

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – ICF
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ALISSON ALCANTARA ALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS
PRESENTES NA LISTA DO RENISUS**

MACEIÓ
2020

ALISSON ALCANTARA ALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS
PRESENTES NA LISTA DO RENISUS**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, apresentado a Banca Examinadora para avaliação final.

Orientadora: Aline Cavalcanti De Queiroz

MACEIÓ

2020

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

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

A474a Alves, Alisson Alcantara.
Avaliação de atividade leishmanicida de espécies vegetais presentes na lista no
RENISUS / Alisson Alcantara Alves. – 2021.
58 f. : il. color.

Orientadora: Aline Cavalcanti de Queiroz.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 48-58.

1. Atividade leishmanicida. 2. Leishmaniose. 3. Relação Nacional de Plantas
Medicinais de Interesse ao SUS. I. Título.

CDU: 616.993.161

Este trabalho dedico a minha avó Maria Nazarene Alves (*In memoriam*), pela dedicação, carinho e ensinamento passados aos quatros netos que ela criou.

AGRADECIMENTOS

Gratidão pelo cara que sabe de todas as coisas. Deus, obrigado porque até aqui tua mão me guiou, me sustentou, que mesmo em meio às lutas, desafios, se cheguei até aqui e venci mais uma batalha foi porque o teu amor infinito tem sido meu sustento.

À minha avó, Maria Nazarene Alves (*in memoriam*), por todo ensinamento, carinho e amor, onde no céu intercede por mim, e sei que estará feliz com mais uma conquista, te amo por toda eternidade minha “veia”. À minha doce mãe, Alek Sandra Alves Santos por todos os apoios, ensinamentos, afeto, preocupação e incentivando a nunca desistir dos meus sonhos. Ao meu pai Agilson Alcantara Davi, pela ajuda financeira. A eles serei eternamente grato, por todas às vezes que fizeram algo pensando sempre no meu melhor, essa conquista não é só minha mas deles também.

À toda minha família que sempre estão presentes na minha vida, pelos conselhos e admiração que tenho em cada um de vocês, em especial às minha adoráveis e guerreiras tias: Adriana, Ana Paula e Ana Sandra, ao meu tio Francisco, primos: Hortência, Diego, Kawhan, Gabriel, além dos meus irmãos, Abraão Filho, Naylla Rykelly e minha madrinha Josilene, o amor de vocês faz toda a diferença para que eu não desista.

Àos meus amigos de Santana do Ipanema; Thauany, Taynan, Elen, Thays, Natane, Gildimar, Josane, Josineide, Janeide, Lucas, Edisiane, Lavinia e Eloise . Aos que tive a honra de conhecer durante a graduação; Nyara, Layla, Fransica, Hilda, Lily, Ayonara, Nayle, Michele, Geo, Gabi, Pedro e Deisiane. E em especial, aos meus melhores amigos que deram seus braços no momento que mais precisei de ajuda; Welma, Fabiana, Janaina e Diego. Gratidão por estarem comigo nessa cidade tão imprevisível e devastadora.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Aline Cavalcanti De Queiroz, por todas as palavras, paciência, ensinamentos e oportunidades. Que junto com a Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira, serviram de guias para todo o meu aprendizado e méritos acadêmicos, que Deus proteja vocês, gratidão.

Por último agradeço àos melhores cientistas da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFI); Amanda, Flávio, Anderson, Raquel, Karol, Morgana, Kaycke, Mariana, Zeca, Max, Alyne, Rafael, Camila, Suellen, Marcio, Diogo, Shakira e Izabele, por toda experiência e companheirismo que tive ao logo de quatro anos.

Muito Obrigado!

“Lute e empurre fortemente para o que
você acredita, você é muito mais forte do
que pensa.”

(Lady Gaga)

Resumo

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Hoje no mercado há poucos fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose, sendo fármacos que apresentam inúmeros efeitos adversos e custos elevados. O presente trabalho visou avaliar os efeitos leishmanicida de *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Syzygium jambolanum*, *Ruta graveolens*, *Anacardium occidentale*, *Aloe vera* e *Psidium guajava*, disponíveis na lista de plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS). Foi realizada a avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos da linhagem J774.A1, através do ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5- dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio), bem como a avaliação da atividade leishmanicida e produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por amastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*. Observou-se que nenhuma das plantas testada apresentou efeito citotóxico para macrófagos de linhagem J774.A1 ou foi ativa contra amastigotas de *Leishmania chagasi* até a concentração máxima utilizada (100 µg/mL), apesar de *Anacardium occidentale* e *Aloe vera* induzirem aumento de óxido nítrico em cultura de macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*. Na avaliação da atividade leishmanicida contra amastigotas de *Leishmania amazonensis*, a espécie *Aloe vera* apresentou atividade com efeito máximo de 40,4%, além de *Phyllanthus niruri*, *Mentha peperita*, *Matricaria racutita* *Psidium guajava*, *Ruta graveolens* e *Aloe vera* induzirem o aumento dos níveis de óxido nítrico pelos macrófagos. Em suma, sete plantas apresentam efeito imunomodulador em macrófagos infectados com o parasito, além do estudo de *Aloe vera* se apresentar útil para o desenvolvimento de novos fármacos a base de plantas medicinais.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida, Leishmaniose, Rensisus

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Today, there are few drugs available for the treatment of leishmaniasis, with drugs that have numerous adverse effects and high costs. The present work aimed to evaluate the leishmanicidal effects of *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Syzygium jambolanum*, *Ruta graveolens*, *Anacardium occidentale*, *Aloe vera* and *Psidium guajava*, available in the list of medicinal plants of SUS's interest (RENISUS). Thus, cytotoxicity was evaluated against macrophages of the J774.A1 strain, using the MTT (3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium) colorimetric assay, as well as the evaluation of leishmanicidal activity and nitric oxide production in macrophages infected by *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* amastigotes. It was observed that none of the tested plants showed a cytotoxic effect for macrophages of lineage J774.A1 or was active against *Leishmania chagasi* amastigotes up to the maximum concentration used (100 µg / mL), although *Anacardium occidentale* and *Aloe vera* induce an increase in nitric oxide in culture of macrophages infected with *Leishmania chagasi*. In the evaluation of leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* amastigotes, the species *Aloe vera* showed activity with a maximum effect of 40.4%, in addition to *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria racutita* *Psidium guajava*, *Ruta graveolens* and *Aloe vera* inducing the increase in nitric oxide levels by macrophages. In short, seven plants have an immunomodulatory effect on macrophages infected with the parasite, in addition to the study of *Aloe vera* being useful for the development of new drugs based on medicinal plants.

Keywords: Leishmanicidal activity, Leishmaniasis, Rensisus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo em repasto sanguíneo	16
Figura 2 – Formas evolutivas:(A) promastigotas (B) amastigotas de <i>Leishmania spp</i>	17
Figura 3 – Ciclo Biológico da Leishmaniose	18
Figura 4 – Formas clínicas da LTA.....	22
Figura 5 – Forma clínica da leishmaniose visceral (hepatoesplenomegalia)	23
Figura 6 – Distribuição da Leishmaniose Cutânea no Velho e Novo Mundo (2018).....	24
Figura 7 – Distribuição da Leishmaniose Visceral no Velho e Novo Mundo (2018).....	24
Figura 8 – Ensaio de redução do MTT	33
Figura 9 – Ensaio de viabilidade sobre formas amastigotas.....	36
Figura 10 – Ensaio de dosagem do óxido nítrico	37
Figura 11 – Efeito das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS pentamidina, antimoníato de meglumina e miltefosina no aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	44
Figura 12 – Efeito das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS pentamidina, antimoníato de meglumina e miltefosina no aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito citotóxico das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina em macrófagos da linhagem J774.A1..... 38

Tabela 2 – Efeito leishmanicida das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina contra amastigotas de *Leishmania chagasi*..... 40

Tabela 3 – Efeito leishmanicida das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina contra amastigotas de *Leishmania amazonensis*..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI50 - Concentração Inibitória de 50%

DMEM – Do inglês Dulbecco's Modified Eagles's Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LC - Leishmaniose cutânea

LCD- Leishmaniose Cutânea Difusa

LM - Leishmaniose Mucocutânea

LV – Leishmaniose Visceral

MTT - Brometo de 3-[4,5-Dimetil-Tiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazólio

MHC - Major Histocompatibility Complex

NETS - Neutrophil Extracellular Traps

OMS – Organização Mundial de Saúde

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium

PBS - Phosphate Buffered Saline

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Vetores e agente etiológico da leishmaniose	16
2.2	Ciclo biológico da leishmaniose.....	18
2.3	Resposta imunológica.....	19
2.3.1	Vias de metabolismo da arginina	20
2.4	Formas clínicas.....	21
2.4.1	Leishmaniose tegumentar.....	21
2.4.2	Leishmaniose visceral	22
2.5	Epidemiologia	23
2.6	Diagnóstico	25
2.7	Farmacoterapia	26
2.8	Plantas Medicinais Presentes na lista do RENISUS	28
2.8.1	<i>Schinus terebinthifolius</i>	29
2.8.2	<i>Phyllanthus niruri</i>	29
2.8.3	<i>Mentha piperita</i>	30
2.8.4	<i>Matricaria recutita</i>	30
2.8.5	<i>Maytenus ilicifolia</i>	30
2.8.6	<i>Syzygium jambolanum</i>	31
2.8.7	<i>Ruta graveolens</i>	31
2.8.8	<i>Anacardium occidentale</i>	31
2.8.9	<i>Aloe vera</i>	32
2.8.10	<i>Psidium guajava</i>	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33

SUMÁRIO

4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Obtenção dos extratos aquosos	34
4.2	Fármacos e Reagentes	34
4.3	Manutenção de linhagem macrófagos	34
4.4	Determinação da viabilidade celular.....	35
4.5	Avaliação da carga parasitária in vitro	35
4.6	Dosagem do óxido nítrico.....	36
4.6	Análise Estatística	37
	5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
	6 CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*, sendo caracterizada como uma antroponose, que ocorre atualmente em 102 países, apresenta uma variedade de manifestações clínicas que dependem tanto da espécie infectante quanto de fatores do hospedeiro, os quais determinam a resposta imunológica ao agente agressor, podendo assumir a forma tegumentar e a forma visceral (OMS, 2019).

Esses parasitos determinam doenças do sistema fagocítico mononuclear que apresentam características clínicas diferentes: leishmaniose visceral (LV), que atinge os órgãos internos, leishmaniose tegumentar (LT), que se subdivide em: leishmaniose cutânea (LC), que atinge a pele; e a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), gerando feridas nas mucosas e na pele (ALVES et al., 2013).

