

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

**EFEITOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE TRÊS ESPÉCIES DE *TRICHILIA* P.
BROWNE (MELIACEAE) CONTRA *LEISHMANIA AMAZONENSIS IN VITRO***

MARYANA LYRA DA CONCEIÇÃO

CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ
SETEMBRO 2023

**Efeitos dos extratos aquosos de três espécies de *Trichilia* P. Browne (Meliaceae)
contra *Leishmania amazonensis* *in vitro***

MARYANA LYRA DA CONCEIÇÃO

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, com ênfase em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Edésio José Tenório de Melo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ
SETEMBRO 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C744 Conceição, Maryana Lyra da.

Efeitos dos extratos aquosos de três espécies de *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) contra *Leishmania amazonensis in vitro* / Maryana Lyra da Conceição. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

49 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.
Orientador: Edesio Jose Tenorio de Melo.

1. Composto Natural. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. *Trichilias*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**Efeitos dos extratos aquosos de três espécies de *Trichilia P. Browne* (Meliaceae)
contra *Leishmania amazonensis in vitro***

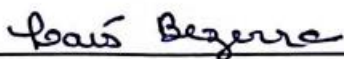
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, com ênfase em Biologia Celular.

Aprovada em 01 de Setembro de 2023.

Comissão examinadora:



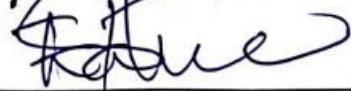
Prof. Dr. Franz Viana Borges – IFF Campus Campos Centro



Dr. Laís de Almeida Bezerra - UENF



Dr. Saulo Pireda Fernandes - UENF



Prof. Dr. Edésio José Tenório de Melo (orientador) - UENF

Dedico este trabalho aos meus pais,
Nádia e Valmir, a minha avó Maria,
por todo apoio que me deram e,
por acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ser a minha força e o meu refúgio. Sem Ele eu não conseguiria chegar até aqui.

A meus pais, Nádía e Valmir, por todo amor, suporte e incentivo a minha vida acadêmica e profissional; por estar sempre ao meu lado em todas as minhas decisões me apoiando e incentivando.

A minha avó Maria, por ser a minha fonte de inspiração a ser uma mulher forte e determinada.

A toda a minha família, por todo carinho e apoio. Em especial, aos meus irmãos Valmir Júnior, Wagner e Ana Paula (*in memoriam*); meus sobrinhos Felipe Gabriel, Matheus, Giulia e Andrezza.

A minha amiga Letícia Pedra, pela amizade e por compartilhar a rotina de laboratório comigo.

Ao professor Edésio Melo, pela orientação e ensinamentos durante todo este período.

Ao revisor e à banca pelas correções e sugestões.

A todos os professores e técnicos do LBCT, que me auxiliaram de certa forma.

A meus amigos que estiveram presentes na minha vida, me apoiando, ajudando e comemorando sempre pelas minhas realizações.

À UENF e as agências de fomento, FAPERJ e CAPES.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Leishmanioses – características gerais.....	12
1.1.1 <i>Leishmania Visceral (LV)</i>	12
1.1.2 <i>Leishmania Tegumentar (LTA)</i>	13
1.2 Aspectos morfológicos de <i>Leishmania sp.</i>	15
1.3 Ciclo biológico.....	17
1.4 Cultivo de amastigotas axênicas.....	19
1.5 Tratamento.....	20
1.6 Compostos naturais como potenciais quimioterápicos.....	22
1.7 <i>Trichilias</i>	23
2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Cultivo de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	27
4.2 Cultivo de amastigotas axênicos.....	27
4.3 Preparação e Tratamento dos Extratos Brutos.....	27
4.4 Quantificação e observação estrutural por microscopia óptica.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Curva de crescimento de <i>Leishmania amazonensis</i>	29
5.2 Efeitos tóxicos e morfológicos de <i>Trichilia casaretti</i> contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	29
5.3 Efeitos tóxicos e morfológicos de <i>Trichilia lepidota</i> contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	31
5.4 Efeitos tóxicos e morfológicos de <i>Trichilia hirta</i> contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	33
5.5 Curva de crescimento de amastigotas axênicos de <i>Leishmania amazonensis</i>	35

