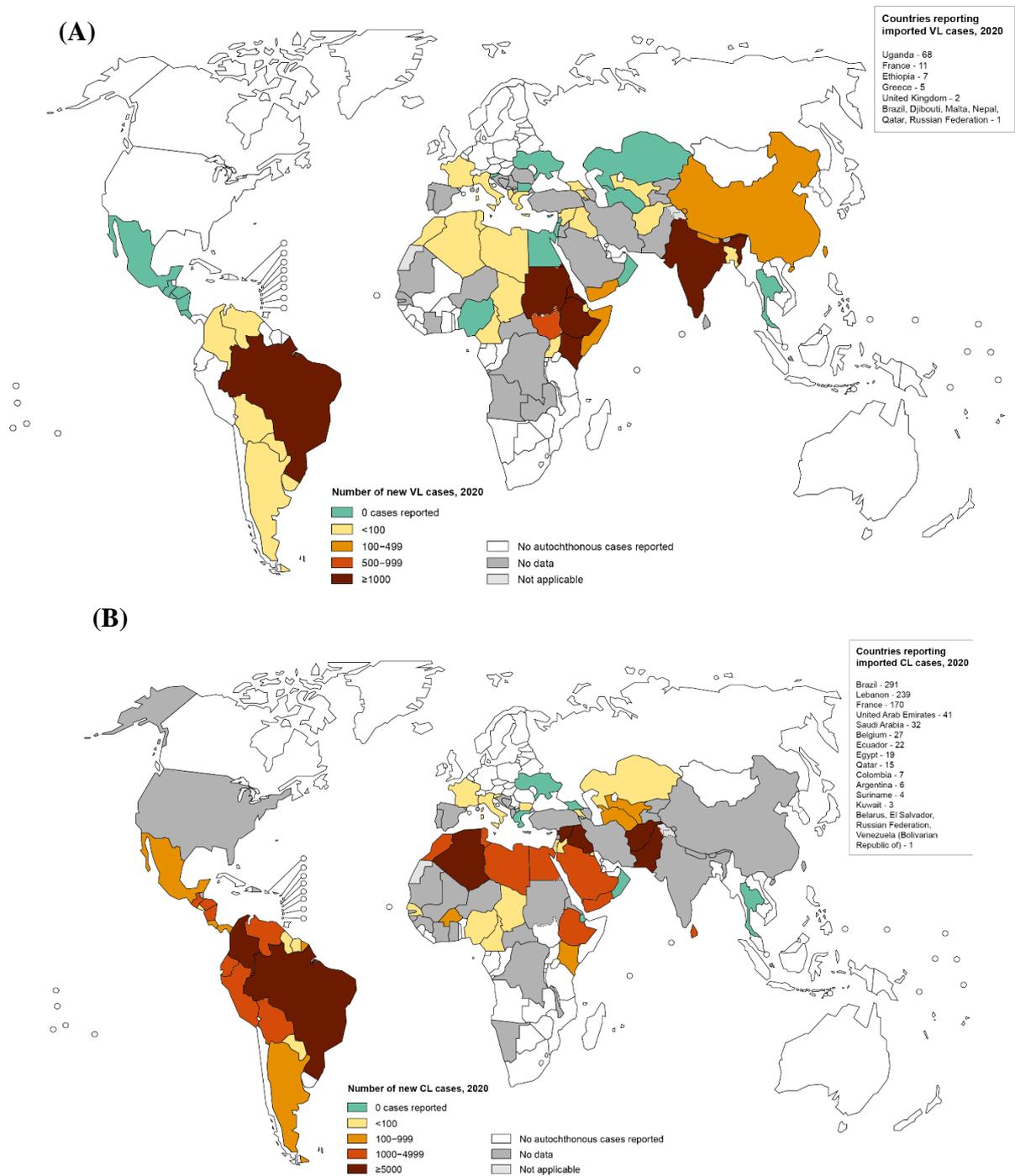
cinetoplasto característico. Outro método de diagnóstico é o exame histopatológico do tecido para detecção do parasito, no qual é corado com hematoxilina-eosina e lido em microscópio sob óleo de imersão (100 x). Ademais, são utilizados métodos sorológicos, cultura e reação da cadeia polimerase (PCR), no entanto, os dois últimos não são realizados em países em desenvolvimento (ARONSON; JOYA, 2019; ANVERSA et al, 2018).

Além do diagnóstico clínico, baseado nos sinais, sintomas e histórico de vida do paciente, a LV é diagnosticada por meio de análises laboratoriais que vão desde métodos parasitológicos até ensaios com biologia molecular. A visualização direta das amastigotas é feita por meio do método parasitológico que consiste na aspiração da medula óssea, linfonodos ou de biópsia hepática que, posteriormente, é visualizada em microscópio. São realizados também ensaios sorológicos para detectar anticorpos contra as espécies de *Leishmania* spp, como por exemplo, imunofluorescência indireta (RIFI), imunoensaio enzimático (ELISA) e hemaglutinação indireta. Além disto, o teste imunocromatográfico rápido que detecta anticorpos contra o antígeno recombinante rK39 é utilizado no Brasil, Sudão, Nepal e África, com sensibilidade que varia de 95 a 100% (SAKKAS; GARTZONICA; LEVIDIOTOU, 2016; SRIVIDYA et al, 2012).

2.4 Epidemiologia

As leishmanioses são endêmicas em 102 países, distribuídos em todos os continentes do mundo. Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas vivem em regiões suscetíveis à infecção. Há o registro de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos e de 20.000 a 30.000 mortes a cada ano. Da porcentagem total do número de casos da leishmaniose visceral no mundo, cerca de 90% concentra-se no Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão e Sudão do Sul (Figura 8). Além disso, 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorre nas regiões da América, Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio, sendo Afeganistão, Brasil, Irã, Iraque e Síria os detentores de três quartos dos novos casos de leishmaniose cutânea (OPAS, 2019).

Figura 8. Distribuição mundial da leishmaniose em 2020 - (A) LV (B) LT



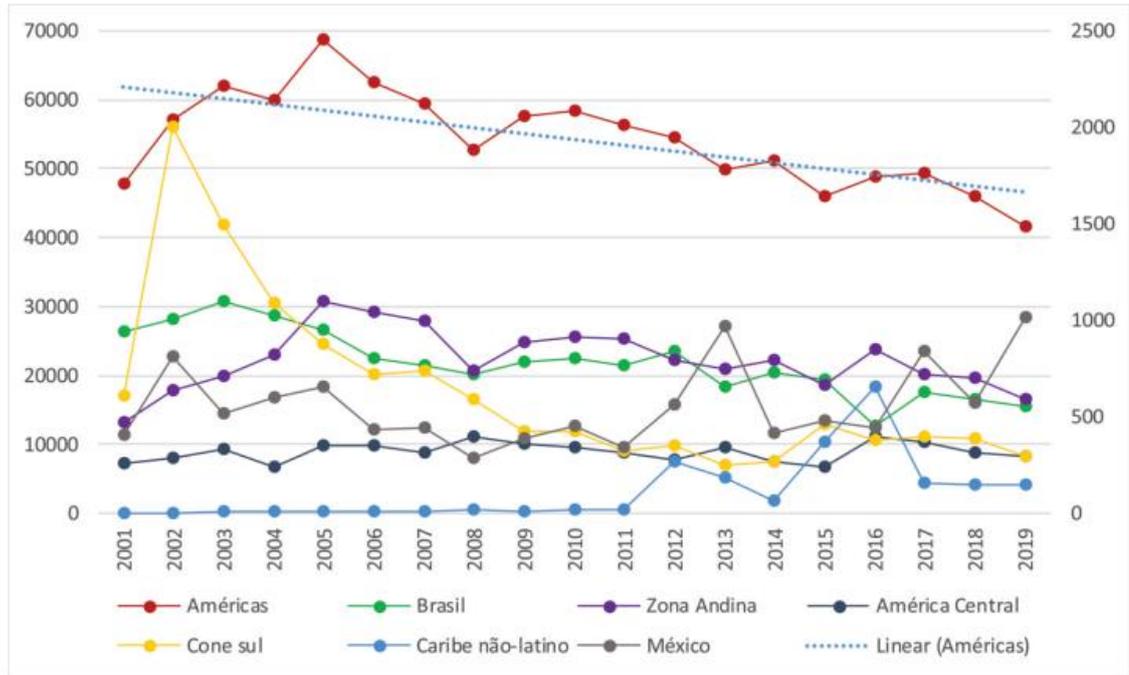
Fonte: WHO, 2020

Na região das Américas, entre os anos 2001 a 2019, foram notificados a OPAS 1.028.054 casos de leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa em 17 dos 18 países endêmicos para a doença, com média anual de 54.108 casos (Figura 9). O ano de 2019 foi o que apresentou o menor número de casos (41.617), exibindo um decréscimo de 9% em relação ao ano anterior. Essa diminuição ocorreu devido a redução do número de casos nos países Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela. Todavia, El Salvador, Guatemala, Honduras, México e Suriname tiveram aumento de casos, principalmente México (76%) e El Salvador (360%). Ainda em 2019, os países com maior número de casos foram Brasil (15.484), Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (2.052) (OPAS, 2020).

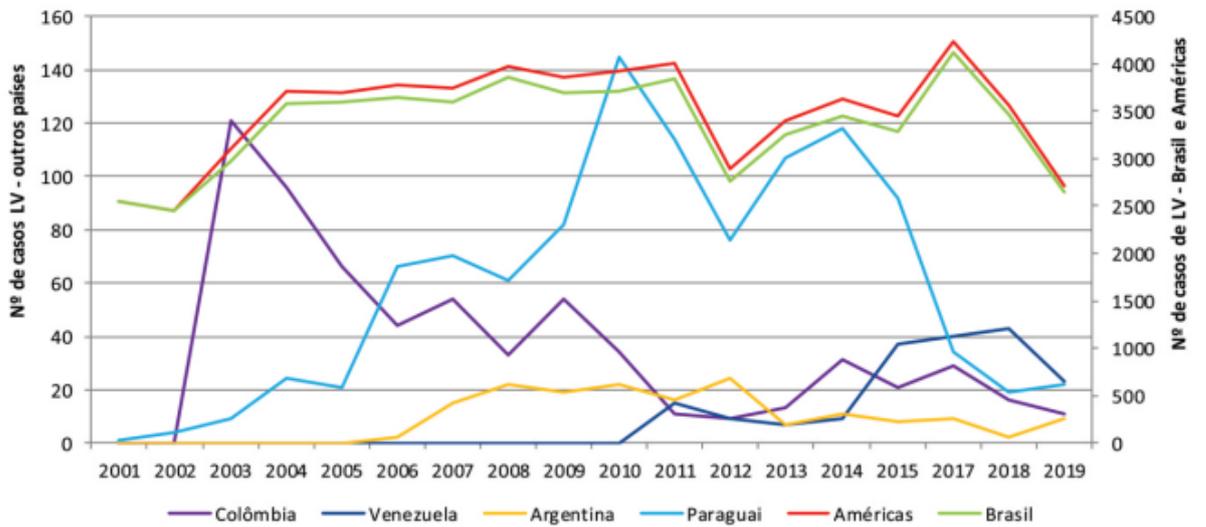
A forma visceral da doença é endêmica em 13 países da América. Entre o período de 2001 a 2019 foram registrados 65.934 novos casos, com uma média de 3.470 casos por ano. Do número total de casos, em 2019, 97% foram registrados no Brasil e demais na Argentina, Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Uruguai. A incidência de casos nas Américas foi de e 2,96 e 0,47 casos por 100.000 habitantes, considerando a população das áreas de transmissão e a população total dos países com ocorrência de casos de LV. Brasil, Guatemala, Paraguai e Venezuela tiveram uma redução na incidência de LV, enquanto Argentina, Bolívia, Colômbia, Honduras, México e Uruguai apresentaram aumento.

Figura 9. Número de casos de leishmaniose na região das Américas - (A) LT (B) LV

(A)



(B)



Fonte: OPAS, 2020

Segundo dados do SINAN, a região Nordeste do Brasil, entre os anos de 2007 a 2019 apresentou 80.784 casos de LT e um total de 25.367 casos de LV (Tabela 1). Já no estado de Alagoas (Tabela 2), entre os anos de 2007 a 2019, foram registrados 559 casos de LV e 896 de LT (SINAN/SVS/MS,2021).