No Brasil existem as três formas: a LV, a mais letal das leishmanioses, tem caráter sistêmico e afeta principalmente órgãos como fígado, baço e medula óssea, se não tratada leva a óbito em 90% dos casos, e atinge principalmente crianças menores de 10 anos. A LC, mais comum, é caracterizada pelo aparecimento de lesões no local da infecção, as quais são indolores, com bordas bem definidas, base eritematosa e fundo avermelhado. Por fim, a LCM causa lesões destrutivas localizadas na mucosa, em geral nas vias aéreas superiores (MARCONDES,2013; BRASIL, 2013; OMS 2010).

Nas Américas, 96% dos casos de leishmaniose visceral são reportados no Brasil onde houve aumento de mortes desde 2012, alcançando em 2016 uma taxa de letalidade de 7,9% considerada a mais elevada quando comparada a outros continentes. A proporção de casos de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos também alcançou em 2016 seu maior valor (15,5%) e alguns países registraram mais de 40% da população afetada neste grupo etário (OPAS/OMS,2019).

O antimoniato de metilglucamina (comercializado no Brasil como glucantime®) é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como a eliminação do parasito. Outra droga leishmanicida ainda mais potente disponível para comercialização é a anfotericina B, que atua contra as formas promastigotas e amastigotas do parasito. Porém esses

farmácos possuem alta taxa de toxicidade, além de induzir sintomas que prejudicam o portador, desenvolvendo resistência (QUEIRÃO et al, 2019; BERMUDI ,2017)

Para o desenvolvimento de novos fármacos com intuito de minimizar esses efeitos, é importante realizar experimentos usando produtos naturais devido a essa grande biodiversidade e também à grande tradição do uso de plantas medicinais com efeitos imunomoduladores já comprovados (DE CARVALHO,2015).

A partir desse pressuposto, o seguinte trabalho visou avaliar a toxicidade e ação leishmanicida das espécies utilizadas; *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha peperita*, *Matricaria racutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Syzygium jambolanum*, *Ruta graveolens*, *Anacardium occidentale*, *Aloe vera* e *Psidium guajava*, as quais estão presentes na lista do RENISUS, uma vez que se faz necessário a busca por novos métodos de tratamento, a fim de diminuir os agravos gerados pela farmacoterapia atual.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vetores e agente etiológico da leishmaniose

As leishmanioses são doenças negligenciadas, causadas por um protozoário da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*. São antropozoonoses e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (OMS,2019).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam ciclo de vida digenético, alternando entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Estes últimos são representados por flebotomíneos fêmeas da ordem Diptera, classe Insecta, família Psychodidae e gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* no velho e novo mundo, respectivamente. Das mais de 800 espécies de flebotomíneos descritas, cerca de 464 são encontradas no novo mundo e 375 no velho mundo (AKHOUNDI et al., 2016).

Os flebotomíneos são popularmente conhecidos como: mosquito-palha, flebótomo cangalhinha, arrepiado, tatuíra, assadura, asa-da-palha, birigui, e orelha-de-veado (**Figura 1**). Estes dípteros possuem o corpo revestido por pêlos e são de coloração clara, medindo de 1 a 3 mm de comprimento. Possuem uma grande distribuição nos climas quentes e temperados, apresentam maior atividade no entardecer e início da noite, por causa disso, a captura desses vetores é feita através de armadilhas luminosas. Cabe ressaltar que não ocorre transmissão do parasito de hospedeiro vertebrado para hospedeiro vertebrado, isso significa que o flebotomíneo é essencial para o ciclo da doença e por isso é considerado um vetor.(FIOCRUZ,2019). (AKHOUNDI et al., 2016).

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo em repasto sanguíneo



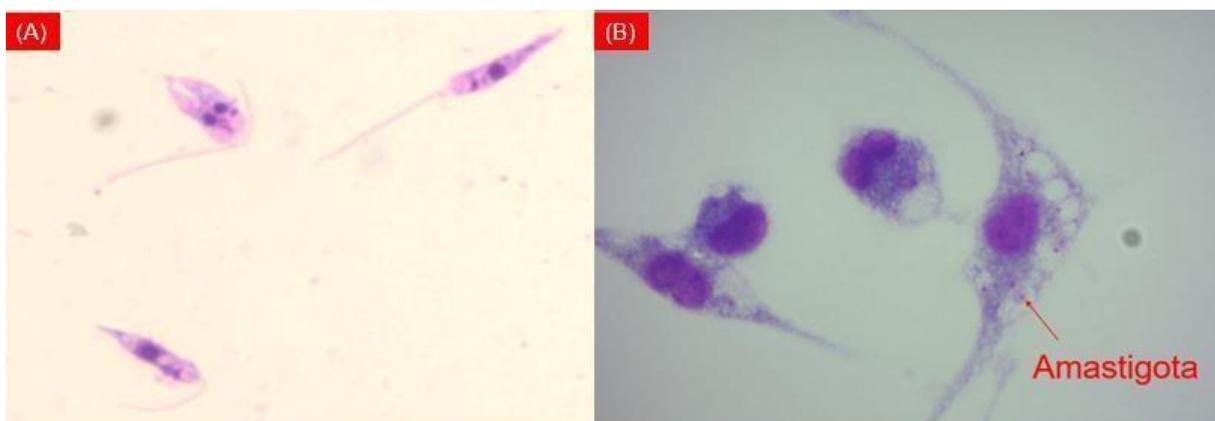
Fonte: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2020

O flebotomíneo difere de outros vetores que têm parte do ciclo de vida na água, como é o caso do *Aedes aegypti*. Os flebotomíneos se proliferam em solo úmido, mas não molhados, ou em detritos ricos de matéria orgânica em decomposição e com pouca luminosidade. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética, mas apenas as fêmeas se alimentam de sangue para o desenvolvimento dos seus ovos. Esses dípteros têm comportamento crepuscular e noturno, alimentam-se de sucos vegetais, néctar de flores, frutos e soluções açucaradas. Além disso, as fêmeas são hematófagas, pois necessitam de sangue humano ou animal para maturar seus ovos, participando diretamente do processo de infecção, o que lhes confere importância epidemiológica (PINTO, 2017;RÊGO, 2013).

A espécie *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome*, *Lu. neivai*, *Lu. fischeri* e *Lu. migonei* são as envolvidas na transmissão da leishmaniose tegumentar e a espécie *Lu. longipalpis* é a principal envolvida na transmissão da LV(MARTINS,2013)

A *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas principais: promastigota e amastigota. A forma extracelular designada com promastigota (**Figura 2A**) tem a forma alongada com um flagelo livre na parte anterior em sua membrana, pode-se observar um núcleo ovoide situado na região central da célula e um cinetoplasto ovóide localizado entre a extremidade anterior da célula e o núcleo. A amastigota (**Figura 2B**) é tipicamente esférica, no citoplasma encontra-se o núcleo ovóide e cinetoplasto de forma de bastão próximo ao núcleo, sendo esta forma intracelular obrigatória (LAURENTI et al, 2010; PATIL et al, 2012).

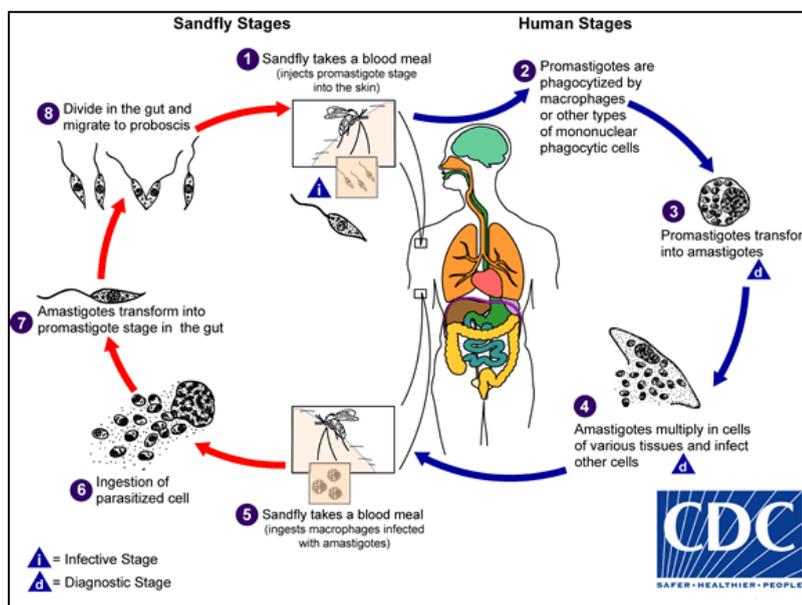
Figura 2 – Formas evolutivas: (A) promastigotas (B) amastigotas de *Leishmania* spp.



2.2 Ciclo biológico da leishmaniose

O ciclo de vida do parasito envolve alternância morfológica celular entre dois hospedeiros, a promastigota no hospedeiro intermediário e a amastigota no definitivo. A transmissão começa quando o flebotomíneo infectado inocula as formas promastigotas metacíclicas no mamífero durante o repasto sanguíneo. A perfuração da pele faz com que as células de defesa (neutrófilos, células dendríticas, macrófagos etc.) sejam recrutadas para o local da picada e englobem os parasitos mediante interações com receptores superficiais. Devido à mudança de pH e temperatura dentro das células fagocitárias, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por fissão binária até lisar a célula de defesa, contaminando novas células fagocíticas (**Figura 3**) (TEIXEIRA et al.; 2013; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Figura 3 - Ciclo Biológico da *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013.

O parasito, hospedeiro e outros fatores afetam se a infecção se torna resulta em leishmaniose cutânea ou visceral. Os flebotomíneos são infectados pela ingestão de células infectadas durante as refeições de sangue. Nos flebotomíneos, os amastigotas se transformam em promastigotas, desenvolvem-se no intestino (no intestino, para espécies do parasito pertencentes ao subgênero *Viannia*; no intestino médio, para protozoários do subgênero *Leishmania*) e migra para a probóscide. A

partir dessa atividade ocorre o repasto sanguíneo, com posterior disseminação hematogênica e linfática para outros tecidos ricos em células do sistema fagocitário (Brasil, 2014).

2.3 Resposta imunológica

A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel importante nos processos de controle e resolução da doença. A inoculação de formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro é seguida pelo rápido recrutamento de neutrófilos ao local de infecção, onde estas células podem destruir parasitos por meio de alguns mecanismos que incluem a produção de estruturas fibrosas conhecidas como NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*) e liberação de grânulos tóxicos. Os neutrófilos, então, fagocitam os parasitos e entram em processo de apoptose, ocasionando a conseqüente fagocitose destas células por macrófagos. Os neutrófilos também possuem a capacidade de aumentar o recrutamento, mediado por CCL3, de células dendríticas (HURRELL et al., 2016; KAYE; SCOTT, 2011).

Após infecção com o parasito, monócitos também são recrutados para o local da picada, posteriormente diferenciando-se em células dendríticas derivadas de monócitos que migram para linfonodos drenantes e dão início às respostas adaptativas mediadas por células T. As respostas mediadas pelas subpopulações de células T conhecidas como Th1 e Th2 são cruciais tanto para o controle quanto para a progressão da doença. As células Th1 secretam moléculas ativadoras de imunidade celular, como o IFN- γ , e estão relacionadas à resolução da doença; enquanto que as células Th2 secretam citocinas, como IL-4, que mediam respostas humorais e estão relacionadas à susceptibilidade à doença. A diferenciação de células T CD4⁺ naíve em células Th1 é mediada por citocinas como IFN- γ e IL-12, enquanto que a diferenciação a células Th2 é mediada principalmente por IL-4 (PANDEY et al., 2016).