5.6 Efeitos de <i>Trichilia casaretti</i> contra amastigotas axênicos de <i>Leishmania amazonensis</i>	36
5.7 Efeitos de <i>Trichilia lepidota</i> contra amastigotas axênicos de <i>Leishmania amazonensis</i>	37
5.8 Efeitos de <i>Trichilia hirta</i> contra amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	38
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO.....	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos notificados de Leishmaniose cutânea nas Américas.....	13
Figura 2. Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, 1980 a 2021.....	14
Figura 3. Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	15
Figura 4. Representação esquemática de formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>Leishmania spp.</i> e suas principais organelas.....	16
Figura 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão das formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de <i>Leishmania sp.</i>	16
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura dos principais estágios do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> , Promastigotas pro-cíclicos, promastigotas metacíclicos e amastigotas.....	18
Figura 7. Ciclo de vida <i>Leishmania</i>	19
Figura 8. Representação esquemática dos antimônios pentavalentes: Pentostam e Glucantime, respectivamente.....	21
Figura 9. Curva de Crescimento de <i>L. amazonensis</i>	29
Figura 10. Ação de <i>Trichilia casaretti</i> contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> nas concentrações	30
Figura 11. Principais alterações morfológicas de <i>Trichilia casaretti</i>	31
Figura 12. Ação de <i>Trichilia lepidota</i> contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL	32
Figura 13. Principais alterações morfológicas de <i>Trichilia lepidota</i>	33

Figura 14. Ação de <i>Trichilia hirta</i> contra promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL	34
Figura 15. Principais alterações morfológicas de <i>Trichilia hirta</i>	35
Figura 16. Diferenciação promastigotas – amastigotas axênicos.....	36
Figura 17. Ação de <i>Trichilia casaretti</i> contra amastigotas axênicos de <i>Leishmania amazonensis</i> nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL	37
Figura 18. Ação de <i>Trichilia lepidota</i> contra amastigotas axênicos de <i>Leishmania amazonensis</i> nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL	38
Figura 19. Ação de <i>Trichilia hirta</i> contra amastigotas axênicos de <i>Leishmania amazonensis</i> nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL	39

RESUMO

Leishmania amazonensis, agente etiológico da leishmaniose tegumentar, é um protozoário flagelado parasita intracelular obrigatório de fagócitos profissionais. A quimioterapia utilizada para os portadores da doença consiste em antimônios pentavalentes, como Pentostam e Glucantime, porém, o desenvolvimento de resistência, alta toxicidade desses compostos e o longo tempo de tratamento são fatores que limitam e afetam o combate clínico a leishmaniose. Assim, o estudo e desenvolvimento de novos compostos, inclusive os naturais, contra infecção por *Leishmania amazonensis* é fundamental para um possível e urgente emprego de uma nova quimioterapia. O estudo de compostos naturais tem aumentado significativamente devido as vantagens apresentadas como baixo custo e princípios ativos com potencial terapêutico. Os compostos originados das plantas das famílias *Meliceae* foram utilizados em vários estudos devido às suas propriedades antifúngicas, antivirais e antiparasitárias. Desta forma, o presente trabalho testou os efeitos tóxicos de três diferentes concentrações de extratos aquosos de folhas de *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta* contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*. Nossos resultados mostraram que os extratos podem estar interferindo no processo replicativo destes parasitas, relacionada a atividade antileishmanicida levando a eliminação dos parasitos e progressivas alterações na sua morfologia, com aspecto arredondado, ausência de flagelo e em dupla.

Palavras-chave: Composto Natural. *Leishmania amazonensis*. *Trichilias*.