Tabela 1. Número de casos de LT e LV na região nordeste entre 2007 a 2019

Leishmaniose Tegumentar		Leishmaniose Visceral	
ANO	CASOS	ANO	CASOS
2007	6.272	2007	1.762
2008	6.605	2008	1.893
2009	7.384	2009	1.939
2010	9.453	2010	1.845
2011	8.533	2011	2.046
2012	8.876	2012	1.537
2013	5775	2013	1.984
2014	5.429	2014	2.422
2015	5.591	2015	2.148
2016	3.771	2016	1.828
2017	4.926	2017	2.199
2018	4.415	2018	2.197
2019	3.754	2019	1.603
TOTAL	80.784	TOTAL	25.367

Fonte: SINAN, 2021

Tabela 2. Número de casos de LT e LV em Alagoas entre 2007 e 2019

Leishmaniose Tegumentar		Leishmaniose Visceral	
ANO	CASOS	ANO	CASOS
2007	120	2007	32
2008	93	2008	25
2009	79	2009	31
2010	39	2010	34
2011	36	2011	37
2012	70	2012	37
2013	52	2013	25
2014	32	2014	43
2015	186	2015	44
2016	40	2016	26
2017	31	2017	47
2018	30	2018	106
2019	85	2019	72
TOTAL	896	TOTAL	559

Fonte: SINAN, 2021

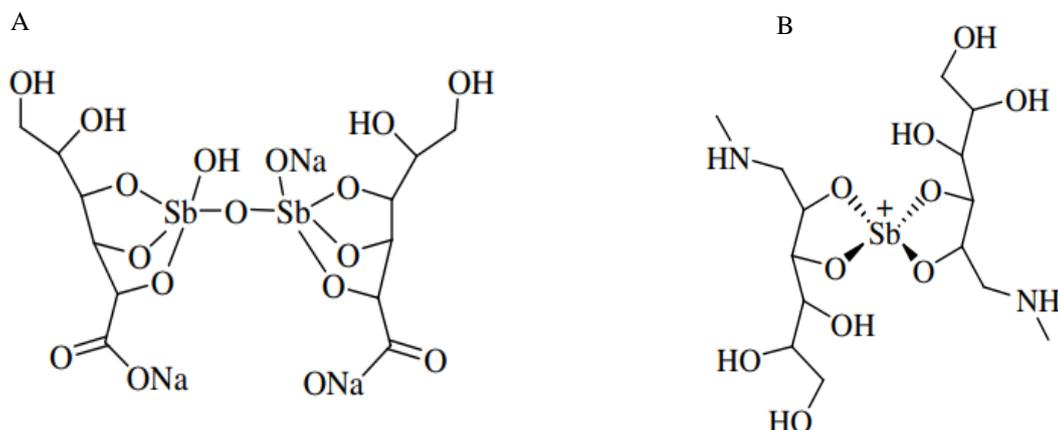
Desse modo, a partir dos dados epidemiológicos observa-se que a leishmaniose é uma doença de proporções continentais e de importância na saúde pública. No entanto, ainda é negligenciada pela indústria farmacêutica e possui farmacoterapia escassa.

2.5 Tratamento

O tratamento das leishmanioses é restrito e consiste em quimioterapia. Atualmente são utilizados os fármacos de primeira escolha conhecidos como antimoniais pentavalentes (estiboglumato de sódio e antimoniato de meglumina) e os de segunda escolha, os quais são a anfotericina B, na sua forma convencional e lipossomal, pentamidina, miltefosina e paramomicina (HANDLER et al, 2015). Dessa forma, o êxito do tratamento está relacionado com alguns fatores, como por exemplo, características do parasito quanto à sensibilidade ao fármaco, dosagem e período do tratamento, além do tipo de manifestação clínica e da resposta imune (ANVERSA et al, 2018).

No ano de 1912, o médico Gaspar Vianna observou a eficácia do uso do antimônio trivalente (Sb^{3+}) conhecido como tártaro emético em alguns tripanossomatídeos e assim decidiu introduzir o uso desse no tratamento da leishmaniose cutânea. Devido a sua alta toxicidade, em 1940, os antimoniais pentavalentes Sb^{5+} (V) foram introduzidos no tratamento da leishmaniose. Na atualidade, os antimoniais disponíveis comercialmente são o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; ANDRADE NETO et al, 2018). A representação das estruturas químicas de ambos os fármacos está disposta na Figura 10.

Figura 10. Representação química dos antimoniais pentavalentes. (A) Estibogluconato de sódio. (B) Antimoniato de meglumina



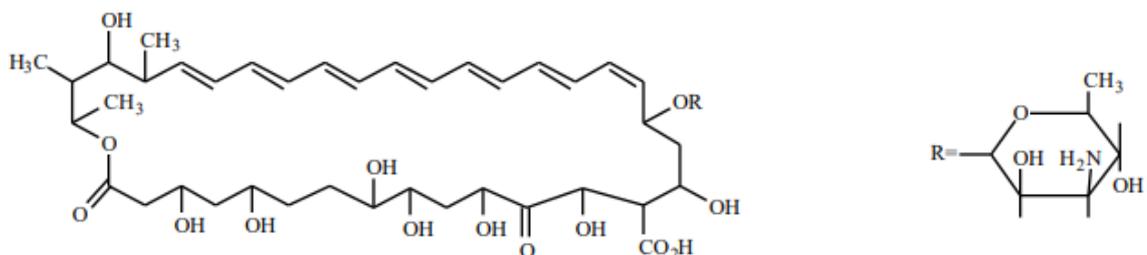
Fonte: FRÉZARD et al, 2008

Os antimoniais são administrados por via parenteral e a dosagem equivale de 10 a 20 (mg/kg/dia). Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doses não devem ultrapassar 20mg/kg/dia e não ultrapassando o limite de 850mg de antimônio. Devido a sua grande toxicidade, os pacientes tratados com esses fármacos apresentam alguns efeitos adversos, como hepatite, pancreatite, mialgia, dores de cabeça, fadiga e náuseas, além de distúrbios gastrointestinais e cardiológicos (PALUMBO, 2010; RATH et al, 2003).

O mecanismo de ação dos antimoniais contra o parasito ainda é pouco entendido, no entanto a literatura mostra que esses são pró-fármacos, ou seja, após administrado na sua forma inativa, são ativados por meio do metabolismo em um componente ativo, assim, a forma pentavalente é reduzida na forma trivalente mais tóxica. Essa redução, *in vivo*, está relacionada com ação da glutatona S-transferase, tióis de baixo peso molecular e tripanotona. Além disso, os antimoniais estão relacionados na atuação na glicólise, inibindo a fosforilação de ADP em ATP pelo uso do NADH que é gerado na glicólise e no ciclo de Krebs, desse modo, a energia necessária para a sobrevivência do parasita se esgota (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007).

A anfotericina B desoxicolato (Figura 11) é um fármaco que foi descoberto no ano de 1956, caracterizado por ser um antibiótico macrolídeo polieno isolado da bactéria *Streptomyces nodosus*, apresenta pouca absorção pelo trato gastrointestinal e, por possuir uma distribuição multicompartmental, é encontrado em baixas concentrações no humor aquoso, pleural e fluídos pericárdicos (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007). A administração desse fármaco é feita por infusão intravenosa lenta e requer hospitalização, recomendando-se doses de 0,5 a 1mg/ kg durante um período de 20 dias. Ademais, os tratados com esse fármaco apresentam vários efeitos adversos como febre com calafrios, tromboflebitas, miocardite, hipocalcemia grave, disfunção renal e, nas piores hipóteses, a morte (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018; MONZOTE, 2009).

Figura 11. Estrutura química da anfotericina B



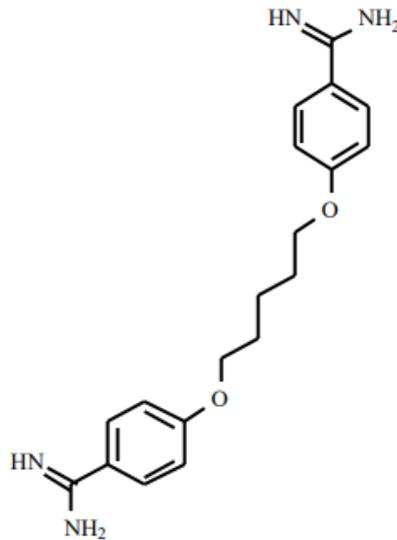
Fonte: CROFT; YARDLEY, 2002

O mecanismo de ação da anfotericina B está relacionado ao esteroide ergosterol que é um dos principais componentes da membrana plasmática do parasito *Leishmania* spp. Ao entrar em contato com o ergosterol, a molécula desse fármaco induz a formação de canais transmembranares, causando assim, a despolarização da membrana e aumento da permeabilidade, eliminando prótons e cátions monovalentes. O extravasamento do conteúdo celular leva o parasito a morte. Além disso, tem capacidade de se ligar ao colesterol das membranas das células de mamíferos, conseqüentemente, essa ação contribui para a toxicidade do fármaco (SILVA-LÓPEZ, 2010; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

Com a intenção de diminuir a alta toxicidade e efeitos adversos da anfotericina B desoxicolato, foram desenvolvidas formulações lipídicas que apresentam menor toxicidade e uma maior facilidade de absorção (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2014). Atualmente, estão disponíveis comercialmente três formulações: AmBisome®, estrutura lipídica unilamelar formada por fosfatidilcolina hidrogenada, colesterol e distearilfosfatidilglicerol; Abelcet® formada por um complexo lipídico; e anfotericina B em dispersão coloidal, Amphotec/Amphotec® (STONE et al, 2016).

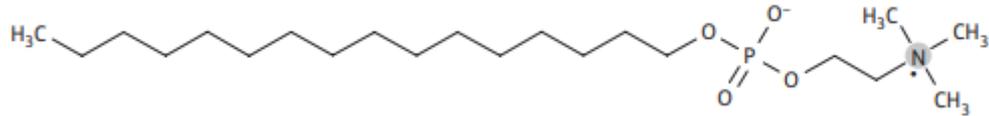
A pentamidina, cuja estrutura química pode ser vista na Figura 12, é uma diamina aromática que foi utilizada, em 1980, no tratamento de pacientes com LV, na Índia. É usada também como segunda escolha para aqueles que apresentam resistências aos antimoniais pentavalentes (KIP et al, 2018; SINGH et al, 2016). É administrada por via intramuscular em doses de 4mg/kg uma vez ao dia, durante um período de 7 dias, aproximadamente. Assim como os outros fármacos apresentados anteriormente, a pentamidina apresenta grande toxicidade e efeitos adversos como dor no local da injeção, náusea, vômitos, mialgia, dor de cabeça, tontura, hiperglicemia e hipotensão (SUNDAR; SINGH, 2018). Quanto ao mecanismo de ação, a pentamidina atua no genoma do parasito, bloqueando a replicação e transcrição mitocondrial. Portanto, as poliaminas são ligadas e substituídas nos locais de ligação dos ácidos nucleicos, principalmente no DNA do cinetoplasto (NO, 2016).

Figura 12. Estrutura química da pentamidina



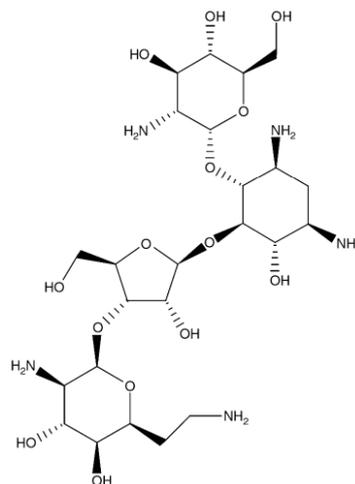
Fonte: MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um fármaco que foi desenvolvido para o tratamento de câncer e que, atualmente, é o único administrado via oral para o tratamento da leishmaniose (MACHADO; PENNA, 2012). Sua dose equivale a um padrão de 2,5mg/kg todos os dias durante um período de 28 dias. Todavia, existem limitações para o uso da miltefosina: além do custo elevado, problemas gastrointestinais, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade estão associados a sua utilização. O mecanismo de ação ainda não é bem conhecido, mas há hipóteses que associam esse fármaco a indução da apoptose, alterações na membrana e efeitos imunomoduladores (KIP et al., 2017; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Figura 13. Estrutura química da miltefosina

Fonte: DORLO et al, 2012

Já a paramomicina (Figura 14) é um antibiótico isolado, inicialmente na década de 50, da cepa de *S. krestomuceticus*. É ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas além de ter ação contra alguns cestódeos e protozoários. Esse fármaco tem como mecanismo de ação a inibição de síntese de proteínas do parasito, uma vez que se liga na subunidade 30S dos ribossomos, conseqüentemente, forma-se complexos ribossômicos anormais causando a morte celular. Assim como os outros fármacos leishmanicidas, a paramomicina apresenta efeitos adversos, tais como dor no local da injeção, disfunção renal e aumento das transaminases hepáticas (DAVIDSON; BOER; RITMEIJER, 2009; KIP et al, 2017).

Figura 14. Estrutura química da paramomicina

Fonte: DAVIDSON; BOER; RITMEIJER, 2009

A farmacoterapia utilizada no tratamento das leishmanioses ainda é restrita e insatisfatória, pois além dos vários efeitos adversos causados nos acometidos pela doença, a administração desses fármacos é por via parenteral e em muitos casos requer a hospitalização, sem contar que o próprio parasito apresenta mecanismos de resistência, assim, é de extrema importância a busca de novos fármacos leishmanicida que apresentem menos efeitos adversos e que sua via de administração seja melhor aceita pelos pacientes.