Os macrófagos são células efetoras essenciais para a destruição dos parasitos. Eles podem ser ativados por diferentes sinais, podendo se diferenciar em dois fenótipos distintos conhecidos como M1, ou classicamente ativado, e M2, ou alternativamente ativado. O IFN- γ produzido por células Th1 estimula a diferenciação dos macrófagos ao fenótipo M1 com conseqüente estimulação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e destruição dos parasitos mediada por óxido nítrico. A diferenciação ao fenótipo M2 é induzida por citocinas produzidas por células Th2, como IL-4 e IL-

13, e está relacionada à sobrevivência do parasito (LIU; UZONNA, 2012; MARTINEZ; PEREIRA-CARVALHO et al., 2013).

2.3.1 Vias de metabolismo da arginina

A resposta imune do hospedeiro, além de outros fatores, relaciona-se diretamente com a manifestação clínica da doença. Uma das primeiras e mais frequentes células do sistema imune que são os macrófagos onde em resposta a infecção por *Leishmania*. Estes por sua vez, são as principais células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), e possuem diversas estratégias para que ocorra a morte dos seus invasores. Uma delas é o “burst” oxidativo que é induzido ao fagocitar os microrganismos. Isto acontece pelo fato da NADPH ser fosforilada formando diversas moléculas oxidativas como peróxidos de hidrogênio e superóxidos que interagem com a membrana dos patógenos. Outro mecanismo utilizado pelos macrófagos é a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esta enzima oxida a L-arginina para a produção de citrulina e óxido nítrico (NO), sendo este último uma molécula altamente reativa e efetora no combate de microrganismos. (FARIA,2014; NARAYANAN,2013).

A arginase é uma importante enzima envolvida no processo de desintoxicação, eliminando amônia via ciclo da ureia, hidrolisando a L-arginina à L-ornitina e ureia. L-ornitina pode ser metabolizada pela ornitina descarboxilase (ODC), dando origem a poliaminas, que são importantes para divisão e proliferação celular. A *L. major* usa esta via metabólica para proliferar dentro do macrófago durante a infecção. Por outro lado, a óxido nítrico sintase (NOS) oxida a L-arginina à citrulina e óxido nítrico, participando, desta forma, da eliminação do parasita. Estas enzimas podem ser moduladas na presença de citocinas (FERREIRA DE LIMA,2018;RIBEIRO 2017)

Uma das enzimas que compete com a arginase pela L-arginina é a iNOS. Na verdade, há três tipos de óxido nítrico sintase (NOS): iNOS, NOS neural (nNOS) e NOS endotelial (eNOS). As duas últimas são constitutivas e dependentes de cálcio. A iNOS, por outro lado, não é expressa constitutivamente, mas é fortemente induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA). O NO, por sua vez, participa de vários processos fisiológicos, como vasodilatação, neurotransmissão e eliminação de patógenos (SANTIAGO,2013; RAJENDRAN 2019).

2.4 Formas clínicas

2.4.1 Leishmaniose tegumentar

Em humanos, as leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que podem ser categorizadas em dois grupos: a LT, onde no novo mundo também é chamada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), responsável pelas formas clínicas cutânea, cutânea difusa e mucocutânea; e a LV, responsável pela forma visceral, sendo esta compreendendo a manifestação mais grave da doença (STOCKDALE et al., 2017).

A LC geralmente afeta partes do corpo descobertas onde o flebotômio tem acesso a pele. Pelo menos três espécies de parasitas estão associadas com LC: *L. braziliensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo, e *L. major* no Velho Mundo. O LC do novo mundo manifesta-se geralmente como uma lesão preliminar solitária, mas a doença do velho mundo apresenta frequentemente com as lesões preliminares múltiplas. O período de incubação varia de cerca de 7 a 90 dias. A lesão inicial do papule vermelho torna-se frequentemente em uma úlcera circunscrita com uma base dos granulóbulos com bordas delimitadas. **(Figura 4A)** (BURZA, 2018).

A LCD é uma manifestação rara da LTA, causada pelas espécies *L. amazonensis*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. pifanoi* ou pela *L. mexicana*, porém, somente uma pequena porcentagem dos pacientes infectados por tais espécies evoluem para esta forma. Os aspectos clínicos caracterizam-se pela formação de pápulas no local da inoculação dos parasitos, que ao contrário da LC, não evoluem para ulcerações. Depois, aparecem outras lesões semelhantes na vizinhança das lesões iniciais, e após meses ou anos ocorre a disseminação hematogênica do parasito, havendo um grande comprometimento dérmico, de natureza crônica **(Figura 4B)** (SILVA, 2018).

A LM é o tipo mais grave da LTA, pois suas lesões comprometem a região mucosas e cartilagens. Em alguns casos, ocorrem prurido e inchaço moderado e, posteriormente, evolução para úlceras bem delimitadas que se espalham para outras áreas como: lábios, cavidade oral, faringe e laringe, onde é caracterizada por nódulos

sintomáticos, sendo notória a desfiguração da face devido à intensa resposta inflamatória (**Figura 4C**) (KHEZZANI, BOUCHEMAL, 2017)

Figura 4 – Formas clínicas da LTA



Fonte: BRASIL,2017

2.4.2 Leishmaniose visceral

A LV, classicamente conhecida como calazar, é uma apresentação sistêmica das leishmanioses causadas pelos parasitos pertencentes ao complexo donovani, onde no Brasil o agente etiológico é a *L. infantum chagasi*, que também é encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Sendo considerada a forma mais grave de todas as leishmanioses, quando não tratada é fatal em mais de 90% dos casos. Geralmente, as características clínicas aparecem no período de 2 a 6 meses após a infecção incluindo febre prolongada, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso, entretanto, é importante salientar que alguns pacientes permanecem com infecção não aparente, se tornam imunocomprometidos muitos anos após a infecção (**Figura 5**) (MCGWIRE et al, 2013;NAGLE et al., 2014; TAJEBE et al., 2017).

Figura 5 – Forma clínica da leishmaniose visceral (hepatoesplenomegalia)

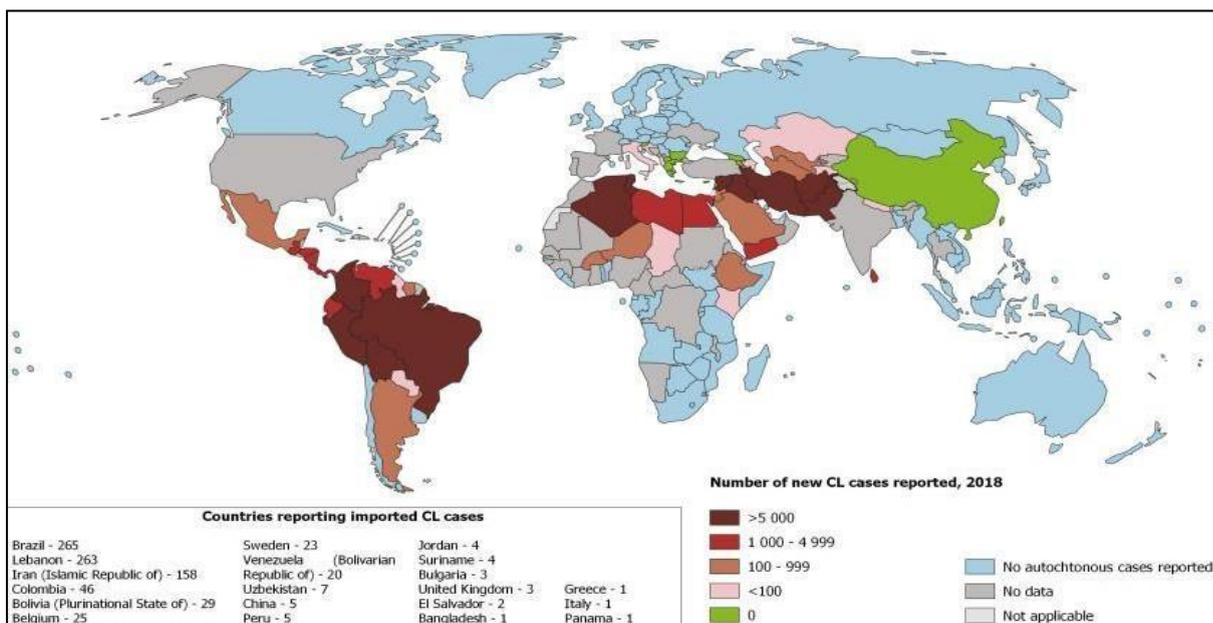


Fonte: Ministério da Saúde, 2006

2.5 Epidemiologia

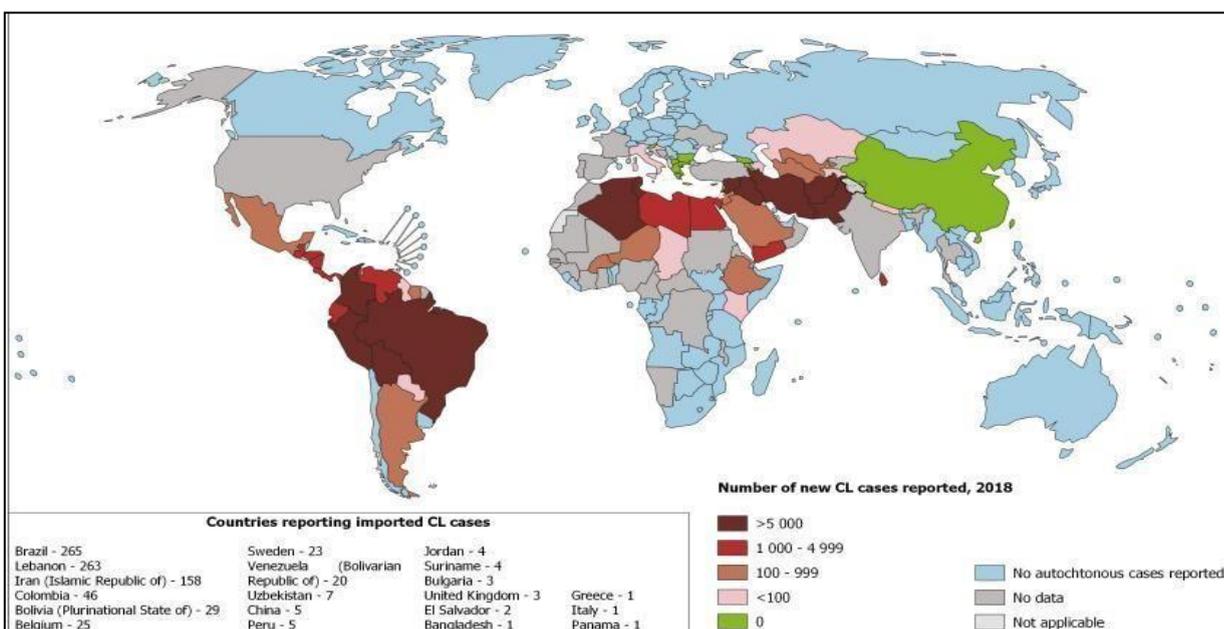
As leishmanioses são endêmicas em varias regiões do mundo, tendo em vista o registro de aproximadamente 1,3 milhões de casos por ano em todo planeta , sendo considerada umas das doenças mais negligenciais existentes hoje. Os países com maior incidência de LT (**Figura 6**) são Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e a República Árabe da Síria, detendo dois terços do número de casos registrados. A forma visceral (**Figura 7**) apresenta um total de 200.000 a 400.000 casos, sendo que 90% destes ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2018).