ABSTRACT

Leishmania amazonensis, the etiological agent of cutaneous leishmaniasis, is a flagellated protozoan that is an obligate intracellular parasite of professional phagocytes. The chemotherapy used for those with the disease consists of pentavalent antimonials, such as Pentostam and Glucantime, however, the development of resistance, high toxicity of these compounds and the long treatment time are factors that limit and affect the clinical fight against leishmaniasis. Thus, the study and development of new compounds, including natural ones, against *Leishmania amazonensis* infection is essential for the possible and urgent use of a new chemotherapy. The study of natural compounds has increased significantly due to the advantages presented such as low cost and active ingredients with therapeutic potential. Compounds originating from plants in the *Meliceae* family have been used in several studies due to their antifungal, antiviral and antiparasitic properties. Thus, the present work tested the toxic effects of three different concentrations of aqueous extracts of leaves of *Trichilia casati*, *Trichilia lepidota* and *Trichilia hirta* against promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Our results showed that the extracts may be interfering with the replicative process of these parasites, related to the antileishmanicidal activity, leading to the elimination of the parasites and progressive changes in their morphology, with a rounded appearance, absence of flagellum and double.

Keywords: Natural Compost. *Leishmania amazonensis*. *Trichilias*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses – características gerais

A Leishmaniose é uma doença causada por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, filo *Sarcomastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família Trypanosomatidae (OPAS, 2023).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023), 350 milhões de pessoas no mundo residem em áreas consideradas de risco de contrair a Leishmaniose, tendo cerca de 1 milhão de novos casos por ano, o que a torna uma das doenças infecciosas mais importantes e que vem sendo negligenciada (WHO, 2023).

A principal forma de transmissão se dá através da picada do inseto vetor flebotomíneo, dípteros da subfamília *Phlebotominae*, representados por dois gêneros: *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo, durante seu repasto sanguíneo em um mamífero infectado (VASCONCELOS *et al.*, 2018). Esses insetos são pequenos, medindo de um a três milímetros, com coloração clara e hábitos crepusculares. No Brasil, são popularmente conhecidos como: “mosquito palha”, “birigui”, “flebótomo”, “asa dura”, “asa branca”, “cangalhinha” ou “provarinho. Estas nomenclaturas estão relacionadas as suas características físicas ou comportamentais e dependem da região geográfica em que o inseto se encontra (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

De acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose do Ministério da Saúde, a ocorrência da doença baseia-se em regiões tropicais e subtropicais, e fatores como urbanização, mudanças climáticas, desmatamento, influenciam para a sua propagação (BRASIL, 2017).

As principais subdivisões clínicas da Leishmaniose são: Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar (TAHGHIGHI, 2014).

1.1.1 *Leishmania* Visceral (LV)

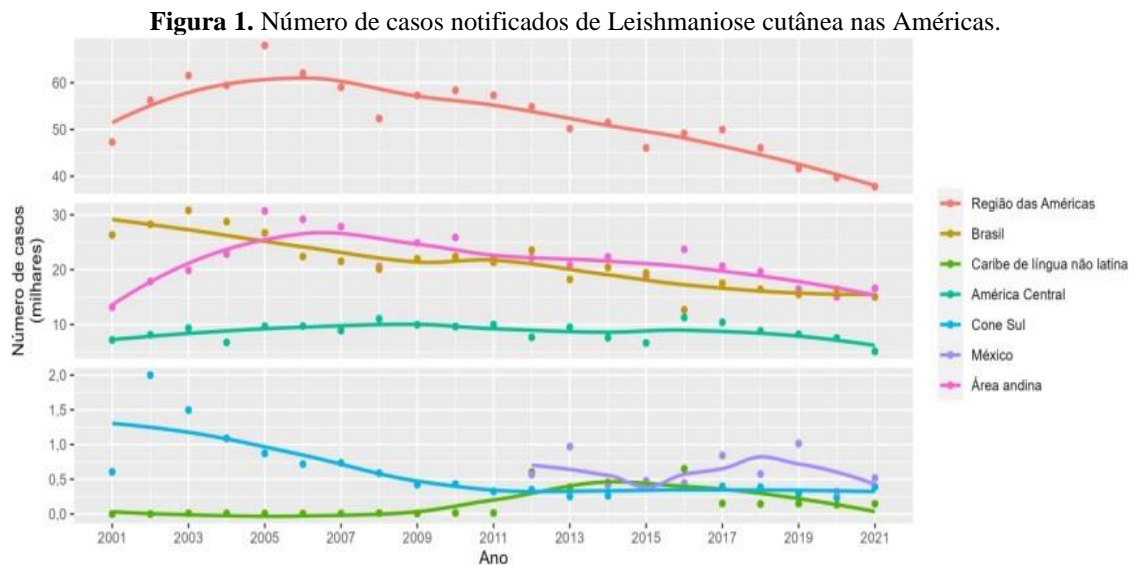
A Leishmaniose Visceral também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica e letal quando não tratada adequadamente que pode permanecer assintomática ou após um período de incubação de 2-4 meses, apresentar sintomas como episódios irregulares de febre, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia (MURRAY *et al.*, 2005).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, a Leishmaniose Visceral é endêmica em 76 países. Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que a maior parte dos casos notificados que ocorrem no Brasil estão na Região Nordeste (BRASIL, 2006).