2.6 Plantas Medicinais da Lista RENISUS

O advento do uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma prática que advém dos tempos mais remotos. Até os dias atuais, a medicina popular está entre as pessoas e esse conhecimento é passado por entre as gerações. Assim, o uso dessas deixou de ser algo empírico para ter comprovação científica (PETROVSKA, 2012). O uso das plantas medicinais é versátil, pois podem ser usados as diferentes partes de sua estrutura, como raiz, caule e folhas, além disso, há diversas formas de preparo que abrange desde a forma bruta até extração de metabólitos e óleos essenciais. Já na indústria farmacêutica, essas plantas agregam grande valor devido aos seus constituintes que podem apresentar atividade biológicas específicas para determinadas doenças, e portanto, torna-se um tratamento alternativo (ŠKROVÁNKOVÁ; MIŠURCOVÁ; MACHŮ, 2012).

Na década de 70, a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou o Programa de Medicina Tradicional que consiste na recomendação aos estados membros o desenvolvimento de políticas públicas que visem a integralização da medicina tradicional e complementar nos sistemas de atenção à saúde. Além disso, a própria OMS reconhece que a maioria dos países em desenvolvimento dependem e usam as práticas tradicionais e a medicina tradicional. Em 2006, foi aprovado no Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que tem como objetivo a garantia de acesso ao uso racional e seguro de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo assim, o desenvolvimento da indústria nacional (BRASIL, 2006). Posteriormente, no ano de 2009, foi divulgada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), na qual, caracteriza-se por ser uma lista com 71 espécies vegetais que mostram

atividades biológicas na literatura. Sendo assim, para a realização desse trabalho foram escolhidas quatro das setenta e uma plantas.

2.6.1 *Allium sativum*

Conhecida popularmente como alho, a espécie *Allium sativum* é utilizada há mais de 400 anos para diversas finalidades, desde o uso em alimentos até para o tratamento de doenças, como dor de cabeça, tumores e vermes intestinais. Existem também evidências que o alho era utilizado nos Jogos Olímpicos na Grécia como estimulante e na China como loção anti-séptica (CORZO-MARTINEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007). Segundo a National Center for Biotechnology Information (NCBI), a planta *A. sativum* está classificada no reino Viridiplantae, filo Streptophyta, classe Liliopsida, ordem Asparagales, família Amaryllidaceae, subfamília Allioideae, gênero *Allium*, espécie *Allium sativum* (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação taxonômica da espécie *Allium sativum*

REINO	Viridiplantae
FILO	Streptophyta
CLASSE	Liliopsida
ORDEM	Asparagales
FAMÍLIA	Amaryllidaceae
SUBFAMÍLIA	Allioideae
GÊNERO	<i>Allium</i>
ESPÉCIE	<i>Allium sativum</i>

Fonte: NCBI, 2020

Quanto a suas características botânicas, o alho é formado por um bulbo subgloboso composto de seis a vinte bulbilhos, que são conhecidos como dentes-de-alho, envolto por folhas protetoras com coloração esbranquiçada ou rosadas, inteiras e membranáceas que se desprendem com facilidade. Esses bulbilhos são inseridos em um caule discoide achatado com várias raízes adventícias fibrosas. Os bulbilhos possuem cor esbranquiçada, rosada ou violácea, é ovoíde, com a lateral comprimida e assimétrico. Além disso, é composto por vitamina A, B1

e C, água, fibra, aminoácidos e compostos que contêm enxofre (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; SABIU et al, 2019). Figura 15.

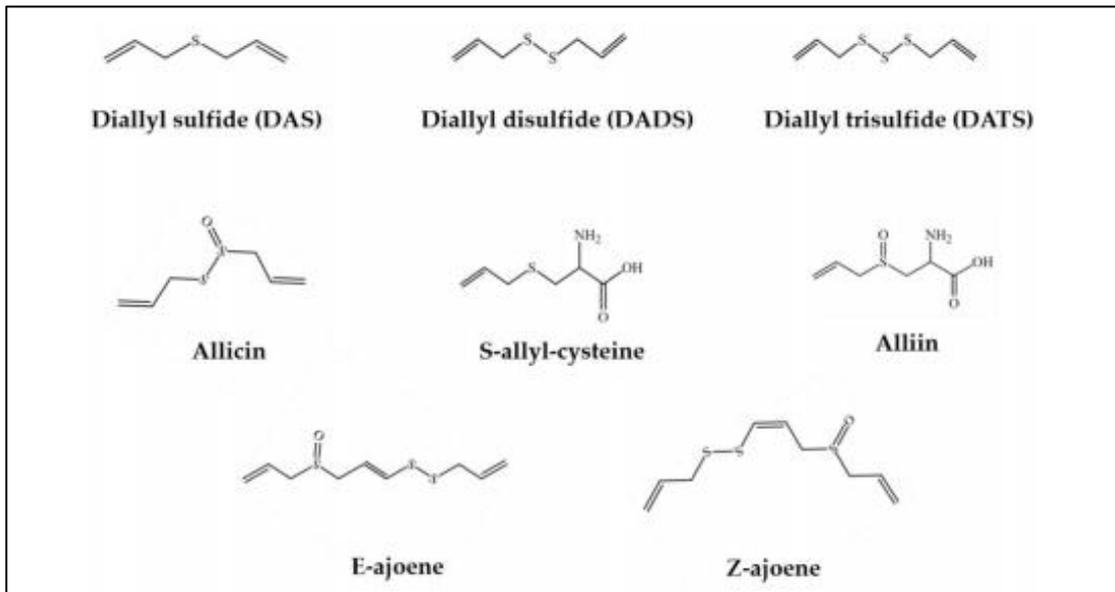
Figura 15. Estrutura morfológica do alho



Fonte: Adaptado de Farmacopeia Brasileira, 6 edição; FOROUTAN-RAD; TAPPEH;KHADEM VATAN, 2017

O alho possui uma grande variedade de componentes químicos que incluem saponinas, componentes organosulfurados e componentes fenólicos que conferem suas propriedades biológicas. Os principais fitoquímicos dessa planta são os compostos derivados de enxofre conhecidos como ajoene (E-ajoene e Z-ajoene), tiossulfina (alicina), dissulfeto de dialilo (DADS), trissulfeto de dialil (DATS), aliina, entre outros (Figura 16) (SHANG et al, 2019; EL-SABER BATIHA et al, 2020).

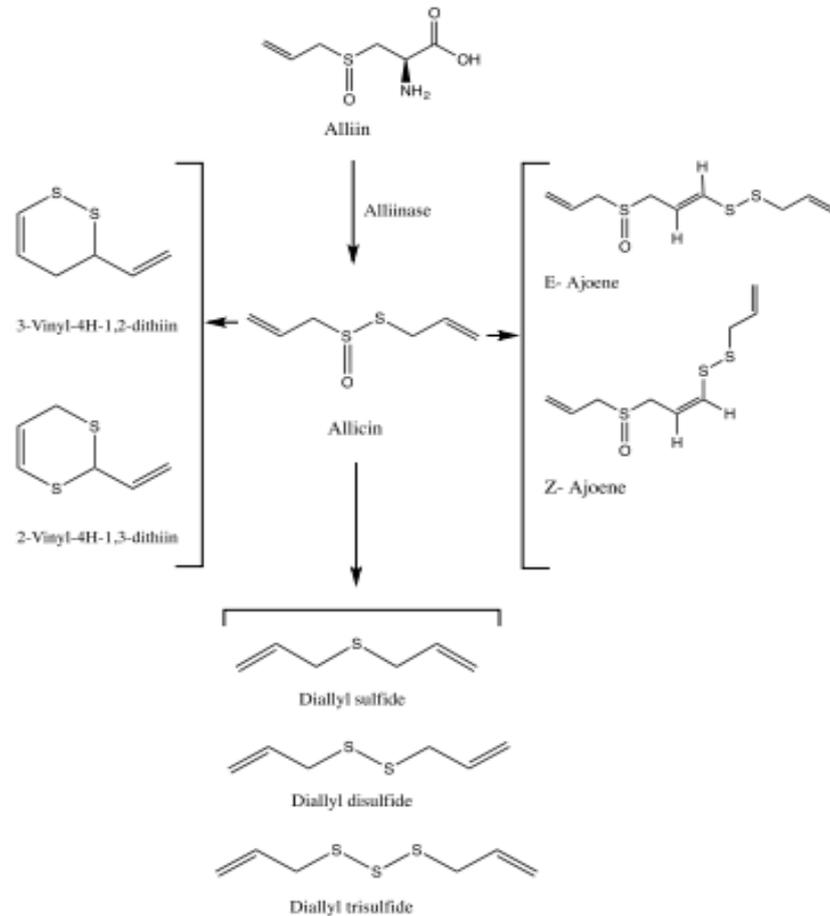
Figura 16. Estruturas químicas dos compostos de *Allium sativum*



Fonte: SHANG et al, 2019

Quando o alho está em seu estado fresco, as glutamilsisteínas são os componentes de enxofre mais encontrados e posteriormente, são hidrolisados em aliina, no entanto, quando o alho é processado, mastigado ou cortado, a aliina reage com a enzima denominada alinase e forma a alicina. A alicina é o composto mais ativo biologicamente dessa planta, foi descoberta em 1944 por Cavallito e Bailey e, depois, Cavallito et al (1993) observou atividade antimicrobiana desse composto. A alicina é um componente muito instável e consegue se decompor rapidamente em compostos de enxofre como o DAS, DADS, DATS, ajoene e sulfeto de hidrogênio (ALAM; HOQ; UDDIN, 2016; RAHMAN, 2007). A Figura 17 mostra a via de formação dos componentes secundários do alho.

Figura 17. Via metabólica de produção de compostos secundários do alho



Fonte: KRSTIN et al, 2018

O alho apresenta variadas atividades biológicas, entre elas, atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antiparasitária. Com o objetivo de demonstrar atividade antimicrobiana, Gaherwal et al (2014) testou extratos bruto e metanólico de *A. sativum* nas bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella Ser. Typhi* e *Staphylococcus aureus*. Utilizando o método de difusão em poço, observou-se que o extrato bruto foi mais eficiente contra a espécie *S. Ser. Typh*, com 22mm de zona de inibição, seguido de *S. aureus* (15mm) e *E. coli* (10mm). Além disso, o extrato metanólico também foi efetivo para as espécies, no entanto, a inibição máxima foi contra *S. aureus*. Nesse mesmo trabalho, o autor demonstrou que ao utilizar um método diferente, neste caso, o método de inibição em caldo nutritivo, o extrato bruto apresenta maior atividade contra *S. aureus* enquanto que o extrato metanólico inibiu todas as espécies.

A onicomicose é uma infecção fúngica considerada um grande problema dermatológico, pois acomete adultos mais velhos, principalmente, quando esses apresentam comorbidades como diabetes mellitus, doenças vasculares e distúrbios imunológicos (MÜGGE; HAUSTEIN; NENOFF, 2006; WESTERBERG; VOYACK, 2013). Sabendo disso, em seu trabalho Pârva et al (2019) avaliou a atividade antifúngica de *A. sativum* nas espécies *Meyerozyma guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*, ambas causadoras da onicomicose.

Assim, observou-se que o extrato etanólico do alho inibiu a germinação e crescimento da espécie *M. guilliermondii* de acordo com as concentrações utilizadas. Quando tratados com 4% de extrato, as colônias mediam entre 9-10mm, na concentração de 8% mediam entre 3-4 mm. Já com 12% de extrato não foi possível observar formações de colônias. O mesmo aconteceu para *R. mucilaginosa*, na concentração de 4% as colônias apresentaram tamanho de 10-11 mm, em 8% de extrato (7-8mm). Quanto ao efeito inibitório, a concentração de 12% inibiu 90% da espécie. Além disso, outros estudos apontam que diferentes extratos de alho, como extrato aquoso, metanólico e etanólico apresentam atividade contra *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Neofabrea alba*, *Aspergillus. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium. herbarum*, *Candida. albicans*, *Microsporium audouinii* e *Trichophyton soudanense* (FUFA, 2019).

Em experimentos *in vitro*, o alho também é eficaz contra parasitos. Segundo, Krstin (2018) testou o extrato diclorometano de *A. sativu* e *Allium cepa* em *Trypanosoma b. brucei* e *Leishmania torentolae*. Tanto o extrato de alho quando o da cebola inibiram o crescimento dos parasitos, no entanto, o alho apresentou maior atividade antiparasitária. Os valores de CI₅₀ foram abaixo de 10µg/ml e para o alho, menor que 1µg/ml. O extrato de alho também foi capaz de inibir irreversivelmente a enzima tripanotiona redutase em 55% e 47% quando incubados com 50 e 20µg/ml, respectivamente. Assim, essa enzima é de grande importância como alvo terapêutico para o combate da doença de Chagas.