Figura 6 – Distribuição da Leishmaniose Cutânea no Velho e Novo Mundo 2018



Fonte: WHO,2019

Figura 7- Distribuição da Leishmaniose Visceral no Velho e Novo Mundo 2018



Fonte: WHO,2019

Em todo o Brasil há registros de LTA, sendo uma das afecções dermatológicas de grande relevância. Entre 2003 e 2018, foram registrados mais de 300.000 casos, com média de 21.158 casos por ano. A região Norte foi responsável pelos maiores coeficientes de detecção durante o período, seguido da região

Centro-Oeste. No território nacional, o coeficiente médio de detecção foi de 11,3 casos por 100.000 habitantes, variando de 5,7 – 17,8. Dentre as formas clínicas, a forma mucosa representou 7,7% dos casos registrados no período. No Nordeste dados revelam que no período de 2013 á 2018 foram confirmados 4.401 casos dentro desse valor, 147 foram notificados somente em Alagoas (SINAN/MS, 2019).

No Brasil, a LV é considerada uma doença em expansão, uma vez que, até o ano de 1980, sua ocorrência era exclusivamente em municípios da região Nordeste e, atualmente, todas as regiões do país confirmam casos anualmente. No período de 2003 a 2018, foram confirmados mais de 51 mil casos humanos, com incidência média de 1,7 casos/100 mil habitantes, variando de 1,4 a 2,1 e letalidade de 7,2%. A região Nordeste apresentou o maior número de casos , entretanto, as maiores incidências são demonstradas na região Norte até o ano de 2012, quando há a inversão para região Nordeste até o ano de 2016, e posterior aumento da incidência novamente na região Norte, onde no estado de Alagoas no período de 2013 á 2018 foram confirmados 169 casos (SINAN/MS, 2019).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se principalmente no material biológico obtido de punções hepáticas, de linfonodos, esplênica, de medula óssea e/ou pesquisa de parasitos em esfregaço das lesões após a coloração de Giemsa. Utiliza-se para a coleta do material fazendo uma incisão do bordo da lesão, biópsia do bordo com impressão por aposição em lâmina de vidro e/ou punção aspirativa da lesão. Anteriormente, era realizado o diagnóstico de forma indireta, através da mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasita (intradermorreação de Montenegro), onde eram consideradas positivas as reações com área de endureção maior que 5mm, entretanto esse tipo de exame está em desuso. O diagnóstico sorológico é baseado na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Fixação de Complemento e Aglutinação Direta (Brasil, 2014; SMS-SI, 2018).

2.7 Farmacoterapia

No mundo, as leishmanioses representam uma importante zoonose que afeta principalmente pessoas de baixa renda devido à sua distribuição, gravidade e complexidade, o que de fato representa um grande risco aos indivíduos que vivem nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Embora exista essa importância e complexidade, há poucas opções de tratamento direcionadas para todas as formas clínicas. Os tratamentos atuais com maior grau de efetividade utilizam dois fármacos principais, descobertos na metade do século XX, e utilizados até os dias atuais. Mais recentemente, em alguns países, se utiliza a miltefosina e a paramomicina (MARTINS;2014, PHAM;DUTRA, 2016).

O antimônio pentavalente (Sb^{+5}), presente no antimonato de meglumina (nome comercial é Glucantime® ou Glucantim®) ou estibogluconato de sódio (nome comercial é Pentostam®), é um composto cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido. O que se sabe é que os fármacos agem sobre o metabolismo influenciando a ação parasiticida do macrófago. Este medicamento pode ser encontrado no mercado em frascos de 5 mL com 1,5 g do antimônio bruto e a dose recomendada deve ser calculada em miligramas de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) por quilograma de peso corporal por dia (mg Sb^{+5} /kg/dia), administrado por via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV) por 28 a 30 dias (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014;BRASIL, 2017).

O antimônio pentavalente pode causar vários efeitos colaterais durante a sua administração sendo o efeito mais grave a ocorrência de cardiotoxicidade com presença de arritmias, prolongamento das ondas Q e T do eletrocardiograma e até mesmo morte súbita, Podem ocorrer também elevação de enzimas hepáticas e pancreáticas, pancitopenia e anormalidades eletrolíticas, exigindo o monitoramento contínuo do paciente durante a administração do medicamento, o que implica em internação hospitalar em todos os casos. (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; HALDAR; SEM; ROY, 2011).

A anfotericina B é um antifúngico polieno originalmente extraído da bactéria *Streptomyces nodosus*, com atividade leishmanicida descrita no início da década de 60. O mecanismo deste fármaco baseia-se na sua afinidade a esteróis, especialmente o ergosterol, presentes na membrana do parasito. A ligação da

anfotericina B a estes esteróis resulta na formação de poros que alteram a permeabilidade a cátions, água, glicose e outras pequenas moléculas, levando conseqüentemente à morte do parasito (CHATTO,PADHYAY,2016; NAGLE et al, 2014).

Diferentes formulações de anfotericina B encontram-se disponíveis comercialmente em suas quatro formas: desoxicolato de anfotericina B (anfotericina B convencional, Fungizon®); anfotericina B lipossomal (Ambisome®); dispersão de colesterol e anfotericina B (Amphocil®); e formulação lipídica de anfotericina B (Abelcet®). As formulações comumente utilizadas para o tratamento das leishmanioses são: desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal (SEIFERT, 2011).

A paromomicina (anteriormente conhecida como aminosidina) é um antibiótico aminoglicosídeo, que passou a ser utilizado para o tratamento da LV em 2006. Sua administração é realizada por via parenteral com dose de 14-16 mg/kg/dia durante um período de até 3 semanas, regime que demonstrou taxas de cura em até 79% dos casos. Este fármaco está também disponível sob a forma de pomada para o tratamento tópico da LT. Os efeitos tóxicos mais graves associados ao uso da paromomicina são ototoxicidade reversível e hepatotoxicidade. O mecanismo da paramomicina está relacionado ao aumento da fluidez da membrana plasmática, dano ao ribossomo e alteração do potencial de membrana mitocondrial do parasito (CARDOZO et al., 2014; NAGLE et al., 2014).

A miltefosina (Impavido®), uma hexadecilfosfocolina que inicialmente foi desenvolvida como um fármaco anticâncer, tornou-se o primeiro fármaco padronizado para o tratamento da leishmaniose com administração por via oral, eficaz para LV. Sendo esse fármaco o pilar do plano de eliminação da LV recentemente lançado no subcontinente indiano, o tratamento é realizado por via oral, a dose de miltefosina recomendada é de 2-2,5 mg/kg/dia por 28 dias. Os principais efeitos adversos da miltefosina incluem teratogenicidade potencial, cefaleia e distúrbios gastrointestinais e renais, a resistência adquirida pelo parasito, dando origem a cepas mais resistentes. O mecanismo de ação da miltefosina envolve alterações no metabolismo de lipídios, indução da expressão de óxido nítrico sintase 2 (iNOS2) com conseqüente produção de NO, dano mitocondrial e indução de apoptose (CARDOZO et al., 2014; DORLO et al., 2012; GRIENSVEN;

DIRO, 2012).

E mesmo a eficácia destes medicamentos sendo considerada alta para a resolução clínica da doença, esta não é alcançada sem a indução de efeitos adversos graves aos pacientes. Portanto, se reconhece a necessidade de se caracterizar novos fármacos com menor toxicidade e de igual efetividade (DUTRA,2016).

Atualmente, pesquisas com plantas tem sido realizados em diversos países e em várias regiões do Brasil utilizando-as seja na sua forma bruta, fitoterápica ou com o princípio ativo isolado. Estas pesquisas têm revelado o potencial desses vegetais quanto às atividades leishmanicida e tripanocida, que podem vir a ser uma forma alternativa para o tratamento dessas patologias (DELMONDES, 2014).

2.8 Plantas Medicinais Presentes na lista do RENISUS

Com a intenção de incentivar a utilização de terapias complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e assim seguir o que preconiza a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Ministério da Saúde (MS) publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Na lista figuram plantas empregadas pela sabedoria popular e também plantas cujos efeitos já foram comprovados cientificamente. Além disso, foi priorizada a inclusão de plantas nativas dos diversos biomas do País e que possibilitassem atender às doenças mais comuns nos brasileiros (BRASIL,2009).

O uso de plantas para o desenvolvimento de novos medicamentos pode ser útil tanto para combater doenças causadas por parasitos que são negligenciadas, quanto para maximizar o controle de várias doenças. As vantagens de um tratamento utilizando um medicamento natural são a possibilidade de se conseguir baixa toxicidade, menos efeitos colaterais no paciente e o custo mais baixo para a população, principalmente se o medicamento fosse oriundo de um vegetal de fácil cultivo e acessível à população (LUCA et al., 2014;DELMONDES, 2014).

O presente trabalho visou portanto, avaliar os efeitos leishmanicida de *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Syzygium jambolanum*, *Ruta graveolens*, *Anacardium*

occidentale, *Aloe vera* e *Psidium guajava*, sendo conhecidas popularmente por; Aroeira-vermelha, Quebra-pedra, Menta, Camomila, Espinheira santa, Jambolão, Arruda, Cajueiro, Babosa e Goiabeira. Onde estão presentes na lista do RENISUS.

2.8.1 *Schinus terebinthifolius*

Populamente conhecida como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira ou poivre-rose, a *Schinus terebinthifolius* é uma árvore nativa da América do Sul da família das Anacardiaceae. Vários metabólitos secundários já foram identificados em *S. terebinthifolius*, a exemplo de alcaloides e terpenos . tendo os sesquiterpenos como substâncias presentes em maior quantidade nas folhas tendo propriedades medicinais indicada no tratamento da artrite, febres, ferimentos e reumatismos, além de registra os seguinte usos etnofarmacológicos: anti-inflamatória, antiespasmódica, tônica, vulnerária, diurética, antileucorreica, emenagoga, adstringente, cicatrizante, balsâmica e bactericida (CARLINI,2010; PICCINELLI,2015; D'SOUZA' COSTA 2015).