No Brasil, as espécies causadoras fazem parte do complexo *Leishmania donovani* e são classificadas em duas espécies: *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi* (MURRAY *et al.*, 2005).

1.1.2 Leishmania Tegumentar Americana (LTA)

A Leishmaniose Tegumentar é considerada a forma mais comum da infecção, tendo distribuição mundial em 89 países, sendo endêmica nas Américas, com maiores números notificados de casos no Brasil, na Colômbia e no Peru. Segundo o Informe Epidemiológico, na região das Américas em 2021, foram notificados 37.786 casos de leishmaniose cutânea, dos quais 22,5% ocorreram em áreas de fronteira (Figura 1) (OPAS, 2023).

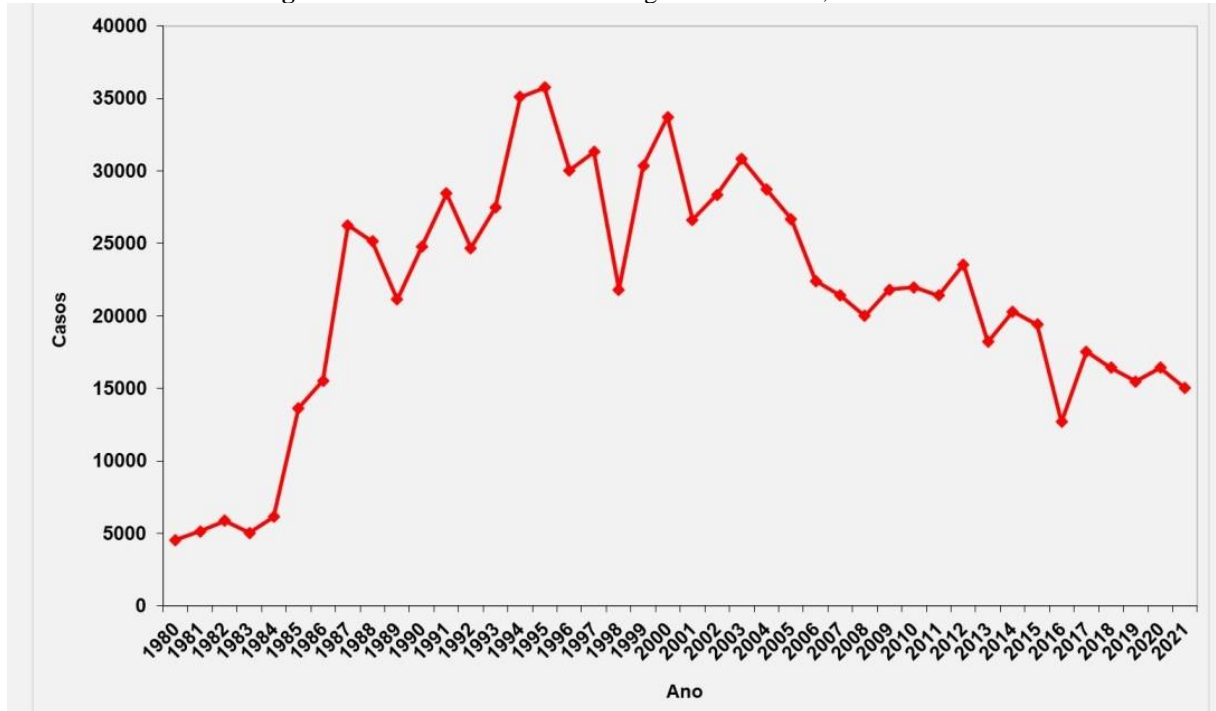


Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde. Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas. OPAS, 2022.