2.6.2 *Curcuma longa*

Curcuma longa é uma das mais de 80 espécies pertencentes ao gênero *Curcuma* da família Zingiberaceae (Quadro 2). Esse gênero é caracterizado por ervas rizomatosas perenes nativas das regiões tropicais e subtropicais (DOSOKY; SETZER, 2018). É bem distribuído nas regiões da Ásia, Índia, sul da China, Austrália do Norte e Papua Nova Guiné. Quanto a descrição

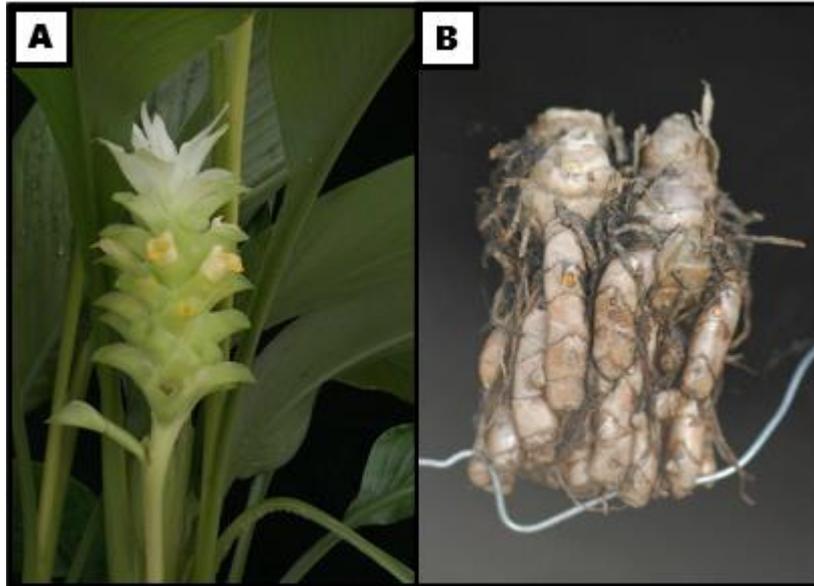
botânica, na parte subterrânea apresenta um rizoma principal ovalado ou arredondados e rizomas laterais cilíndricos e alongados (Figura 18). No interior do rizoma, existe cores diferentes que variam entre creme, amarelo,laranja e azul de acordo com cada espécie. As flores são cercadas por brácteas, cálice tubular, corola em forma de funil com lóbulos desiguais, estames possui filamentos curtos e largo e anteras versáteis, com ou sem esporos, além de ovários glabo trilobado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; SIRIRUGSA; LARSEN; MAKNOI, 2007).

Quadro 2. Classificação taxonômica de *Curcuma longa*

REINO	Viridiplantae
FILO	Streptophyta
CLASSE	Liliopsida
ORDEM	Zingiberales
FAMÍLIA	Zingiberaceae
GÊNERO	<i>Curcuma</i>
ESPÉCIE	<i>Curcuma longa</i>

Fonte: NBCI, 2020

Figura 18. Aspectos morfológicos da *Curcuma longa* - (A) Flor e folhas (B) Rizoma



Fonte: USBRG, US Botany Research Greenhouses, Department of Botany, NMNH, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution

As propriedades biológicas da cúrcuma estão relacionadas aos componentes ativos que são encontrados no rizoma da planta, principalmente, aos curcuminóides. Esses curcuminóides são conhecidos como curcumina, desmetoxicurcumina e bidemetoxicurcumina (KOCAADAM; SANLIER, 2017). A curcumina foi isolada pela primeira vez no ano de 1815, por Vogel e Pelletier, em 1842 ela foi purificada. Só no ano de 1910 que Milobedzka et al elucidou sua estrutura e fórmula química (NEYESTANI et al.; 2019). Até os dias atuais, esse composto ativo é descrito por possuir diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária.

A infecção pelo vírus influenza A pode causar grande estresse oxidativo. DAI et al. (2018), mostraram que as células A549 induzidas ao estresse oxidativo devido ao vírus, quando tratadas com curcumina há a inibição de produção de ROS e além disso, ativação dos receptores Toll-like que são responsáveis pela diminuição da infecção viral. BAGAD et al. (2013) compararam em seu trabalho a atividade anti-inflamatória de curcuminóides, tumeronas e extrato aquoso de *C. longa* (COFAE) em dois modelos de inflamação, edema de orelha induzido por xileno e granuloma induzido por pelotas de algodão. Quando aos resultados, o trabalho mostrou que os curcuminóides (20mg/kg, 60mg/kg e 180mg/kg), tumeronas (0,05mL/kg, 0,1mL/kg e

0,25mL/kg), COFAE(90mg/kg, 180mg/kg e 360mg/kg) induziu uma redução significativa do tamanho da orelha quando comparado com o grupo controle. COFAE nas concentrações de 45mg/kg, 90mg/kg e 180mg/kg exibiu redução nos pesos úmidos e secos das pelotas de algodão em comparação com os controles. Desse modo, a pesquisa demonstrou uma potente atividade anti-inflamatória de COFAE de *C. longa* nos modelos de exsudato agudo (edema de orelha induzida por xileno) e proliferativo crônico (granuloma induzido por algodão), podendo ser usado como uma substância potente para o tratamento de inflamações.

A *C. longa* também apresenta uma grande atividade contra microrganismos. Em seu trabalho, JALALUDDIN et al. (2019) avalia a atividade da planta em patógenos periodontais *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. O trabalho demonstra que quando combinado o tratamento de dimensionamento e alisamento de raiz com irrigação subgingival de extrato de *C. longa* os resultados são melhores que quando usado clorexidina como irrigante. Ademais, outros estudos descrevem a atividade antimicrobiana da planta contra as espécies *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* (PAREI; IBRAHIM;NAWAS, 2018; NEYESTANI et al, 2019). Além disso, esse vegetal apresenta atividade contra parasitos de importância na saúde pública, como *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium* e *Leishmania* (HADDAD; SAUVAIN; DEHARO, 2011; RAI et al, 2020).

2.6.3 *Zingiber officinale*

Utilizada há mais de 3.000 anos na medicina tradicional *Zingiber officinale* Roscoe, também conhecida como gengibre, é uma planta que pertence à família Zingiberaceae, gênero *Zingiber*(Quadro 3). Essa espécie é amplamente distribuída e usada em diferentes regiões do mundo como China, Gongo, Indonésia, Grécia, Japão, Sri Lanka, Estados Unidos, entre outros (KIYAMA, 2020).

Quadro 3. Classificação taxonômica *Zingiber officinale*

REINO	Viridiplantae
FILO	Streptophyta
CLASSE	<u>Magnoliopsida</u>
ORDEM	<u>Zingiberales</u>
FAMÍLIA	<u>Zingiberaceae</u>
GÊNERO	<i>Zingiber</i>
ESPÉCIE	<i>Zingiber officinale</i>

Fonte: NBCI, 2020

O gengibre é uma planta herbácea, perene, com rizoma tuberoso articulado e subterrâneo, caule ereto que mede entre 30-100 cm de altura (Figura 19). As folhas possuem coloração verdes brilhantes, com nervosa longitudinal e 15 a 20 cm de comprimento. Na região inferior apresenta raízes adventícias, carnosas e cor brancacentas. As flores são tipo zigomorfas, ou seja, apresenta simetria bilateral, hermafroditas com coloração amarelo-esverdeado (ADEBOWALE; GBENGA; YEWANDE, 2014; ELPO; NEGRELLE, 2004; HAMEED; ULLAH; RAHMAN, 2020).

Figura 19. Morfologia da espécie *Zingiber officinale*

Fonte: Vincent A. Vos, 2021

As propriedades farmacológicas do gengibre estão relacionadas aos seus constituintes químicos. A composição nutricional do gengibre consiste em carboidratos, gorduras, proteínas, vitamina C e cálcio. O rizoma é composto por óleos voláteis conhecidos como terpenos, zingibereno, beta-bisaboleno, alfa-farneseno, beta sesquifelandrene, alfa-curcumeno e compostos não voláteis gingerol, shogaol, paradols e zingerone que são os compostos fenólicos (ALEEM, et al., 2020; KIYAMA, 2020).

A espécie *Z. officinale* apresenta uma ampla atividade biológica contra desordem gastrointestinais, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária. Em seu trabalho de revisão, os autores NIKKHAH BODAGH, MALEKI e HEKMATDOOST (2019) descrevem os benefícios do gengibre contra náuseas e vômitos, principalmente, durante o período de gravidez, além de gastroenterites, síndrome do intestino irritável, fígado gordo não alcoólico e outros problemas intestinais. O estudo realizado por MONTSERRAT-DE LA PAZ et al (2019) em um modelo murino de fibromialgia, evidencia a ação anti-inflamatória e antinociceptivo do pó do rizoma do gengibre. Os resultados apontam que houve uma redução da resposta inflamatória mediadores pró-inflamatórios, como NO, PGE2, TXB2 e IL-1 β . Ademais, o consumo diário ajuda na diminuição da dor crônica e do estado inflamatório em camundongos.

O gengibre também pode atuar ao mesmo tempo como anti-inflamatório e antimicrobiano. Um trabalho realizado com o intuito de avaliar a atividade anti-inflamatória e antimicrobiana de enxaguante bucal a base de óleo essencial de gengibre demonstra que o enxaguante é eficaz contra a bactéria *Streptococcus mutans*, Além do mais, o óleo essencial é eficiente no controle do biofilme dentário e apresenta propriedade anti-inflamatória reduzindo, assim, o sangramento gengival (FARIA et al, 2021). Essa planta é capaz de reduzir significativamente o crescimento de *P. aeruginosa*, com diminuição das unidades formadoras de colônia. A capacidade de inibição de biofilme foi de $68,13 \pm 4,11\%$ a $84,86 \pm 2,02\%$ (CHAKOTIYA et al., 2017). Outrossim, o gengibre apresenta atividade contra as espécies *E. coli*, *S. aureus*, *St. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, entre outras (ALEEM, et al., 2020).

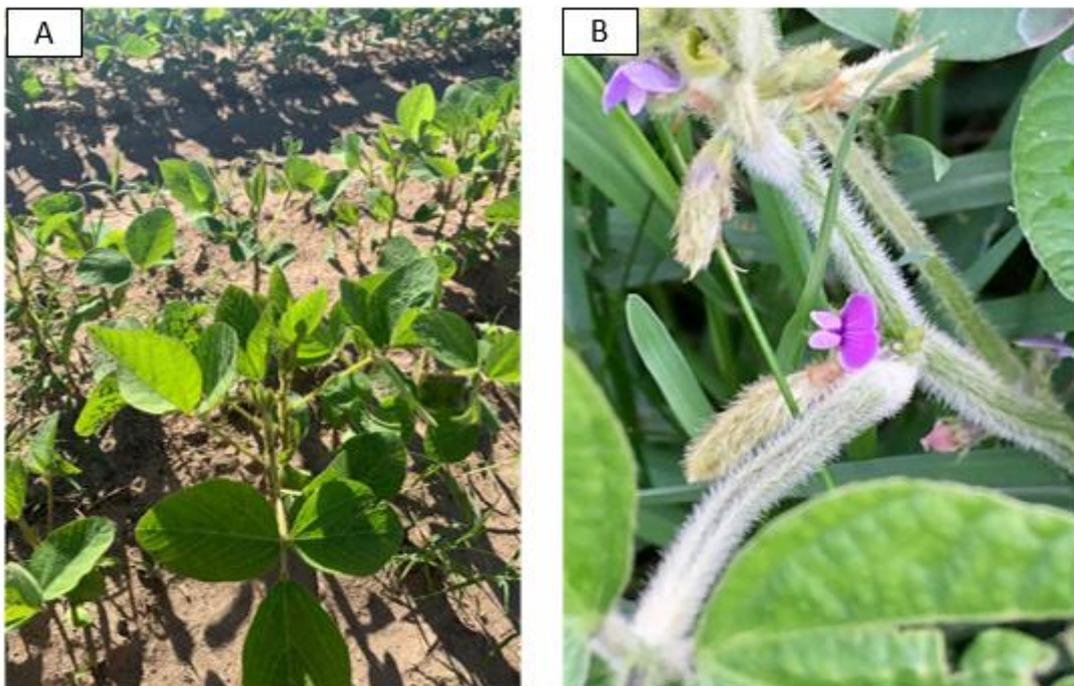
Quanto a atividade antiparasitário, ARBABI et al (2016) descreve a atividade do gengibre contra trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. Observou-se que o número de trofozoítos diminuiriam significativamente com o aumento da concentração do extrato alcoólico de gengibre e do tempo de exposição. Em um período de 48 horas de tratamento, em uma concentração de $800\mu\text{g/mL}$, o número de trofozoítos foi de zero. Além do mais, o extrato induz

a apoptose do parasito de forma dose-dependente e tempo-dependente. O extrato diclorometano de gengibre apresenta atividade contra cistos do protozoário *G. lambria*, eliminando, in vitro, cerca de 97% dos cistos em uma concentração de 50mg/mL depois de uma hora de exposição (DYAB et al, 2016). A literatura menciona que o gengibre apresenta atividade contra o *Plasmodium berghei* e o parasito de peixe de *Ichthyophthirius multifiliis* (BIRUKSEW et al, 2018; FU et al, 2019).