2.8.2 *Phyllanthus niruri*

Phyllanthus niruri é uma espécie pertencente à família Phyllanthaceae, sendo algumas delas conhecidas como quebra-pedra (erva-pombinha), sendo utilizada em distúrbios incluindo disenteria, gripe, vaginite, tumores, diabetes, icterícia, dispepsia etc. Os principais metabólitos secundários presentes como os alcaloides que tem atividade antiespasmódica, tendo uma ação miorreaxante Os triterpenoides derivados dos terpenoides, depsídeos e depsidonas atuam na atividade anti-inflamatória, além dos esteroides com a sua denominação de heterosídeos cardioativos agindo na musculatura cardíaca no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (PORTO,2013; PATEL,2011; ABDULLA,2010; DO ROSÁRIO,2016).

2.8.3 *Mentha piperita*

Menta (*Mentha piperita*), uma erva aromática que surgiu como um híbrido estéril (hexaplóide) entre hortelã (*Mentha spicata*) e hortelã-água (*Mentha aquatica*) há mais de 250 anos atrás, pertencentes à família Lamiaceae, seus principais componentes incluem o mentol e mentona, além de outros metabólitos como aminas, taninos, fenóis, triterpenóides, flavonóides, quinonas, lactonas, açúcares redutores, saponinas e princípios amargos têm sido utilizados em antiespasmódicos, aromáticos, anti-sépticos ou até medicamentos para o tratamento de resfriados, cãibras, indigestão, náusea, dor de garganta, dor de dente ou até câncer, onde são amplamente distribuídos em regiões climáticas temperadas e sub-temperadas (KUMAR,2014; JIANG,2011; SHARAFI,2010).

2.8.4 *Matricaria recutita*

A camomila, como é conhecida populamente, cujo nome científico é *Matricaria recutita*, pertence a família Asteraceae, onde no Brasil é uma das ervas mais popularmente utilizadas na medicina alternativa, possui atividades biológicas como anti-inflamatória, anti-diarreica, antioxidante, antineoplásicos, efeitos neuro-protetores, antialérgicos e antimicrobianos melhorando também a saúde cardíaca também sirva para reduzir níveis de ansiedade devido à presença do flavonoide apigenina, que age como ligante da benzodiazepina (AL-DABBAGH,2019; GOMES,2018; BUSSMANN,2019),

2.8.5 *Maytenus ilicifolia*

Popularmente conhecida como Espinheira santa, a *Maytenus ilicifolia* é uma planta que pertence a família Celastraceae, onde os metabólitos secundários estão envolvidos na ação terapêutica, que são os alcalóides e macrólídeos, com destaque para triterpenos, polifenóis, flavonóides e taninos que tem ação ação antiulcerogênica, anti-gástrica e antidiarreicos (ÁNGELES-LÓPEZ, 2019; HAN,2019; PAVARINI,2019)

2.8.6 *Syzygium jambolanum*

Syzygium jambolanum é comumente conhecida no Brasil como Jambolão, Esta espécie, da família das murtas (Myrtaceae), tem sido usado para tratar doenças causadas por bactérias, fungos e vírus patógenos, úlceras no trato geniturinário causadas por *Candida albicans*, além de resfriados, tosse, febre e problemas de pele, como erupções cutâneas e na boca, garganta e intestinos. Entre as substâncias ativas presente destacam-se os compostos fenólicos fenóis, favonóides, e taninos, além da presença de alcaloides e iridoides. Estudos realizados com *Syzygium jambolanum* relatam que os extratos hidroalcoólicos de DC também demonstram atividade hipotensora em ratos normotensos não anestesiados, bem como efeito vasorelaxante nos anéis da artéria mesentérica superior do rato, efeito dependente do endotélio (ASSIS,2018; RIBEIRO,2014; HERCULANO,2014).

2.8.7 *Ruta graveolens*

Ruta graveolens popularmente conhecida como Arruda, pertencente a família das Rutaceae, planta medicinal cujas raízes e partes aéreas contêm mais de 120 metabólitos especiais como cumarinas, flavonóides, acridonas e alcaloides da furoquinolina, estudos relatam uma ampla atividade farmacológica como antimicrobiana e citotóxica como principais substâncias isoladas encontra-s; alcalóides e derivados cumarínicos, entre eles a rutina que possuem atividades terapêuticas com anti-hemorrágica, vermícida, anti-inflamatória (SEMERDJIEVA,2019; SAMPAIO,2018).

2.8.8 *Anacardium occidentale*

Anacardium occidentale é uma planta tropical conhecida popularmente por Cajueiro, tendo seu plantio principalmente no nordeste do Brasil. Várias propriedades foram descritas, principalmente devido a seus componentes fenólicos, seus principais isolantes são; cardol, ácidos anarcárdico, gálico, oxálico e tartárico, fitosterina, onde incluindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatório, antitumoral através da

supressão da angiogênese e também da histona acetiltransferase atividade moluscicida, antioxidante e inseticida contra *Aedes aegypti*; também atua como inibidores da tirosinase de cogumelos, mostrando, portanto, um grande potencial terapêutico além de possuir proteínas, sais minerais e vitaminas (SALEHI, Bahare, et al., 2011; MATUTINO,2019).

2.8.9 Aloe vera

Aloe vera é o maior gênero da família Xanthorrhoeaceae, e geograficamente presente em todo mundo, No Brasil é chamada popularmente de Babosa, as plantas de Aloe foram relatadas por várias propriedades biológicas, incluindo antibacteriano e antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório, anti-artrítico, anti-reumatóide, anticâncer e atividades antidiabéticas, desintoxicação, tratamento da constipação, liberação de toxinas e resíduos do corpo, devido a presença de metabólicos secundários esteróides livres, xantonas, flavonóis, flavonas e saponinas que são responsáveis por essas atividades (GUO,2016; SALEHI, Bahare, et al.,2018).

2.8.10 Psidium guajava

Psidium guajava, popularmente conhecida como Goiabeira, é uma pequena árvore pertencente à família Myrtaceae, Tradicionalmente, as preparações das folhas têm sido usadas em medicamentos em vários países, principalmente como remédio antidiarréico, seus principais usos tradicionais de folhas da goiabeira tendo preparação de decoção, infusão e fervura atuando em vários distúrbios, como reumatismo, diarréia, diabetes mellitus. Estudos associaram a atividade antimicrobiana contra algumas bactérias e fungos com cinco flavonóides, taninosnas e ao teor de ácido gálico e catequina presentes nas folhas. Além disso, a atividade contra patógenos bacterianos e fúngicos foram atribuídos ao ácido betulínico e ao lupeol que estão presentes (DÍAZ-DE-CERIO,2017; TRUJILLO-CORREA,2019)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito leishmanicida das espécies *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Syzygium jambolanum*, *Ruta graveolens*, *Anacardium occidentale*, *Aloe vera* e *Psidium guajava*, que estão presentes na lista do RENISUS, bem como investigar o mecanismo de ação do(s) produto (s) natural(is) mais ativo(s), com intuito de descobrir novos candidatos a fármacos leishmanicidas, que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade dos produtos naturais para a célula hospedeira (macrófagos).
- Verificar a ação dos mesmos sobre macrófagos infectados com *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonenses* quanto à taxa de infecção e a multiplicação dos parasitas intracelulares (amastigotas).
- Identificar a seletividade dos produtos naturais para diferentes espécies do gênero *Leishmania chagasi* e *Leishmania*.
- Analisar o efeito desses produtos naturais sobre macrófagos infectados com *Leishmania chagasi* e *Leishmania*. quanto à produção de óxido nítrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos extratos aquosos

Foram adquiridos em herbanários as espécies utilizadas *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Syzygium jambolanum*, *Ruta graveolens*, *Anacardium occidentale*, *Aloe vera* e *Psidium guajava*, de forma seca, onde, posteriormente, foi feita a infusão para a obtenção dos extratos aquosos. Após a infusão, foi preparado o peso seco das plantas para determinar a massa em microgramas, e, em seguida, o volume a ser utilizado para a concentração de 100 µg/mL dos extratos.

4.2 Fármacos e Reagentes

Os fármacos padrões utilizado neste trabalho; pentamidina, antimoniato de meglumina (Sigma®) e Miltefosina (Sigma®) como os reagentes que se seguem, Meio Schneider, Soro Fetal Bovino (SFB) e Meio Dulbecco Modificado por Eagle (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM). Os extratos a serem testados e as farmácios padrões foram preparadas empregando DMSO 0,1% (Sigma) como veículo, assim como o veículo.

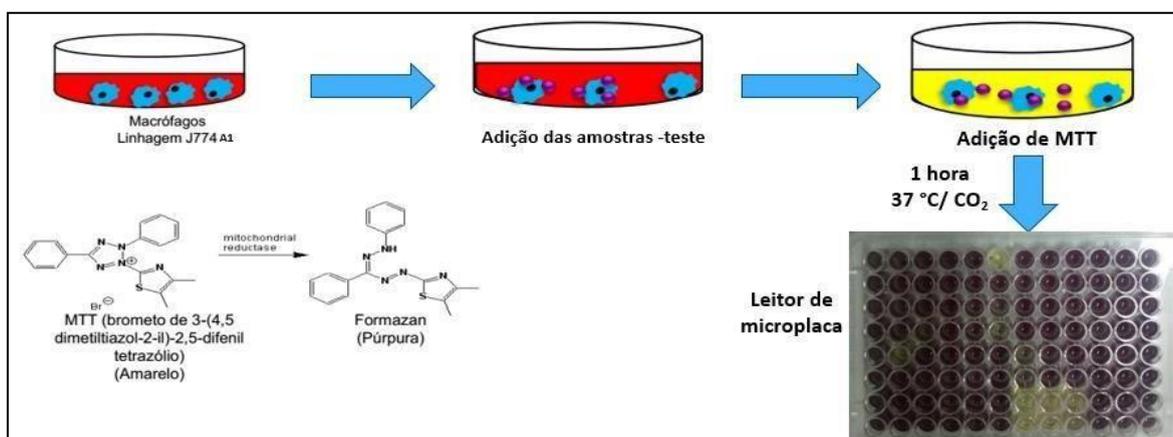
4.3 Manutenção de macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura em 5 ml de meio RPMI com SFB, onde as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na concentração de 1×10^5 células/mL e 200 µL dessa suspensão foi distribuída em placa de 96 poços (Nunc, Denmark) ou 1×10^5 células /poço de placa de 24 poços com lamínulas.