No Brasil, há sete espécies de leishmanias envolvidas na ocorrência de casos de Leishmaniose Tegumentar. As mais importantes são: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A forma cutânea é causada principalmente por *Leishmania amazonensis* (OPAS, 2023).

De acordo com a OPAS, no período de 2001 a 2021, um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram notificados (**Figura 2**) correspondendo a uma média de 52.645 casos por ano (OPAS, 2023).

Figura 2. Casos de Leishmaniose tegumentar. Brasil, 1980 a 2021



Fonte: Ministério da Saúde, 2021.

A Leishmaniose Tegumentar em modo geral, apresenta diversas manifestações clínicas, podendo afetar pele e mucosas, variando entre lesões únicas e múltiplas. Suas principais manifestações patológicas são: leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea e leishmaniose cutânea difusa (**Figura 3 A, B e C**) (TAHGHIGHI, 2014).

A Leishmaniose cutânea (**Figura 3A**) é a forma mais comum e baseia-se em lesões únicas na pele que podem aumentar de tamanho e evoluir para úlceras com fundo granuloso após o período de incubação de 1-12 semanas. É causada principalmente por *Leishmania amazonensis* (MURRAY *et al.*, 2005).

A Leishmaniose muco-cutânea (**Figura 3B**) é a manifestação mais severa da LTA e possui difícil tratamento. Caracteriza-se por ocasionar infiltração, ulceração e, principalmente, danos nos tecidos da cavidade nasal, faringe ou laringe, podendo ocasionar complicações respiratórias graves, levando o paciente à óbito. É causada principalmente por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (HEPBURN, 2000).

A Leishmaniose cutânea difusa ou LCD (**Figura 3C**) é uma forma rara, porém grave, de apresentação da doença. No Brasil, o agente etiológico responsável pelo LCD é a *Leishmania amazonensis*. Essa manifestação clínica inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e evolui com formação de placas e múltiplos nódulos não ulcerados por todo o corpo do paciente (REITHINGER *et al.*, 2007).

Figura 3. Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. Leishmania cutânea (A), Leishmania muco cutânea (B) e Leishmania Difusa (C).



Fonte: (A) Salazar e Castro, 2001 / (B) Martins *et al.*, 2011 / (C) Costa *et al.*, 2009

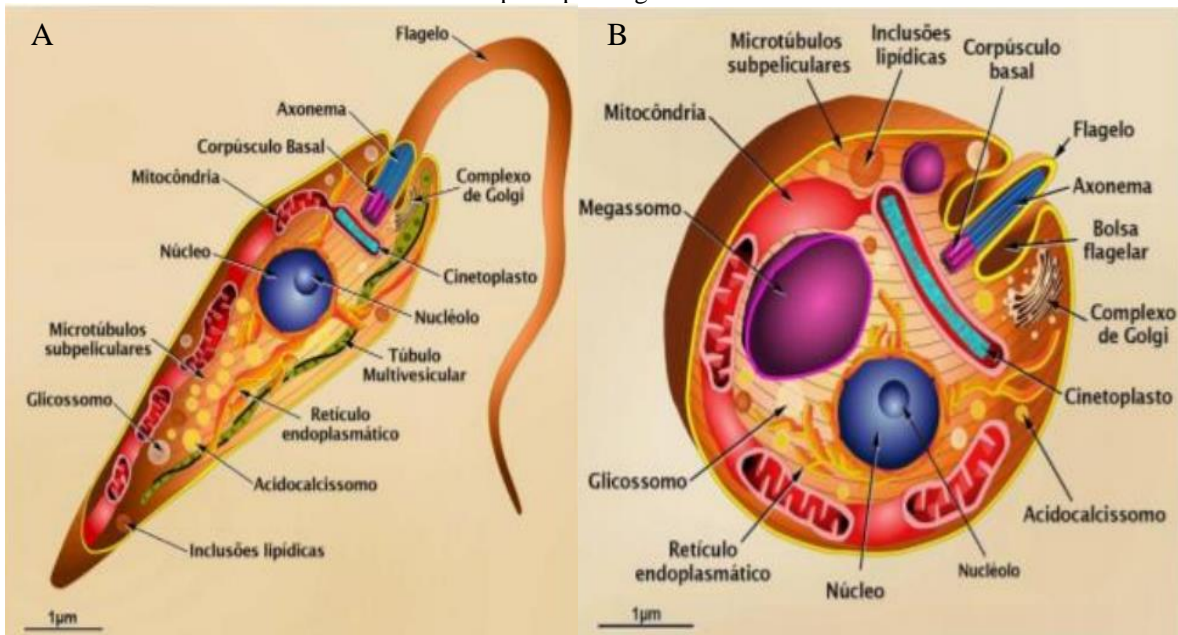
1.2 Aspectos morfológicos de *Leishmania sp.*