2.6.4 *Glycine Max*

Originária da China, o cultivo da soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) data cerca de 5.000 anos atrás. Atualmente, essa leguminosa é cultivada em diversos países e possui grande importância econômica (VALLIYODAN et al, 2016). A soja pertence à família Fabaceae, gênero *Glycine* (Quadro 4), é caracterizada por ser uma planta anual, com sistema radicular pivotante, ou seja, apresenta raiz principal desenvolvida e raízes secundárias com nódulos fixadores de nitrogênio que apresenta uma relação simbiótica com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. O caule é ereto, as folhas são alternadas, longas, compostas de três folíolos e as flores apresentam coloração branca, violácea ou amarela (SEDIYAMA, 2009).

Figura 20. Aspectos botânicos da espécie *Glycine max*. (A) Caule e folhas (B) Flor



Quadro 4. Classificação taxonômica *Glycine max*

REINO	Viridiplantae
FILO	Streptophyta
CLASSE	<u>Magnoliopsida</u>
ORDEM	Fabales
FAMÍLIA	Fabaceae
GÊNERO	<i>Glycine</i>
ESPÉCIE	<i>Glycine max</i>

Fonte: NBCI, 2020

A soja é composta por proteínas, lipídios, fibras, além dos compostos bioativos isoflavonas e saponinas. As isoflavonas são fitoquímicos possuem propriedades estrogênicas e antiestrogênicas, sendo as principais naturalmente encontradas na soja a glicosídeos, genistina, diadzina e glicetina. Já as saponinas são triterpenóides oleananos anfílicos com cadeias de açúcar polares conjugados a um anel pentacíclico (CHATTERJEE; GLEDDIE; XIAO, 2018; GUANG et al, 2014). Os componentes ativos da soja possuem diferentes atividades terapêuticas como atividade anti-inflamatória, anticâncer, anti-hipertensivo, antiobesidade, atua também contra parasito causador da malária (SIGH; VIJ; HATI, 2014).

Uma isoflavona muito importante na soja é a genisteína que possui receptor de estrógeno positivo nas células de câncer de mama. Assim, em altas concentrações ela é capaz de inibir o crescimento das células do câncer além de impedir a atividade da topoisomerase II do DNA (VARINSKA et al, 2015).

NYANDWARO et al. (2020), testaram em seu trabalho extrato aquosos, metanólico e peptídeos das sementes da soja contra duas cepas de *P. falciparum* D6, sensível à cloroquina e W2 uma cepa resistente à cloroquina. Os extratos de peptídeos e metanol mostraram boa atividade contra a cepa D6, com valores de CI_{50} de $19,97 \pm 2,57 \mu\text{g} / \text{mL}$ e $10,14 \pm 9,04 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. Já os valores de CI_{50} para a cepa W2 para os mesmos extratos foram de $28,61 \pm 1,32 \mu\text{g} / \text{mL}$ e $14,87 \pm 3,43 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. Os extratos que com maior atividade, peptídeo e metanol, foram usados em um ensaio in vitro com camundongos Swiss infectados com *Plasmodium berghei*. Nesse ensaio, foi observado que a dose de 800 mg / kg

dos extratos metanol e peptídeo exibe grande atividade terapêutica, suprimindo o parasita em 72,9% e 71,9%, respectivamente.

Desse modo, as plantas medicinais são um recurso acessível e diverso que apresenta diferentes aplicabilidades no meio terapêutico, sendo uma grande aliada na busca de novos protótipos à fármacos leishmanicida.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito leishmanicida das soluções aquosas das partes que são comumente utilizadas na medicina tradicional das plantas *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* e *Glycine max*, que fazem parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), com o objetivo de descobrir novas substâncias ativas contra o parasito *Leishmania* que possibilite a busca de opções terapêuticas mais acessíveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade das partes que são utilizadas na medicina tradicional das plantas medicinais para a célula hospedeira (macrófago);
- Analisar a atividade leishmanicida das mesmas sobre os macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. chagasi* por meio da determinação da taxa de infecção dos parasitos intracelulares (amastigotas);
- Identificar a seletividade das soluções extrativas aquosas para *L. amazonensis* e *L. chagasi*;
- Verificar o efeito dos produtos dos produtos naturais sobre os macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. chagasi* quanto à produção do óxido nítrico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das plantas medicinais e preparo dos extratos

As plantas medicinais utilizadas no presente trabalho foram obtidas na Erva Doce Doce Erva, Maceió, Alagoas. Inicialmente, foi realizada uma infusão das partes das plantas que já são utilizadas pela medicina popular, essas foram colocadas em um recipiente com água fervente e tampado a fim de extrair seus metabólitos. Posteriormente, foi determinado o peso seco. Para a realização do peso seco, 1mL da solução extrativa foi colocada em um cadinho e esse foi levado para a estufa, após a secagem, a concentração do extrato foi determinada.

4.2 Manutenção da linhagem celular

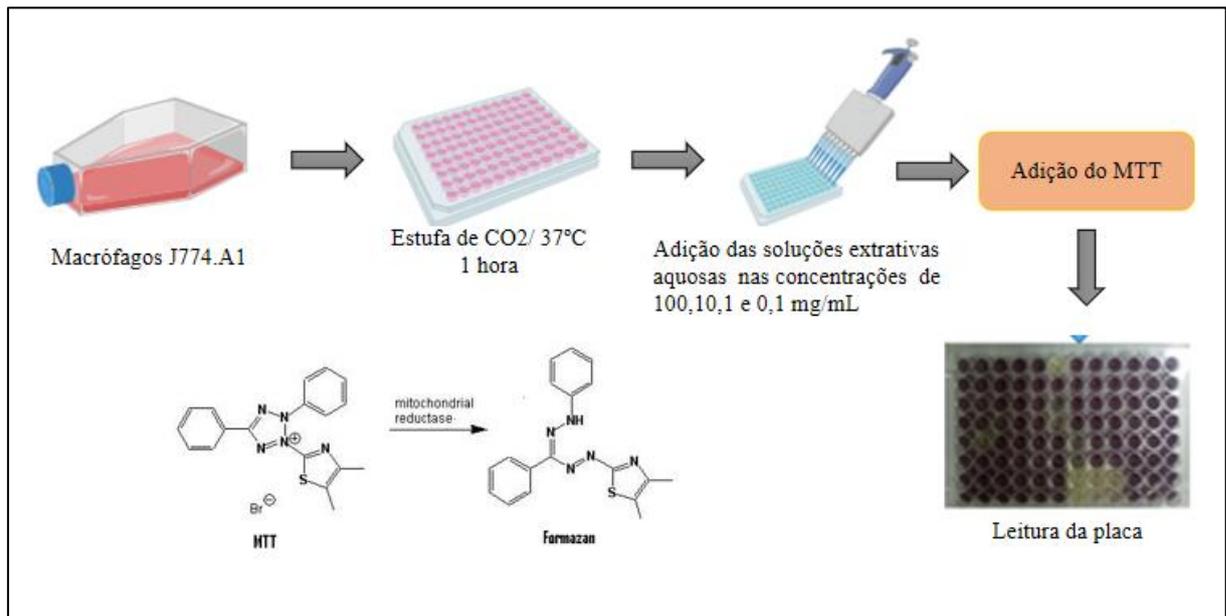
Os macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura em 5mL de meio RPMI com soro. No momento da utilização, foi padronizado a contagem celular, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na concentração de 1×10^5 células/ ml 200 uL dessa suspensão foi distribuída em placas de cultura de 96 poços (Nunc, Dermak) ou 1×10^5 células/poço de placa de 24 poços com lamínulas.

4.3 Avaliação da viabilidade celular

Os macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas nas placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/ poço e incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera 5% de CO₂ por 1 hora, assim, os macrófagos puderam aderir ao plástico. Posteriormente, os poços foram lavadas para a retirada das células não aderentes e foram colocadas as diferentes concentrações das substâncias a serem testadas (100,10,1 e 0,1µg/ mL). Nos poços controles foram utilizadas células cultivadas apenas com meio de cultura suplementado com 10% de SFB (Roche) ou células cultivadas com o diluente das substâncias (DMSO,Sigma). A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de redução do MTT

(MOSMANN et al., 1993). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtida nas culturas controles (Figura 21).

Figura 21. Representação ilustrativa do ensaio de citotoxicidade utilizando MTT



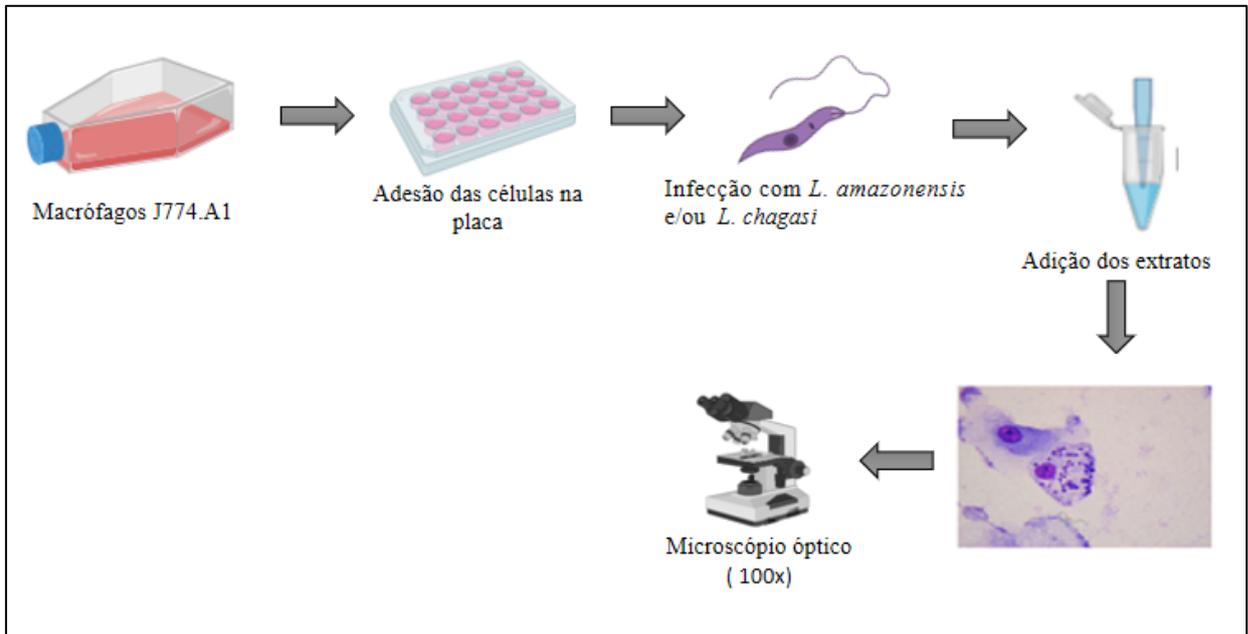
Fonte: Autora, 2020

4.4 Avaliação da carga parasitária *in vitro*

Os macrófagos cultivados em placas de 24 poços foram infectados com formas promastigotas na fase estacionária de crescimento, numa proporção de 10:1 parasitos por macrófagos. A placa foi incubada por um período de 4 horas ou 6 horas (dependente da espécie de *Leishmania*) em estufa com atmosfera úmida de 5 % de CO₂ a 37° C. Após o período de infecção, os macrófagos foram lavados com Hanks sem soro, para a remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com RPMI suplementado com 10% de SFB na presença ou não das diferentes concentrações dos compostos e foram mantidos em estufa de CO₂, a 37°C, por dois dias. Após 48 horas, os poços contendo os macrófagos infectados com o parasito, foram lavados com Hanks sem soro, as células foram fixadas com metanol e depois, coradas com Giemsa e May-Grünwald e montadas em lâminas. A avaliação do número de macrófagos e o número de amastigotas em 100 macrófagos, foi realizada com o auxílio de

microscópio óptico com objetiva de imersão (100X) (NUNES et al., 2005). Este ensaio foi realizado para determinação da atividade leishmanicida de diversas espécies do gênero *Leishmania*, para determinação da seletividade para espécies dermatrópicas e viscerotrópicas (Figura 22).