4.4 Determinação da viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 1 hora, para adesão dos macrófagos ao plástico. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e acrescentadas as diferentes concentrações das substâncias que foram testadas. Os poços controles foram células cultivadas somente com meio de cultura e 10% de SFB (Roche) ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de redução de MTT (MOSMANN et al., 1993). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

Figura 8 – Ilustração do ensaio de redução do MTT



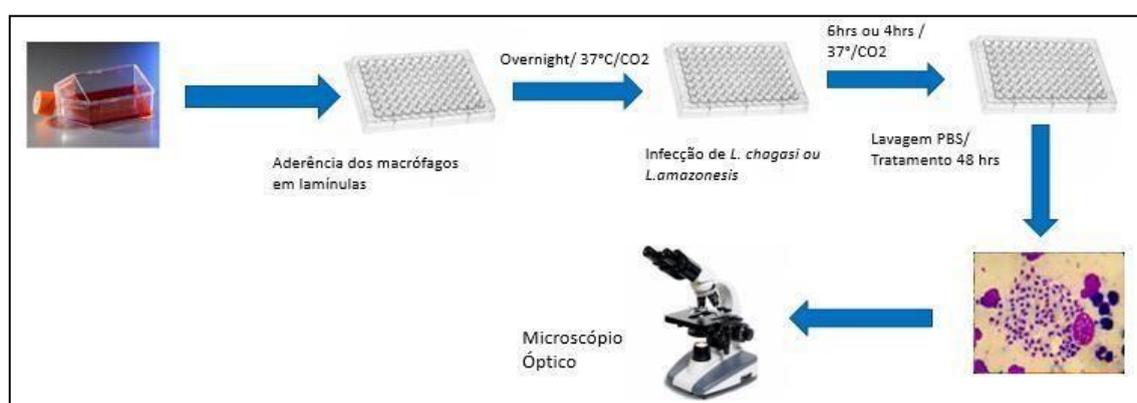
Fonte: AUTOR, 2019

4.5 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 parasitos : 1 macrófago. A placa foi incubada por 4 horas em estufa de a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Depois de 6 horas de infecção de *L. Chagasi* e 4 horas de infecção para *L. amazonensis*, onde os macrófagos foram “lavados” com solução Hanks' sem soro, para remoção dos parasitos não interiorizados.

Os macrófagos foram cultivados com RPMI suplementado com 10% de SFB, na presença ou não de diferentes concentrações do(s) composto(s) e foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 2 dias. Após o segundo dia de cultura, os poços contendo os macrófagos infectados foram lavados com Hanks' sem soro, as células foram fixadas às lâminulas com metanol e em seguida coradas com Giemsa e May-Grünwald e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi feita com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100X (imersão) (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.

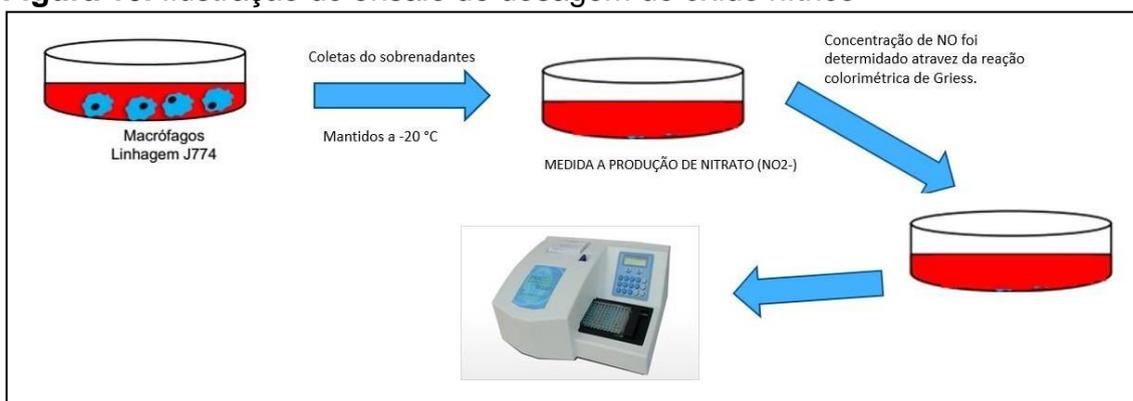
Figura 9 – Ilustração do ensaio de viabilidade sobre formas amastigotas.



Fonte: AUTOR, 2019

4.6 Dosagem do óxido nítrico

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e cultivados na presença do(s) composto(s) (ou não) 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 (NO₂⁻) no sobrenadante das culturas. A concentração de nitrito foi determinada através de reação colorimétrica de Griess. 50 µl do reagente de Griess foram adicionados a 50 µl do sobrenadante e após 10 min. a TA a absorvância foi determinada (filtro de 540nm) em leitor de microplaca.

Figura 10. Ilustração do ensaio de dosagem do óxido nítrico

Fonte: AUTOR, 2019

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram avaliados por Análise de Variância (One-Way ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de *Dunnett* no programa GraphPad Prisma® 5.01 e os valores foram considerados significantes quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao diluente das substâncias DMSO 0,01%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi feita a determinação da citotoxicidade das plantas medicinais; *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria recutita*, *Maytenus ilicifolia*, *Syzygium jambolanum*, *Ruta graveolens*, *Anacardium occidentale*, *Aloe vera* e *Psidium guajava* disponíveis na lista RENISUS, utilizando células de macrófagos da linhagem J744.A1, como demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Efeito citotóxico das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina em macrófagos da linhagem J774.A1.

Substância	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b
Pentamidina	35,5 ± 3,4 μM	78,4 ± 3,7 ***
Antimoniato de meglumina	>300 μM	NA
Miltefosina	>100 μM	NA
<i>Schinus terebinthifolius</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Phyllanthus niruri</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Mentha piperita</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Matricaria recutita</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Maytenus ilicifolia</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Syzygium jambolanum</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Ruta graveolens</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Psidium guajava</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Anacardium occidentale</i>	>100 μg/mL	NA
<i>Aloe vera</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%.

A partir da **Tabela 1**, é possível observar que nenhuma das soluções extrativas aquosas das plantas até a concentração máxima testada de 100 μg/mL não apresentou efeito a célula hospedeira. A pentamidina apresentou o CI₅₀ de 35,5 ± 3,4 μM tendo seu efeito máximo de 78,4 ± 3,7 %. Os demais fármacos padrões não

apresentaram citotoxicidade até a concentração máxima testada de 300 μM para o antimoniato de meglubina e de $>100 \mu\text{M}$ para miltefosina.

Arnóbio et al. (2012) avaliaram o a indução da atividade citotóxica do extrato aquoso de *Schinus Terebinthifolius* (aroeira), onde foi constatado também que não houve efeito inibitório sobre o crescimento celular de diferentes concentrações do extrato, onde foi observada coloração purpura em todos os poços, indicando a mesma viabilidade celular apresentada.

Em um estudo realizado por PINMAI et al., (2011), testou a citotoxicidade de extrato da erva *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra) também não foi encontrado atividade significativa, validando a segurança *in vitro* para os extratos metanólico e aquoso.

Num estudo prospectivo, LEE et al., (2013), observou que os extratos de folhas de *Psidium guajava* (goiabeira) relatou não mostrar citotoxicidade para os macrófago normais saudáveis, assim como DA SILVA OLIVEIRA et al., (2016) para os extratos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) que não conseguiram encontrar atividade citotóxica para os macrófagos.

Dados obtidos por SOUZA et al., (2017) revelam que o extrato aguoso de *Anacardium occidentale* (cajueiro) não apresentou citotoxicidade até sua máxima concentração testada de (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ÁGUILA et al., (2015) já haviam demonstrado que o extrato de *Ruta graveolens* (arruda) , não tinha ação deletéria em macrófagos.

Na tentativa de avaliar o pontencial leishmanicida de *Myrciaria dubia* (Myrtaceae), mesma família pertecente a *Syzygium jambolanum* (jabolão), foi observado também que a não ocorreu atividade citotóxicas para célula hospedeira (DE SENA CORREIA et al., 2016).

Segundo RAHAYU et al., (2018), a combinação de quitosana com diferentes extrato etanólico de *Aloe vera* (babosa) extraído com etanol não foi citotóxica para a cultura de células de fibroplastos em ensaios de MTT, tento em vista que essa espécie apresenta saponinas que é responsavel pela sua toxicidade para os monocitos (MINJARES-FUENTES, 2019).

No estudo de feito por KALA, (2014) avaliou as propriedades farmacológicas e efeitos citotóxicos de extratos da mesma família pertencente a *Matricaria recutita* (camomila) por ensaio MTT, onde demonstrou que sua concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ foi calculada como uma dose não tóxica para o macrófago.

Essas análises sugerem que as espécies vegetais utilizadas nesse trabalho não induz a citotoxicidade de células do sistema imunológico humano, portanto é possível observar que estes estudos através dos extratos de plantas já possuem relatos na literatura, apresentando relações de seus resultados, condizendo com o experimento, corroborando para o estudo.

Com o intuito de verificar uma possível atividade leishmanicida das amostras das plantas medicinais testadas, foi calculada a concentração inibitória 50% (CI_{50}), o efeito máximo e o índice de seletividade das espécies de plantas, assim como dos fármacos padrões pentamidina, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e miltefosina, contra a forma amastigotas de *L. chagasi* (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Efeito leishmanicida das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS, 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	>300 µM	41,5 ± 2,6***	-
Miltefosina	13,8 ± 1,7 µM	72,4 ± 0,7 ***	>7,2
<i>Schinus terebinthifolius</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Phyllanthus niruri</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Mentha piperita</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Matricaria recutita</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Maytenus ilicifolia</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Syzygium jambolanum</i>	>100 µg/mL	NA	-

<i>Ruta graveolens</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Psidium guajava</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Anacardium occidentale</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Aloe vera</i>	>100 µg/m	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.

Esses resultados evidenciaram que nenhuma das plantas testadas apresentaram efeito leishmanicida com a concentração máxima utilizada (100 µg/mL), ao contrário dos fármacos-padrões utilizados miltefosina (CI_{50} igual à 13,8 µM) e pentamidina (CI_{50} igual à 65,1 µM). O antimoniato de meglumina apresentou uma CI_{50} de 300 µM.

Machado et al. (2018) alega, que extratos aquosos e hidroetanólicos das folhas de *Psidium guajava* (goiabeira), quanto ao efeito antiparasitário e potencial citotóxico em três concentrações (250, 500 e 1000 µg/mL) contra promastigotas de *L.chagasi* , inibindo seu crescimento por 37,16%, utilizando uma concentração maior de (1000 µg/mL), ou seja, dez vezes maior que a realizada nesse estudo, revelando sua baixa atividade em formas extracelulares do parasito.

Em outra avaliação *in vitro* de plantas medicinais tradicionais do Suriname (país da América do sul) por seu possível potencial anti-leishmanial, (MANS, D. R. A, et al., 2016) demonstrou que os extatos aguosos de *Anacardium occidentale* (cajueiro) e *Aloe vera* (babosa) também não apresentaram atividade contra a forma amastigota de *L. chagasi*, assim como nesse estudo.