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem ao filo *Sarcomastigophora*, ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* (KAMHAWI, 2006). Apresentam duas formas distintas em seu ciclo de vida: as formas flageladas promastigotas, encontradas no tubo digestivo do inseto vetor; e as formas amastigotas, um estágio observado nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2017).

As formas promastigotas são alongadas, medem cerca de 5-20 μm de comprimento por 1-4 μm de largura, possuem aspecto fusiforme e flagelo único (**Figuras 4 A e 5 A**). Já as formas amastigotas são arredondadas e medem cerca de 2-4 μm de comprimento (**Figuras 4 B e 5 B**).

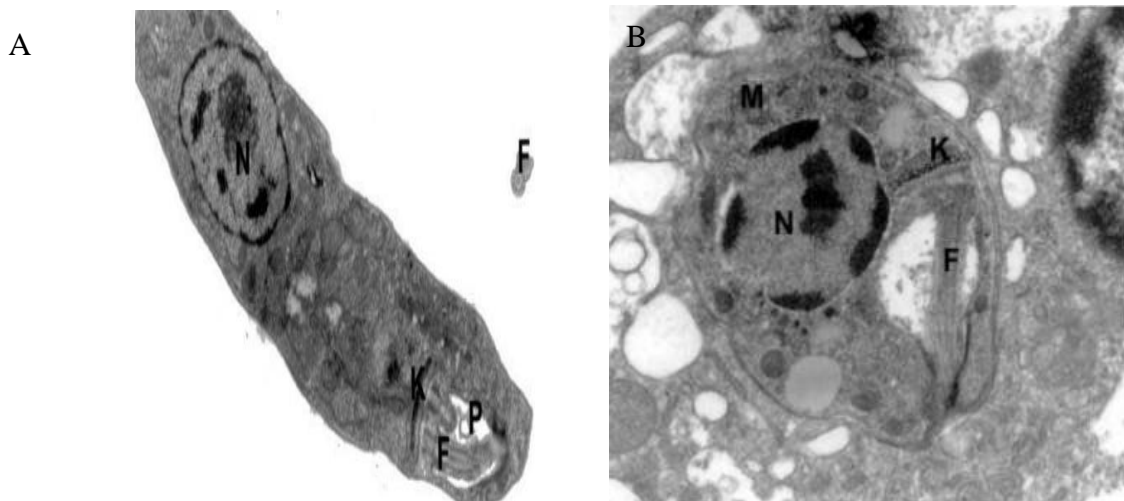
A bolsa flagelar é o local onde ocorre o transporte de vesículas tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas (VANNIER SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002).

Figura 4. Representação esquemática de formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania spp.* e suas principais organelas.



Fonte: Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013.

Figura 5. Microscopia Eletrônica de Transmissão das formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *Leishmania sp.* e suas principais organelas identificadas como (N) - Núcleo, (K) – cinetoplasto, (P) – bolsa flagelar, (F) – flagelo e (M) – megassomos (amastigotas).



Fonte: Retirado de Vannier Santos; Martiny; Souza, 2002.

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem, além das organelas presentes nas células eucarióticas, algumas organelas particulares como: megassomos, acidocalcissomos, glicossomos e cinetoplasto.

Os megassomos são organelas ricas em cisteíno proteinases cuja função principal está relacionada à degradação de macromoléculas endocitadas (VANNIER SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002).