Figura 22. Ilustração do ensaio de avaliação da carga parasitária *in vitro*

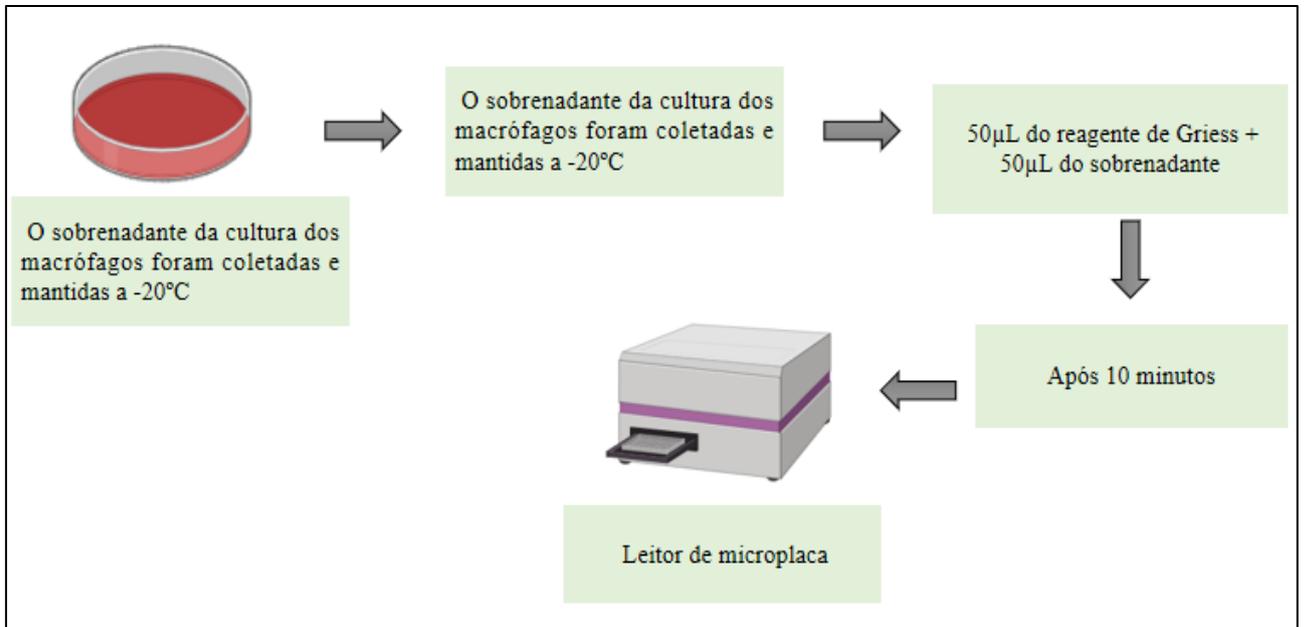


Fonte: Autora, 2020

4.5 Dosagem do óxido nítrico

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e cultivados ou não com a presença das soluções extrativas aquosas foram coletados e mantidos a -20°C até o momento da utilização. A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada indiretamente pela medida da produção de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante das culturas. A concentração de nitrito foi determinada através de reação colorimétrica de Griess. Resumidamente, $50\ \mu\text{L}$ do reagente de Griess foram adicionados a $50\ \mu\text{l}$ do sobrenadante e após 10 minutos, a temperatura ambiente, a densidade óptica foi determinada (filtro de 540nm) em leitor de absorvância em microplacas (Figura 23).

Figura 23. Representação do ensaio de dosagem de óxido nítrico



Fonte: Autora, 2020

4.6 Análise estatística

A análise dos resultados foram realizadas no software Prisma®. Avaliou-se os níveis de significância entre os grupos experimentais e controles positivos e negativos (Teste t Student ou ANOVA). Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ e expressos como média \pm erro padrão da média.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A princípio, foi analisado o efeito citotóxico das plantas *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* e *Glycine max* sobre macrófagos da linhagem J774.A1, através do ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3- [4,5 – dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Esse ensaio é caracterizado pela redução do reagente MTT em cristais de formazan de coloração roxa através da atividade enzimática das mitocôndrias de macrófagos viáveis (MOSMANN, 1993).

Foi observado que nenhum extrato aquoso das plantas apresentou efeito citotóxico para as células hospedeiras, nesse caso, os macrófagos, até a máxima concentração testada (100 µg/mL). Esse é um dado pertinente, pois a não indução de citotoxicidade na busca de novos fármacos leishmanicidas é de extrema importância, visto que aqueles que são usados no tratamento apresentam níveis elevados toxicidade e causam efeitos adversos nos pacientes.

MAHMOUDVAND et al. (2016) demonstrou em seu trabalho que o extrato aquoso de alho em macrófagos peritoniais também apresenta baixa toxicidade. MUSTAFA et al. (2019) verificou em sua pesquisa que a viabilidade celular dos macrófagos da linhagem RAW 264.7 não foi afetada até a concentração de 250 µg / mL de extratos de gengibre. Além disso, em ensaios *in vitro*, a *Curcuma longa* também não apresenta citotoxicidade. KLOESCH et al. (2016) mostrou em seu trabalho que a curcumina na forma lipossomal não apresenta citotoxicidade para macrófagos da linhagem RAW264 e fibroblastos SW982 e SUETH-SANTIAGO et al. (2016) também encontrou em seus experimentos que a curcumina e outros curcuminóides não são citotóxicos para os macrófagos. Outrossim, o extrato aquoso da soja não afeta a viabilidade das células da medula óssea de camundongos e nem fibroblastos (S FREITAS et al., 2019). O fármaco padrão pentamidina apresentou efeito citotóxico máximo de 78,4±3,7% e CI₅₀ de 35,5± 3,4 µM. Os fármacos que também foram utilizados como controle, antimoniato de meglumina e miltefosina, não apresentaram efeito citotóxico máximo. Ademais, nesse estudo não foi possível calcular o CI₅₀ das espécies vegetais devido ao fato de que seu efeito máximo foi inferior a 50%, até a máxima concentração testada (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito citotóxico de *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Glycine max*, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina em macrófagos da linhagem J774.A1.

Substância	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b
Pentamidina	35,5 ± 3,4µM	78,4± 3,7 ****
Antimoniato de meglumina	>300 µM	NA
Miltefosina	>100 µM	NA
<i>Curcuma longa</i>	>100 µg/mL	NA
<i>Zingiber officinale</i>	>100 µg/mL	NA
<i>Allium sativum</i>	>100 µg/mL	NA
<i>Glycine Max</i>	>100 µg/mL	NA

^a Concentração Inibitória de 50% calculada através de curvas concentração-resposta ; ^b média do efeito máximo ± erro padrão em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de eficácia máxima foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01, , ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%; ^{NA} substância não apresenta atividade significativa em relação ao grupo DMSO 0,1%.

Com a finalidade de avaliar a atividade leishmanicida dos extratos aquosos das espécies vegetais sobre os macrófagos infectados com amastigotas intracelulares de *L. chagasi* e *L. amazonensis*, foram calculados o CI₅₀ e o efeito máximo dos extratos aquosos e dos fármacos padrões utilizados como controle (Tabelas 4 e 5).

Na Tabela 4, observa-se que nenhuma das plantas apresentaram atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas de *L. chagasi* até a máxima concentração testada neste trabalho, assim, a CI₅₀ foi > 100 µg/mL. Os fármacos pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina apresentaram efeito citotóxico máximo de, respectivamente, 66,4 ± 3,7, 41,5 ± 2,6 e 72,4 ± 0,7%. Além disso, o CI₅₀ de pentamidina e miltefosina foram, nesta ordem, 65,1 ± 4,9 µM e 13,8 ± 1,7 µM.

Tabela 4. Efeito leishmanicida de *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Glycine max*, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina contra amastigotas de *Leishmania chagasi*.

Substância	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b	Índice de seletividade ^c
Pentamidina	65,1 ± 4,9 µM	66,4 ± 3,7 ***	0,5
Antimoniato de meglumina	> 300µM	41,5± 2,6 ***	-
Miltefosina	13,8± 1,7 µM	72,4± 0,7 ***	> 7,2
<i>Curcuma longa</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Zingiber officinale</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Allium sativum</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Glycine max</i>	>100 µg/mL	NA	-

^a Concentração Inibitória de 50% calculada através de curvas concentração-resposta ; ^b média do efeito máximo ± erro padrão em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de eficácia máxima foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01, , ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%; ^{NA} substância não apresenta atividade significativa em relação ao grupo DMSO 0,1%; ^c índice de seletividade para amastigotas *L. chagasi* em relação a macrófagos da linhagem J774.A1.

Os extratos aquosos também não apresentaram efeito deletério sobre as amastigotas de *L. amazonensis* até a concentração máxima de 100µg/mL, de maneira oposta aos fármacos pentamidina (CI₅₀ 19,4 ± 0,4µM), antimoniato de meglumina (CI₅₀ 251,3 ± 3,7µM) e miltefosina (CI₅₀ 22,1 ± 1,8µM) (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito leishmanicida de *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Glycine max*, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina contra amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Substância	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b	Índice de seletividade ^c
Pentamidina	19,4 ± 0,4µM	68,4± 4,4 ***	1,8
Antimoniato de meglumina	251,3 ± 3,7µM	66,9± 1,4 ***	>1,9
Miltefosina	22,1 ± 1,8µM	91,0± 0,4 ***	>4,5
<i>Curcuma longa</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Zingiber officinale</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Allium sativum</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Glycine max</i>	>100 µg/mL	NA	-

^a Concentração Inibitória de 50% calculada através de curvas concentração-resposta; ^b média do efeito máximo ± erro padrão em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de eficácia máxima foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01, , ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%; ^{NA} substância não apresenta atividade significativa em relação ao grupo DMSO 0,1%; ^c índice de seletividade para amastigotas *L. amazonensis* em relação a macrófagos da linhagem J774.A1.

Mahmoudvand et al. (2016), demonstrou em seu trabalho que os extratos aquosos e metanólico de alho apresentaram grande efeito contra as formas promastigotas de *L. tropica* de forma dose dependente. Os resultados mostraram uma concentração inibitória de 50% do crescimento do patógeno (CI₅₀) do extrato metanólico e aquoso de 12,3 e 19,2 µg/mL, respectivamente. WABWOBA et al (2010) também avaliou o extrato metanólico de *A. sativum* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. major* e *L. donovani*. O extrato mostrou valor de CI₅₀ 34.22 µg/mL e 37.41 µg/mL contra promastigotas de *L. major* e *L. donovani*, respectivamente. Na concentração de 100µg/mL as taxas de infecção foram de 13 e 15% para as amastigotas de *L. major* e *L. donovani*, no entanto, quando comparado ao controle utilizado não houve diferença estatística significativa, o que também corrobora

com os nossos resultados, apesar das espécies serem diferentes e de serem avaliadas soluções extrativas aquosas no nosso estudo.

Dentre os diversos estudos, é notório que existe uma maior atividade efetiva contra o parasito nos extratos que foram utilizados metanol como solvente quando comparado aos extratos aquosos. Infere-se que esse solvente tem uma maior habilidade de extrair os compostos bioativos do alho (FOROUTAN-RAD; TAPPEH; KHADEM VATAN, 2017).

Em seu trabalho, TELES et al. (2019) comparou a atividade leishmanicida de óleos essenciais das plantas *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare* e *C. longa*. O óleo essencial de cúrcuma apresentou melhor atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*, além disso, a concentração a de 125 µg/mL apresentou redução significativa nos parâmetros de infecção, com diminuição do número de amastigotas em 200 células e porcentagem de células infectadas de 80,73% e 40,75%, respectivamente, e redução média de amastigotas por célula de 9,74 para 2,74, em contraste ao que foi observado no presente estudo com a solução extrativa aquosa de *C. longa*. A curcumina é um dos principais curcuminóides ativos. AQEELE et al (2021) demonstrou que a curcumina contra amastigotas de *L. major* apresenta diferenças significativas entre o controle negativo e 10 µM, 20 µM e 40 µM de curcumina após 24 horas tratamento, com valores de CI_{50} 11,77 µM.

AL-MUSAYEIB et al. (2012) avaliou a atividade leishmanicida de extratos metanólicos de diversas plantas contra amastigotas de *L. chagasi*, entre elas, *Z. officinale*. Nesse trabalho demonstrou-se que o extrato metanólico de gengibre não apresentou atividade leishmanicida. Esses dados assemelham-se aos encontrados no presente trabalho, uma vez que a solução extrativa aquosa do gengibre não apresentou atividade contra as espécies testadas. Além do mais, MONZOTE et al. (2019) mostra em sua pesquisa que o óleo essencial da espécie *Z. officinale* não apresenta notória atividade contra promastigotas de *L. amazonensis*, apesar de apresentar CI_{50} igual a $39.9 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$.