Na maior parte das pesquisas encontradas a atividade leishmanicida de extratos de plantas se associa a compostos pertencentes a diversos grupos químicos isolados, presentes no metabolismo secundário dos vegetais (DE ABREU, 2019). Apesar do presente trabalho não ter observados atividade leishmanicida da aroeira, Morais et al. (2014) relataram a atividade antiparasitária *in vitro* de triterpenoides de Tirucallane, que são isolados em folhas de *Schinus*

terebinthifolius (aroeira), e nove derivados semi-sintéticos desse composto, foram investigados contra amastigosta *L. chagasi*, no qual quatro demonstraram seletividade em relação aos amastigotas intracelulares de *Leishmania*, com valores de IC50 na faixa entre 28 e 97 µg / mL.

Posteriormente, para a avaliação da atividade leishmanicida das amostras de plantas contra a forma amastigotas de *L. amazonensis*, foi calculada a concentração inibitória 50% (CI_{50}), o efeito máximo e o índice de seletividade das espécies de plantas, assim como dos fármacos padrões pentamidina, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e miltefosina (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Efeito leishmanicida das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS, 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 ± 0,4 µM	68,4 ± 4,4 ***	1,8
Antimoniato de meglumina	251,3 ± 3,7 µM	66,9 ± 1,4 ***	>1,9
Miltefosina	22,1 ± 1,8 µM	91,0 ± 0,4 ***	>4,5
<i>Schinus terebinthifolius</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Phyllanthus niruri</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Mentha piperita</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Matricaria recutita</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Maytenus ilicifolia</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Syzygium jambolanum</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Ruta graveolens</i>	>100 µg/mL	NA	-

<i>Psidium guajava</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Anacardium occidentale</i>	>100 µg/mL	NA	-
<i>Aloe vera</i>	>100 µg/m	40,4 ± 0,3 **	-

^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.

Para a determinação de uma possível atividade leishmanicida com as amostras também foi calculada a concentração inibitória 50% (CI_{50}), o efeito máximo e o índice de seletividade quando comparado ao grupo de fármacos padrões, desta vez contra a forma amastigotas de *L. amazonensis*.

Os fármacos padrões com a miltefosina tiveram atividade igual à $68,4 \pm 4,4$, a pentamidina igual à $66,9 \pm 1,4$ e o antimoniato de meglumina apresentou a maior atividade contra o parasito de $91,0 \pm 0,4$. De todas às espécies testadas, somente a *Aloe vera* (babosa) apresentou efeito leishmanicida com a concentração máxima utilizada (100 µg/mL), induzindo um efeito máximo de $40,4 \pm 0,3\%$, onde não foi possível calcular o índice de seletividade para os parasitos quando comparado aos macrófagos.

Em uma investigação de atividade leishmanicida de plantas utilizadas na medicina popular em áreas endêmicas do estado de Alagoas, incluindo o extratos aquosos de *Aloe vera* (babosa), mostrou a diminuição significativa do número de amastigotas de *L. amazonensis* em 10 µg/mL mostrando um efeito máximo contra o parasito de 40,4%, onde é possível evidenciar a concordância dos resultados junto com o presente trabalho (DE QUEIROZ et al., 2014).

Apesar de não observar resultados com o extrato de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), DOS SANTOS et al., (2013) descreve uma atividade leishmanicida de dois triterpenos de quinonametida, maytenina e pristimerina, isolados de cascas de raízes da planta contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*, onde exibiram uma atividade leishmanicida *in vitro* acentuada contra promastigotas e amastigotas com valores de concentração inibitória de 50% (IC50) inferiores a 0,88 nM. Os dois compostos

apresentaram atividade quando comparados aos controles positivos, amastigotas de *L. amazonensis* (IC50 = 6,75 nM) e *L. chagasi* (IC50 = 4,0 nM).

Para a avaliar os níveis de concentração de nitritos de sódio em sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados com *L. chagasi*. os efeitos da induções de NO pelas espécies utilizadas comparadas ao meio, DMSO (0,1%) e aos fármacos padrões (**Figura 11**).

Figura 11 - Efeito das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina no aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania chagasi*.



Fonte: Autor, 2020

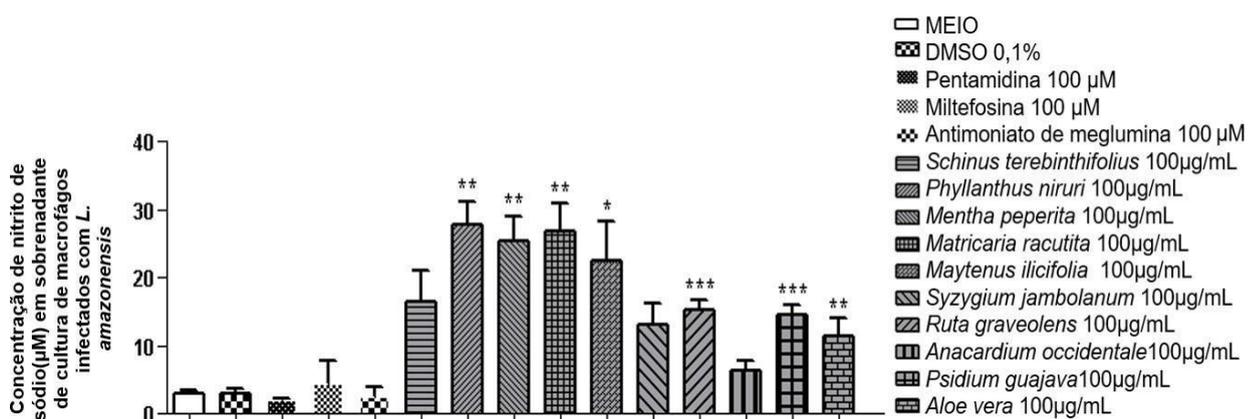
Os macrófagos estão presentes na resposta imune do hospedeiro à infecção de parasitos. De fato, essas células desempenham papéis prejudiciais no reconhecimento de patógenos, fagocitose do parasito e apresentação de antígenos, levando à ativação adicional de respostas imunes adaptativas. Espécies oxidantes como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O₂⁻) são produzidas após a fagocitose do patógeno por essas células como parte de sua maquinaria para responder a insultos prejudiciais (GLEESON,2016; KAUFMANN,2016; SALOMAO et al., 2012)

Após a obtenção dos dados através da análise produzida, nota-se na **Figura 11** que das plantas estudadas, *S. Jambolanum* (jamelão), *Anacardium occidentale* (cajuero) e *Aloe vera* (babosa) induziram significativamente o aumento dos níveis de

nitrito em cultura de macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*, uma concentração de 100 µg/mL. Logo, prediz-se que há maior liberação de óxido nítrico por essas plantas testadas.

A **Figura 12** representa os níveis de nitrito nos sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, estimuladas com 100 µg/mL das espécies vegetais. Ocorrendo diferenças significativa no aumento dos efeitos induzidos de NO quando comparadas ao meio, DMSO (0,1%) e aos fármacos padrões.

Figura 12. Efeito das espécies vegetais presentes na lista do RENISUS pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina no aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*.



Fonte: Autor, 2020

O tratamento dos macrófagos J774.A1 infectados com a forma amastigota de *L. amazonensis*, gerou um aumento significativo de NO para a maioria das espécies vegetais testadas, quando comparadas com os fármacos padrões pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina, destacando *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita* (menta), *Matricaria recutita* (camomila) e *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) *Psidium guajava* (goiabeira), *Ruta graveolens* (arruda) e *Aloe vera* (babosa).

ARRUDA et al, (2017), avaliou os efeitos do extrato de folhas de menta em macrófagos peritoneais de murino cultivados estimulados ou não com lipopolissacarídeo *in vitro*, obtendo respostas moduladoras inflamatórias mediadas por macrófagos, estimulando a via antioxidante nessas células (ARRUDA et al., 2017),

Os estudos relacionados às espécies vegetais utilizadas nesse trabalho para os efeitos de indução de NO em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* é escasso, validando a importância do mesmo para os estudos e desenvolvimentos de fármacos leishmanicida a partir de as plantas medicinais.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados adquiridos nesta pesquisa, conclui-se que nenhuma das plantas medicinais analisadas apresentaram efeito deletério para a célula hospedeira na concentração testada.

Além disso, a espécie vegetal *Aloe vera* apresentou atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. amazonensis*. Destacaram-se também *Phyllanthus niruri*, *Mentha piperita*, *Matricaria racutita*, *Psidium guajava*, *Ruta graveolens* e *Aloe vera*, as quais aumentaram a produção de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Entretanto, nenhuma extrato testado foi ativa contra *L. chagasi*, apesar de *Anacardium occidentale* e *Aloe vera* induzirem aumento de NO em cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi*.

Desta forma, é importante ressaltar a necessidade de se dar continuidade a esses estudos, que auxiliam à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos leishmanicida de origem natural para o Sistema único de Saúde, viabilizando a melhoria do paciente portador da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

ÁGUILA, LUIS et al. Relaxant effects of a hydroalcoholic extract of *Ruta graveolens* on isolated rat tracheal rings. **Biological research**, v. 48, n. 1, p. 28, 2015.

ALVES, CIBELE FONTES et al. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. **PLoS One**, v. 8, n. 5, 2013.

AL-DABBAGH, BAYAN et al. Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **BMC research notes**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2019.

ABDULLA, MAHMOOD AMEEN et al. Gastroprotective effect of *Phyllanthus niruri* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 226-230, 2010.

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, 2016.

ÁNGELES-LÓPEZ, GUADALUPE E. et al. Gastrointestinal activity of *Justicia spicigera* Schltdl. in experimental models. **Natural Product Research**, v. 2019 p. 1-5, 2019.

ASSIS, KÍVIA S. et al. Potassium Channel Activation Is Involved in the Cardiovascular Effects Induced by Freeze Dried *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC Fruit Juice. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

BATSATSASHVILI, Ketevan; KIKVIDZE, Zaal; BUSSMANN, Rainer (Ed.). **Ethnobotany of the Mountain Regions of Far Eastern Europe: Ural, Northern Caucasus, Turkey, and Iran**. Springer International Publishing, 2019.

BHATTA, ANIL et al. Obesity-induced vascular dysfunction and arterial stiffening requires endothelial cell arginase 1. **Cardiovascular research**, v. 113, n. 13, p. 1664-1676, 2017.

BRASIL. Ministério da saúde. **Leishmaniose Tegumentar (LT): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. PortalMS - Portal Principal de Notícias da Saúde - Ministério da Saúde.2017 Disponível em: < <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar> >. Acesso em: 20/12/2019

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviço. **Guia de vigilância em saúde: volume 3** Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde, departamento vigilância epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral** Brasília; Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde/SVS - **Sistema de Informação de Agravos de Notificação** – Sinan Net. Disponível em :< <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def> > . Acesso em: 17 de janeiro de 2020

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde; 2017 .

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em saúde: volume 3**. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde Epidemiol 2019 set50(n.esp.): (Número especial: Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2009: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais). Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>> acesso em 09 de janeiro de 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 210 p, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde Epidemiol 2019 set50(n.esp.): (Número especial: Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2009: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais). Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>> acesso em 09 de janeiro de 2020

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis**. The Lancet, V. 392, p 951-970. 2018.