Os acidocalcissomos são organelas responsáveis por armazenar e transportar íons como Cálcio, Magnésio e Zinco. Estão envolvidos na resposta à estresses, como pressão osmótica e mudanças de pH e, encontram-se altamente presentes durante o processo de metaciclologênese (VANNIER SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002).

Os glicossomos são organelas globulares que compartimentaliza vias metabólicas, responsáveis por gerar ATP, como a via glicolítica. Além disso, vias como β -oxidação de ácidos graxos, biossíntese de pirimidina e recuperação de purinas são exemplos de outros processos metabólicos que acontecem nesta organela (VANNIER SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002).

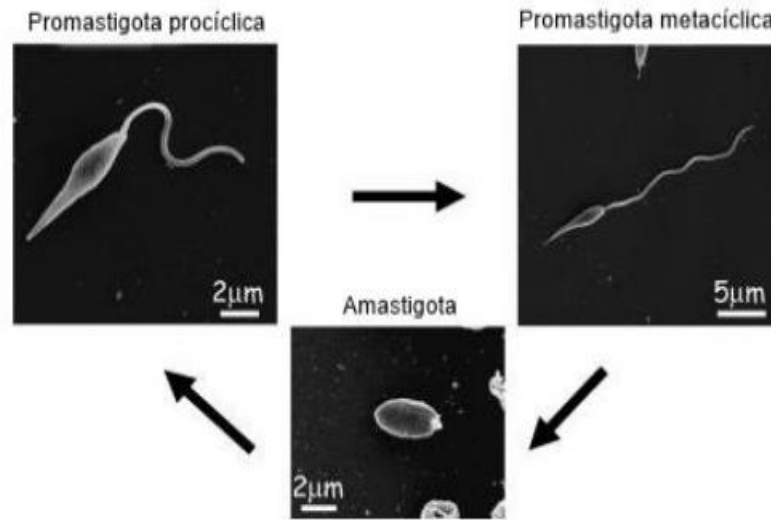
O cinetoplasto se localiza em uma região vizinha do corpo basal do flagelo e tem a função de sintetizar e armazenar uma molécula de DNA presente na mitocôndria. Além disso, é importante nos processos de transcrição, recombinação e segregação cromossômica (VANNIER SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002).

1.3 Ciclo biológico

O parasito possui um ciclo heteróxico que envolve dois hospedeiros distintos: os hospedeiros invertebrados, que são dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, representados pelos Gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* e, os hospedeiros vertebrados, como homem e outros mamíferos, onde são encontradas formas promastigotas e amastigotas (intracelulares) em fagócitos profissionais (TAHGHI, 2014).

Este ciclo de vida complexo apresenta diversas formas evolutivas, sendo as três principais: promastigota pró-cíclico, promastigota metacíclico e amastigota (**Figura 6**).

Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura dos principais estágios do ciclo de vida de *Leishmania*. Promastigotas pro-cíclicos, promastigotas metacíclicos e amastigotas.



Fonte: Adaptado de Besteiro *et al.*, 2007.

O ciclo biológico (**Figura 7**) do hospedeiro vertebrado envolve o flebotomíneo, vetor da Leishmaniose, que adquire os parasitas na forma promastigota através da picada da fêmea durante seu repasto sanguíneo em um mamífero infectado (BATES e ROGERS, 2004).

No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas infectam células fagocíticas profissionais como, células dendríticas, neutrófilos e principalmente, macrófagos, através do processo de internalização via fagocitose, formando um vacúolo parasitóforo com características endocíticas. Este vacúolo possui moléculas responsáveis pela destruição de microrganismos, mas, é o local onde o parasita se instala, se diferencia para a forma amastigota e multiplicam-se por fissões binárias sucessivas até a ruptura da membrana plasmática do macrófago, liberando estas formas amastigotas no tecido (BATES e ROGERS, 2004).