PEREZ et al.(2014) avaliou a atividade leishmanicida de lipossomas fotodinâmicos feita de fosfatidilcolina de soja, colato de sódio, arqueolipídeos polares totais (TPAs) extraídos da archaea hiperhalófila *Halorubrum tebenquichense* e do fotossensibilizador de zinco ftalocianina (ZnPcAL) comparados com lipossomas fotodinâmicos ultradeformáveis TPAs (ZnPcUDLs). Nesse estudo foi observado que quando inoculados ZnPcUDLs e ZnPcALs contra *L. braziliensis*, as formas amastigotas foram eliminadas dos macrófagos da linhagem J774.A1 sem interferir na viabilidade das células hospedeiras. Assim, cabe ressaltar que é

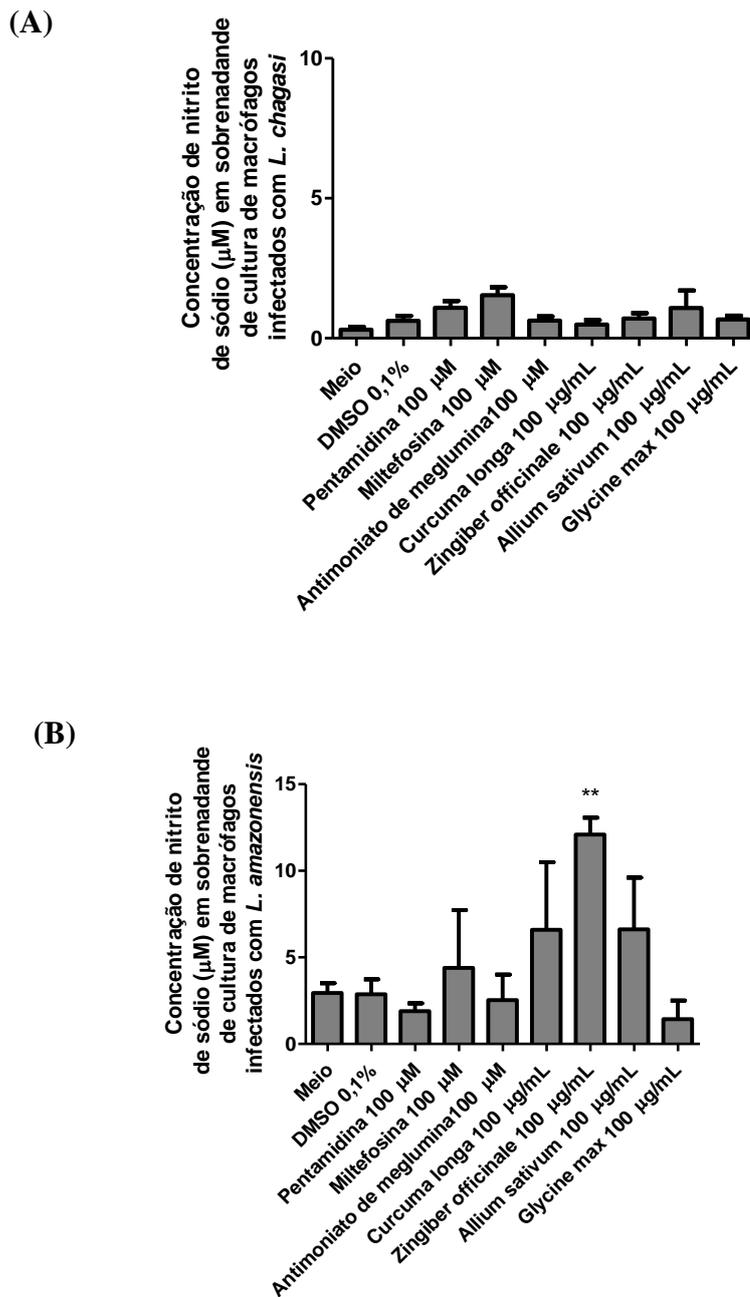
necessário mais estudos sobre a atividade leishmanicida da planta *Glycine max* pois a literatura sobre esse tema é limitada. Além disso, o efeito observado no referido estudo pode não ser decorrendo do lipossoma diretamente, mas a ação deste seria de carreador das partículas de zinco.

Além disso, é notório que outros estudos com as plantas da lista RENISUS utilizadas nesse trabalho apontam uma atividade leishmanicida, sendo para as mesmas espécies ou para espécies diferentes do trabalho. Depreende-se que as plantas não apresentaram atividade leishmanicida devido à pouca solubilidade no solvente utilizado, nesse caso, a água. Os principais componentes bioativos dessas plantas são hidrofóbicos e apresentam baixa biodisponibilidade (CARVALHO et al., 2015; NAKAMOTO et al., 2020; KOU et al., 2018). Assim, é possível que no momento da infusão esses compostos não foram extraídos de forma satisfatória, embora essa seja uma forma comum de extração utilizada pela a população.

Após a internalização do parasito no hospedeiro através do repasto sanguíneo do vetor, inicia-se o controle imunológico. Esse controle está relacionado com as vias de ativação dos macrófagos que são divididas em via clássica e alternativa. A via clássica é caracterizada por ativar os macrófagos por meio de uma resposta TH1 que induz a produção de citocinas, interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) estimulando, assim, a produção do óxido nítrico sintase, enzima que usa a catálise de L-arginina para a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018; LIU; UZONNA, 2012). Desse modo, sabendo da importância do óxido nítrico para a eliminação intracelular da *Leishmania* e das suas características microbicida, foi avaliado o efeito das plantas testadas e dos fármacos-padrões frente à produção de óxido nítrico. A análise foi realizada a partir dos sobrenadantes das culturas dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Na figura 24, é possível observar que nenhuma das espécies vegetais testadas induziram o aumento significativo da produção de óxido nítrico nas culturas de macrófagos infectados com *L. chagasi*.

Figura 24. Efeito de *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Glycine max*, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina no aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania chagasi* (A) e *Leishmania amazonensis* (B).



Entretanto, *Z. officinale* aumentou significativamente as concentrações de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Esse resultado assemelha-se aos encontrados no trabalho de DUARTE et al., 2016 no qual o extrato aquoso de gengibre (50µg/mL) e a fração F10 (5µg/mL) apresentou um aumento de óxido nítrico de 5,4µM e 13,6 µM, respectivamente, nas culturas de macrófagos infectados com a mesma espécie de *Leishmania* spp. Apesar do aumento de óxido nítrico, não houve a morte do parasito. O parasito *Leishmania* spp. possui alguns mecanismos antioxidantes de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, como é o caso da expressão de tripanotona ditiol para manter sua homeostase redox. As enzimas trippedoxina peroxidase (TXNPx) agem como homodímeros para desintoxicar H₂O₂, hidroperóxidos orgânicos, ONOO₂ e NO. Assim, foi realizado um estudo que apontou que as amastigotas de *L. amazonensis* são mais resistentes à morte e crescem intracelularmente apesar do aumento de óxido nítrico. Além disso, as amastigotas apresentaram um aumento da expressão de uma isoforma TXNPx que é uma proteína de 190 aminoácidos similar à de *L. chagasi* (HERNARD et al., 2014).

GHARAVI et al. (2011) mostrou por meio da técnica de RT-PCR que o extrato aquoso de alho leva à expressão dos genes IFN γ e iNOS nas células da linhagem J774.A1 infectada com *L. major*. Ademais, outro estudo dos mesmos autores com essa espécie demonstrou que o extrato aquoso aumentou significativamente o nível de IL-12 em células infectadas com o parasito, citocina que pode estimular a produção de NO se houver efeito autócrino (GHARAVI et al, 2011)

Os componentes da *C. longa* apresentam efeitos inibitórios de óxido nítrico. YUAN et al. (2018) mostrou em seu trabalho que os compostos 6 e 7 de *C. longa* diarilheptanoides e difenil alcanos, respectivamente, apresentaram atividade inibitória significativa sobre a produção de NO em macrófagos RAW 264.7. KAWASAKI et al. (2018) também avaliou a inibição de produção de óxido nítrico de compostos do extrato aquoso de *C. longa* em macrófagos estimulado por LPS. Assim, conclui-se que os compostos 1,4,7 e 8 inibiram a produção de óxido nítrico e a prostaglandina E2.

Em seu trabalho, YUSOF et al. (2019) avaliou a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de tempê de soja enriquecido com nutriente fermentado anaeróbico (NESTE). Foi

observado que no ensaio *in vitro*, 5 mg / mL NESTE foi capaz de inibir $25,50 \pm 2,20\%$, $35,88 \pm 3,20\%$ e $28,50 \pm 3,50\%$ da produção de NO, IL-1 β e TNF- α em células RAW 264,7 tratadas com LPS além de não apresentar efeito citotóxico para as células.

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram utilizadas quatro espécies vegetais que estão incluídas na lista RENISUS. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que as soluções extrativas aquosas das plantas *Allium sativum*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale* e *Glycine max* não induziram citotoxicidade para os macrófagos até a máxima concentração testada (100µg/mL). Ademais, as soluções extrativas aquosas das plantas não apresentam atividade leishmanicida para as duas espécies de parasito utilizados nos experimentos. Entretanto, a espécie *Zingiber officinale* induziu o aumento significativo de óxido nítrico nas culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Por conseguinte, é válido ressaltar que o estudo de plantas medicinais na busca de substâncias ativas contra o parasito se faz necessário, principalmente em formas de fácil administração, como é o caso dessa pesquisa, na qual foi testado a soluções extrativas aquosas (chá).

REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, B.O.; GBENGA, B. L.; YEWANDE, F. Morphology, functional and pasting properties of ginger starches prepared by four different drying methods. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 4, n.12, p. 1439-1450, 2014.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALAM, Md Khorshed; HOQ, Md Obydul; UDDIN, Md Shahab. Medicinal plant *Allium sativum*—A Review. **Journal of Medicinal Plant Studies**, v. 4, n. 6, p. 72-79, 2016.
- Alemayehu ,B; Alemayehu, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Sci J**. v. 11, No.4. p.1, 2017
- ALEEM, M. et al. Botany, phytochemistry and antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*): A review. **Int J Herb Med**, v. 8, n. 6, p. 36-49, 2020.
- AL-MUSAYEIB, Nawal M. et al. Study of the in vitro antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of medicinal plants from Saudi Arabia. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 11379-11390, 2012.
- ANDRADE NETO, V. V. et al. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. **Frontiers in Bioscience, Landmark**, v. 23, p. 967-996, 2018.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- AQEELE, G. et al. Evaluation of curcumin and CM11 peptide alone and in combination against amastigote form of Iranian strain of *L. major* (MRHO/IR75/ER) in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 229, p. 108151, 2021.
- ARBABI, M. et al. Ginger (*Zingiber officinale*) induces apoptosis in *Trichomonas vaginalis* in vitro. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 14, n. 11, p. 691, 2016.
- ARONSON, N. E.; JOYA, C. A. Cutaneous leishmaniasis: Updates in diagnosis and management. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 101-117, 2019.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.
- BAGAD, A. S. et al. Comparative evaluation of anti-inflammatory activity of curcuminoids, turmerones, and aqueous extract of *Curcuma longa*. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2013, 2013.
- BASTOS, Thiago; MADRID, Darling Mélyny; LINHARES, Guido. Aspectos gerais da leishmaniose visceral. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, 2015.
- BIRUKSEW, A. et al. *Zingiber Officinale* Roscoe and *Echinops Kebericho* Mesfin showed antiplasmodial activities against *Plasmodium berghei* in a dosedependent manner in Ethiopia. **Ethiopian journal of health sciences**, v. 28, n. 5, p. 655-664, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CARVALHO, Deivis de Moraes et al. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. **Food Science and Technology**, v. 35, p. 115-119, 2015.

CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, Chao-Wu. Soybean bioactive peptides and their functional properties. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1211, 2018.

CHAKOTIYA, A. S. et al. Zingiber officinale: Its antibacterial activity on Pseudomonas aeruginosa and mode of action evaluated by flow cytometry. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 254-260, 2017.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7-S16, 2007.

CARNEIRO, J. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. Leishmanioses: uma abordagem sobre as imunoglobulinas e as citocinas envolvidas na infecção e na vacinação. **Acta Veterinaria Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 193-204, 2013.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 12, p. 609-625, 2007.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

DAI, J. et al. Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenzal pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF-κB pathways. **International immunopharmacology**, v. 54, p. 177-187, 2018.

DA SILVA VIEIRA, Tamara et al. Leishmania braziliensis: strain-specific modulation of phagosome maturation. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 319, 2019.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 103, n. 7, p. 653-660, 2009.

DORLO, T. PC et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DOSOKY, N. S.; SETZER, W. N. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Curcuma* species. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1196, 2018.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

DOS SANTOS MEIRA, Camila; GEDAMU, Lashitew. Protective or detrimental? understanding the role of host immunity in leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 695, 2019.

DUARTE, M. C. et al. Antileishmanial activity and mechanism of action from a purified fraction of *Zingiber officinalis* Roscoe against *Leishmania amazonensis*. **Experimental parasitology**, v. 166, p. 21-28, 2016.