CARDOZO, E. A. et al. Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Curren. Biotechnol.**, v.3, p 279-288. 2014.

CARLINI, ELISALDO A. et al. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites – Leishmaniasis. Biology. 2013. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>> Acesso: 15/01/2020.

CHATTO;PADHYAY, A.; JAFYRULLA, M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 416, n. 1-2, p. 7-12, 2011.

CORREIA, VANESSA CAROLINA DE SENA et al. Evaluation of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) extract. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 586-592, 2016.

DA SILVA OLIVEIRA, JOICE FRAGOSO, et al. Phytochemical profile and evaluation of antibacterial and cytotoxic activity of *Maytenus rigida* (Mart.) **extracts and fractions**. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n 7, p.746-751, 2016.

DELMONDES, G. DE A. ET AL. Avaliação Da Citotoxicidade e Atividade Leishmanicida e Tripanocida de extratos de *Passiflora Cincinnata* Mast L. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 88, p. 31–38, 2014.

DE ABREU VIZA, Gilson. PLANTAS MEDICINAIS E LEISHMANIOSE CUTÂNEA: UMA REVISÃO. **Revista Cereus** v. 11.n.4, p.84-98, 2019.

DE CARVALHO, LUCIANA SILVA; PEREIRA, KLEBER FERNANDO; DE ARAÚJO, EUGÊNIO GONÇALVES. Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 2, p. 147-157, 2015

DE QUEIROZ, Aline Cavalcanti et al. Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1- 9, 2014.

DÍAZ-DE-CERIO, ELIXABET et al. Health effects of *Psidium guajava* L. Leaves: An overview of the last decade. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 897, 2017.

DORLO, THOMAS 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.

DO ROSÁRIO, ANA CAROLINA DE ALMEIDA et al. Análise fitoquímica da espécie *Phyllanthus niruri* L.(quebra-pedra). **Estação Científica** (UNIFAP), v. 6, n. 1, p. 35-41, 2016.

DOS SANTOS, VANIA AFFM et al. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, 2013.

D'SOUSA'COSTA, CINARA OLIVEIRA et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts prepared from different tissues of *Schinus terebinthifolius* Raddi that occurs in the coast of Bahia, Brazil. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. 43, p. 607, 2015.

DUTRA, R.C.; et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research, London**, v. 112. P. 14-29, 2016

ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control. Phlebotomine sand flies- Factsheet for experts. Disponível em:< <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/phlebotomine-sand-flies>>. Acesso em: 15/01/2020

FERREIRA DE LIMA, FABIANO et al. Efecto de la ingestión de L-arginina en la hipotensión inducida por el ejercicio. **Nutrición Hospitalaria**, v. 35, n. 5, p. 1195-1200, 2018.

GLEESON, Laura E.; SHEEDY, Frederick J. Metabolic reprogramming & inflammation: fuelling the host response to pathogens. In: **Seminars in immunology**. **Academic Press**, 2016. p. 450-468.

GOMES, VÂNIA THAIS SILVA et al. Effects of *Matricaria recutita* (L.) in the treatment of oral mucositis. **The Scientific World Journal**, v. 2018, 2018.

GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 26, p. 309-322, 2012.

GUO, Xiaoqing; MEI, Nan. Aloe vera: A review of toxicity and adverse clinical effects. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 34, n. 2, p. 77-96, 2016.

HALDAR, A. K.; SEM, P.; ROY, S. Review Article. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**. V. 2011, p. 1-23, 2011.

HAN, JUNG YEON et al. Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (PdFRS) encoding a monofunctional friedelin synthase in *Populus davidiana*. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 95-111, 2019.

HERCULANO, EDLA de A. et al. Evaluation of cardiovascular effects of edible fruits of *Syzygium cumini* Myrtaceae (L) skeels in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 11, p. 1853-1861, 2014.

HURRELL, B. P. et al. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends Parasitol.**, v. 32, n. 5, p. 392-401, 2016

JIANG, CHANGXING et al. Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer activities in vitro of polysaccharides from *Cyclina sinensis*. **Carbohydrate polymers**, v. 84, n. 3, p. 851-857, 2011.

KAUFMANN, Stefan HE; DORHOI, Anca. Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions. **Immunity**, v 44.n 3, p. 476-491, 2016.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 604-651, 2011.

KALA, DURAN. Pharmacological Properties and Cytotoxic Effects of *Matricaria Chamomilla* Plant Extracts by MTT Assay. **International Journal of Social Sciences & Educational Studies**,v 1, n 2, p. 35, 2014

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections a Practical Review. **Dermatologic Clinics**. V.33, p. 579-593, 2015.

KHEZZANI, B.; BOUCHEMAL, S. Demographic and spatio-temporal distribution of cutaneous leishmaniasis in the Souf oasis (Eastern South of Algeria): Results of 13 years. **Acta Tropica**, v. 166, p. 74-80, 2017.

KUMAR, Birendra; SHUKLA, Ashutosh K.; SAMAD, A. Development and characterization of the menthofuran-rich inter-specific hybrid peppermint variety CIMAP-Patra. **Molecular breeding**, v. 34, n. 2, p. 717-724, 2014.

LEE, WEI CAI et al. Free radicals scavenging activity, cytotoxicity and anti-parasitic activity of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 16, n. 1, p. 32-38, 2013.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v. 2, p. 83, 2012.

LUCA, V. D. DE et al. Utilização de plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra Furada , Santa Catarina , Brasil : uma abordagem etnobotânica. **Revista Brasileira de Biociências**, V. 2, n. 2 p. 59–65, 2014.

MACHADO, Antonio JT et al. Antiparasitic effect of the *Psidium guajava* L.(guava) and *Psidium brownianum* MART. EX DC.(araçá-de-veado) extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 275-280, 2018.

MANS, D. R. A., et al. In vitro evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. **Journal of ethnopharmacology**, v.180 p. 70-77, 2016.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.50 n.5, p. 341-352, 2013.

MARTINS, Ana Cristina da Costa. Percepção do risco de zoonoses em pacientes atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, Brasil. **Oficina do CES**, v. 412, p. 1-39, 2014.

MARTINS, G. A. S.; LIMA, M. D. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. **Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 9, n. 16, p. 2556-2569, 2013.

MATUTINO BASTOS, TANIRA et al. Chemical constituents of *Anacardium occidentale* as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* sirtuins. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1299, 2019.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MORAIS, Thiago R. et al. Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): structure/activity relationships. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5761-5776, 2014.

NAGLE, A. S. et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**. V. 114, p. 11305-11347, 2014.

NARAYANAN, S. PRIYA et al. Arginase in retinopathy. **Progress in Retinal and eye Research**, v. 36, p. 260-280, 2013.

Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: **Informe Epidemiológico nas Américas**: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2019
Disponível em: <www.paho.org/leishmaniasis>. Acesso em: 14, jan de 2020.
OPAS/OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses, v. 2, p. 1–4, 2016.

PANDEY, R.K. et al. Differential Expression of miRNA Regulates T Cell Differentiation and Plasticity During Visceral Leishmaniasis Infection. **Front. Microbiol.**, v. 7, p.206, 2016

PATIL, R. S. et al. Synthetic and Natural Products Against Leishmaniasis: **A Review**. **World J. Publ. Health. Sci.** v.1, n. 1, p. 7-22, 2012.

PATEL, JAY RAM et al. Phyllanthus amarus: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 286-313, 2011.

PAVARINI, DANIEL PETINATTI ET al. Ecological Insights to Track Cytotoxic Compounds among Maytenus ilicifolia Living Individuals and Clones of an Ex Situ Collection. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1160, 2019.

PEREIRA-CARVALHO, R. et al. Leishmania braziliensis-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.

PICCINELLI, ANA CLAUDIA et al. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene, α -phellandrene, and essential oil from Schinus terebinthifolius fruits in a neuropathic pain model. **Nutritional neuroscience**, v. 18, n. 5, p. 217-224, 2015.

PINTO, Leandra; VARGAS, Elisa. leishmania" reflexões sobre o manejo do mundo em contextos de risco sanitário" leishmania" reflections on the world management in health risk contexts. vivência: **Revista de Antropologia**, v. 1, n. 49, p. 121-134, 2017.

PORTO, CÍNTIA RC ET al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Phyllanthus niruri spray-dried standardized extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 138-144, 20

PHAM, T. T. H.; LOISEAU, P. M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 539–552, 2013.

QUEIRÃO, ANDREYNNA LIMA et al. a toxicidade das drogas empregadas no tratamento de leishmaniose e tripanossomíase americana. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 4, n. 1, 2019.

RAJENDRAN, SARANYA et al. Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Regulation of Ischemic Vascular Growth and Remodeling. **Comprehensive Physiology**, v. 9, n. 3, p. 1213-1247, 2011.

RAHAYU, RETNO PUDJI et al. Cytotoxicity of Combination Chitosan with Different Molecular Weight and Ethanol Extracted Aloe vera using MTT Assay. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, v. 217, n 1,p 2018.

RIBEIRO, RACHEL MELO et al. Antihypertensive effect of *Syzygium cumini* in spontaneously hypertensive rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

SALOMAO, Reinaldo, et al. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. **Shock**, v.38, n.3, p. 227-242, 2012.

SAMPAIO, OLÍVIA MOREIRA et al. evaluation of alkaloids isolated from *Ruta graveolens* as photosynthesis inhibitors. **MOLECULES**, V. 23, N. 10, P. 2693, 2018.

SALEHI, BAHARE et al. Anacardium Plants: Chemical, Nutritional Composition and Biotechnological Applications. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 465, 2019.

SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 16, n. 9, p. 581-92, 2016.

SEMERDJIEVA, IVANKA B. et al. Essential Oil Composition of *Ruta graveolens* L. Fruits and *Hyssopus officinalis* Subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman Biomass as a Function of Hydrodistillation Time. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4047, 2019.

SILVA, EDILAINE GODOI et al. a enfermagem e a sistematização do atendimento ao portador da leishmaniose tegumentar americana. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 9, n. edesp, p. 507-511, 2018.

SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, p. 9–20, 2008

SHARAFI, SEYEDEH MARYAM et al. Protective effects of bioactive phytochemicals from *Mentha piperita* with multiple health potentials. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, n. 23, p. 147, 2010.

SINGH, Sarman; SIVAKUMAR, Ramu. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

STRONPPA, P.H.F; et al. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Rev. Química Bioorganica e Medicinal**. V, 25, n, 12, p. 3034-3045,2017;

TAJEBE, FITSUMBRHAN et al. Disease severity in patients with visceral leishmaniasis is not altered by co-infection with intestinal parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 5727, 2017.

TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLOS Pathogens**. V.9, n. 10, p. 1- 4 2013.

TRUJILLO-CORREA, ANDREA ISABEL et al. In vitro and in silico anti-dengue activity of compounds obtained from *Psidium guajava* through bioprospecting. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 298, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, **World Health Organization**, v1 p22-26, 2010.