DYAB, A. K. et al. Anti-giardial therapeutic potential of dichloromethane extracts of *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* in vitro and in vivo. **Parasitology research**, v. 115, n. 7, p. 2637-2645, 2016.

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B. *Zingiber officinale* Roscoe: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, p.27-32, 2004.

EL-SABER BATIHA, G. et al. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 872, 2020.

ENGELS, D.; ZHOU, XN. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2020.

FARIA, T. R. B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* mouthwash on patients with fixed orthodontic appliances. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 159, n. 1, p. 21-29, 2021.

FARMACOPEIA BRASILEIRA Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa 6^a EDIÇÃO.

FOROUTAN-RAD, M.; TAPPEH, K. H.; KHADEM VATAN, S. Antileishmanial and Immunomodulatory Activity of *Allium sativum* (Garlic) A Review. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 22, n. 1, p. 141-155, 2017.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

FU, YW et al. Efficacy and antiparasitic mechanism of 10-gingerol isolated from ginger *Zingiber officinale* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. **Veterinary parasitology**, v. 265, p. 74-84, 2019.

FUFA, B. K. Anti-bacterial and anti-fungal properties of garlic extract (*Allium sativum*): A review. **Microbiology Research Journal International**, v.28, n.3, p. 1-5, 2019.

GABRIEL, Á. et al. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p.1-16, 2019

GAHERWAL, S. et al. Anti-bacterial activities of *Allium sativum* against *Escherichia coli*, *Salmonella* Ser. Typhi and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Microbiological Research**, v. 5, n. 1, p. 19-22, 2014.

GHARAVI, M. J. et al. The effect of garlic extract on expression of INF γ and inos genes in macrophages infected with *Leishmania major*. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 6, n. 3, p. 74, 2011.

GHARAVI, M. J. et al. The effect of aqueous garlic extract on interleukin-12 and 10 levels in *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) infected macrophages. **Iranian Journal of Public Health**, v. 40, n. 4, p. 105, 2011.

GEORGIADOU, S. P., Makaritsis, K.P., Dalekos, G.N. Leishmaniasis revised: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal Of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 43-50, 2015

GHODSIAN, S. et al. Recent researches in effective antileishmanial herbal compounds: narrative review. **Parasitology Research**, v. 119, n. 1, p. 1-18, 2020.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 25-40, 2018.

Glycine max (L.) Merr. observado em Estados Unidos da América por emmgracej (Licenciado sob <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/occurrence/2634327549> Acessado em : outubro de 2021

Glycine max (L.) Merr. observado em Uruguai por Santiago (Licenciado sob <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/occurrence/3113582418> Acessado em: Outubro de 2021

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.

GUANG, C. et al. Biological functionality of soyasaponins and soyasapogenols. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8247-8255, 2014.

HADDAD, M.; SAUVAIN, M.; DEHARO, E. Curcuma as a parasitocidal agent: a review. **Planta medica**, v. 77, n. 06, p. 672-678, 2011.

HANDLER, M.Z., PATEL, P. A., KAPILA, R., AL-QUBATI, R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology and management. **Journal American Academy of Dermatology**. V. 73, No. 6, p. 911-926, 2015

HENARD, Calvin A. et al. *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a trypanothione peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and fosters parasite virulence. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3000, 2014.

ILES, K. E.; FORMAN, H. J. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunologic research**, v. 26, n. 1, p. 95-105, 2002.

JALALUDDIN, M. et al. Antimicrobial activity of *Curcuma longa* L. extract on periodontal pathogens. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 11, n. Suppl 2, p. S203- S207, 2019.

JUNIOR, Manoel Sebastião da Costa Lima et al. Isolation and molecular characterization of *Leishmania infantum* in urine from patients with visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta tropica**, v. 178, p. 248-251, 2018.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

- KAWASAKI, Kengo et al. Inhibitory effect of the compounds from the water extract of *Curcuma longa* on the production of PGE2 and NO in a macrophage cell line stimulated by LPS. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 82, n. 12, p. 2109-2117, 2018.
- KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today?. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 177- 185, 2010
- KEVRIC, I; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world Leishmania infections: a practical review. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.
- KIP, A. E. et al. Clinical pharmacokinetics of systemically administered antileishmanial drugs. **Clinical pharmacokinetics**, v. 57, n. 2, p. 151-176, 2018.
- KIYAMA, R. Nutritional implications of ginger: chemistry, biological activities and signaling pathways. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, p. 108486, 2020.
- KOCAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889-2895, 2017.
- KOU, Xingran et al. Simultaneous extraction of hydrophobic and hydrophilic bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food chemistry**, v. 257, p. 223-229, 2018.
- KRSTIN, S. et al. Anti-Parasitic Activities of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Trypanosoma b. brucei* and *Leishmania tarentolae*. **Medicines**, v. 5, n. 2, p. 37, 2018.
- KLOESCH, Burkhard et al. In vitro study of a liposomal curcumin formulation (Lipocurc™): Toxicity and biological activity in synovial fibroblasts and macrophages. **in vivo**, v. 30, n. 4, p. 413-419, 2016.
- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.
- MACHADO, P. RL; PENNA, G.. Miltefosine and cutaneous leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 25, n. 2, p. 141-144, 2012.
- MAHMOUDVAND, H. et al. Evaluation of the antileishmanial and cytotoxic effects of various extracts of garlic (*Allium sativum*) on *Leishmania tropica*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 2, p. 423-426, 2014.
- MARAN, Naiara et al. Host resistance to visceral leishmaniasis: prevalence and prevention. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 14, n. 4, p. 435-442, 2016. MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and veterinary entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2013.

- MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.
- MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 2017.
- MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. In: **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**. Elsevier Masson, 2019. p. 232-246.
- MONTSERRAT-DE LA PAZ, S. et al. Ginger rhizome enhances the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of paracetamol in an experimental mouse model of fibromyalgia. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 1093-1101, 2018.
- MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: a review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, n. 1, 2009.
- MONZOTE, L. et al. In-vitro evaluation of 52 commercially-available essential oils against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1248, 2019.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983
- MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.
- MÜGGE, C.; HAUSTEIN, UF.; NENOFF, P. Causative agents of onychomycosis—a retrospective study. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 4, n. 3, p. 218-228, 2006.
- MUKHOPADHYAY, D. et al. Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 2, p. 65-74, 2014.
- MUSTAFA, I. et al. Comparison of phytochemicals, antioxidant and anti-inflammatory properties of sun-, oven- and freeze-dried ginger extracts. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 456, 2019.
- NAKAMOTO, Masato et al. Antimicrobial properties of hydrophobic compounds in garlic: Allicin, vinylthiin, ajoene and diallyl polysulfides. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 19, n. 2, p. 1550-1553, 2020.
- NEYESTANI, Zohreh et al. Review of Anti-Bacterial Activities of Curcumin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 29, n. 5, 2019.
- NIKKHAH BODAGH, Mehrnaz; MALEKI, Iradj; HEKMATDOOST, Azita. Ginger in gastrointestinal disorders: A systematic review of clinical trials. **Food science & nutrition**, v. 7, n. 1, p. 96-108, 2019.
- NUNES, M.P.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MONTEIRO, B.C. et al. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Micro. Infect.**, v. 7, n. 1, p. 78-85, 2005
- NO, Joo Hwan. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta tropica**, v. 155, p. 113-123, 2016.
- NYANDWARO, K. et al. Evaluating antiplasmodial and antimalarial activities of soybean (*Glycine max*) seed extracts on *P. falciparum* parasite cultures and *P. berghei*-infected mice. **Journal of pathogens**, v. 2020, 2020.

- OLIVIER, Martin et al. Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1377-1389, 2012
- Organização Pan-Americana de Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington, D. C. : OPAS, 2019
- Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.
- Orrell T (2020). NMNH Extant Specimen Records. Version 1.35. National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/hnhrg3> accessed via GBIF.org on 2020-09-11. <https://www.gbif.org/occurrence/1322171541>
- Pace D, Leishmaniasis, *J Infect* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
- PALUMBO, E. Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 147-150, 2010.
- PAREI, F.; IBRAHIM, R.; NAWAS, T. Antibacterial activity of curcumin against Lebanese clinical isolates of Staphylococcus aureus. **MOJ Toxicol**, v. 4, n. 2, p. 81-83, 2018.
- PÂRVU, M. et al. Allium sativum extract chemical composition, antioxidant activity and antifungal effect against Meyerozyma guilliermondii and Rhodotorula mucilaginosa causing onychomycosis. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3958, 2019.
- PATIL, R. S. et al. Synthetic and natural products against leishmaniasis: A review. **World Journal of Public Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 7-22, 2012.
- PEREZ, Ana Paula et al. Enhanced photodynamic leishmanicidal activity of hydrophobic zinc phthalocyanine within archaeolipids containing liposomes. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 3335, 2014.
- PETROVSKA, Biljana Bauer. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
- PODINOVSKAIA, Maria; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.
- RAHMAN, Mohammad Shafiur. Allicin and other functional active components in garlic: health benefits and bioavailability. **International Journal of Food Properties**, v. 10, n. 2, p. 245-268, 2007.
- RAI, M. et al. Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 18, n. 4, p. 367-379, 2020.
- RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!. **International immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2018.
- SABIU, Saheed et al. The Genus *Allium* (Amaryllidaceae: Allooideae): Features, Phytoconstituents, and Mechanisms of Antidiabetic Potential of *Allium cepa* and *Allium sativum*. In: **Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes**. Academic Press, 2019. p. 137-154.
- SAKKAS, H.; GARTZONIKA, C.; LEVIDIOTOU, S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Journal of vector borne diseases**, v. 53, n. 1, p. 8, 2016.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.
- SEDIYAMA, T. (Org.). *Tecnologias de produção e usos da soja*. Londrina, PR: Mecenias, v. 2, 1.314 p, 2009.
- S FREITAS, Cyntia et al. Recovery of antimicrobials and bioaccessible isoflavones and phenolics from soybean (*Glycine max*) meal by aqueous extraction. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 74, 2019.
- SHANG, Ao et al. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). **Foods**, v. 8, n. 7, p. 246, 2019.
- SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171-179, 2014.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. d. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.
- SINGH, O. P. et al. Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective. **Infectious diseases of poverty**, v. 5, n. 1, p. 19, 2016.
- SIRIRUGSA, P.; LARSEN, K.; MAKNOI, C. The genus *Curcuma* L.(Zingiberaceae): distribution and classification with reference to species diversity in Thailand. **Gardens' Bulletin Singapore**, v. 59, p. 203-220, 2007.
- ŠKROVÁNKOVÁ, S.; MIŠURCOVÁ, L.; MACHŮ, L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. In: **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, v. 67, p. 75-139, 2012.
- SRIVIDYA, G. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. **Parasitology research**, v. 110, n. 3, p. 1065-1078, 2012.
- STONE, N. RH et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, n. 4, p. 485-500, 2016.
- SUETH-SANTIAGO, Vitor et al. The effectiveness of natural diarylheptanoids against *Trypanosoma cruzi*: cytotoxicity, ultrastructural alterations and molecular modeling studies. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162926, 2016.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

SUNDAR, S.; SINGH, A.. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481-489, 2018.

TELES, A. M. et al. Cinnamomum zeylanicum, Origanum vulgare, and Curcuma longa essential oils: chemical composition, antimicrobial and antileishmanial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage polarization in leishmaniasis: broadening horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2529, 2018.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.

ULIANA, S. RB; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

USBRG, US Botany Research Greenhouses, Department of Botany, NMNH, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/species/2757624> Acesso em : Agosto 2021

VALLIYODAN, B. et al. Landscape of genomic diversity and trait discovery in soybean. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VARINSKA, L. et al. Soy and breast cancer: focus on angiogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 5, p. 11728-11749, 2015.

WABWOBA, Byrum W. et al. Experimental chemotherapy with Allium sativum (Liliaceae) methanolic extract in rodents infected with Leishmania major and Leishmania donovani. **J Vector Borne Dis**, v. 47, n. 3, p. 160-167, 2010.

WESTERBERG, D. P.; VOYACK, M. J. Onychomycosis: current trends in diagnosis and treatment. **American family physician**, v. 88, n. 11, p. 762-770, 2013.

WHO. Disponível em: < <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em 13 de abril de 2020

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010**. World Health Organization, 2010.

World Health Organization. Neglected Tropical Diseases.2020. Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases> . Acesso em 04/02/2021 de janeiro de 2021

YUSOF, H. M. et al. Anti-inflammatory, analgesic and acute toxicity effects of fermented soybean. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2019.

YUAN, Ting et al. Chemical constituents from Curcuma longa L. and their inhibitory effects of nitric oxide production. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1887-1892, 2018.

ZACARIAS, D. A. et al. Causes and consequences of higher Leishmania infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 6, p. 679-687, 2017.

Zingiber officinale Roscoe observado em Bolívia por Vincent A. Vos (Licenciado sob <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/occurrence/3343807439>. Acesso: Outubro de 2021