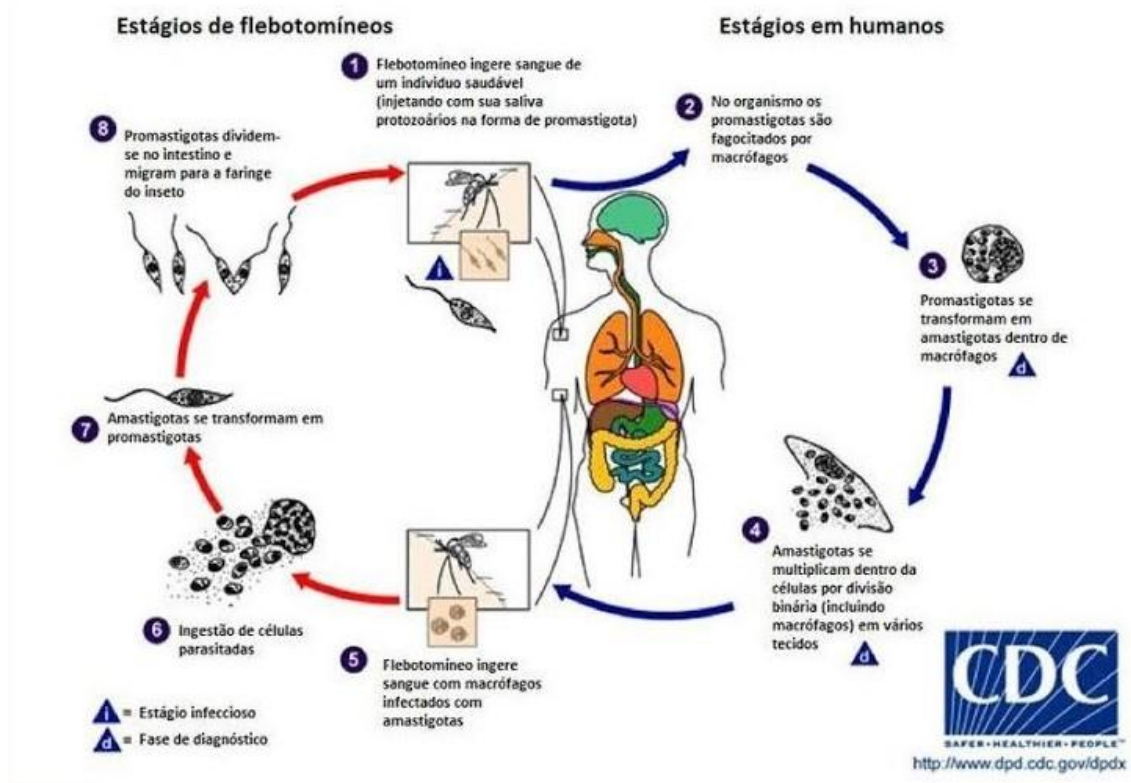
As formas amastigotas desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter a capacidade microbicida celular, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e se multiplicar no interior de macrófagos (REITHINGER *et al.*, 2007). Após a replicação, podem invadir novos macrófagos ou podem ser ligados ao ambiente do vetor durante o repasto sanguíneo (MURRAY *et al.*, 2005).

A infecção no inseto flebotomíneo ocorre quando a fêmea pica um mamífero infectado e ingere macrófagos contendo formas amastigotas. Estas formas amastigotas são conduzidas para o trato digestório do vetor, onde se diferenciam em promastigotas pro-cíclicos. Os promastigotas pro-cíclicos migram para a o epitélio do trato digestório.

No interior do vetor, as formas promastigotas se multiplicam por fissões binárias ao longo do tubo digestivo e migram para a região anterior. Na porção anterior, os promastigotas

passam por um processo denominado metaciclo, onde são extremamente móveis, apresentam redução do corpo celular e comprimento do flagelo, tornando-se altamente infectivos, sendo assim denominados de promastigotas metacíclicas. Posteriormente, essas formas promastigotas metacíclicas migram para a probóscide e são regurgitadas, sendo transmitida a um novo hospedeiro vertebrado, recomeçando o ciclo (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Figura 7. Ciclo de vida *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de CDC, 2017.

1.4 Cultivo de amastigotas axênicas

As formas amastigotas possuem formato arredondado e ausência de flagelo. As amastigotas sobrevivem e se desenvolvem em ambientes acidófilos onde se adaptam e se abrigam no ambiente intracelular (ANTOINE *et al.*, 1998).

Vários métodos para diferenciação de promastigotas em amastigotas axênicas foram propostas desde a década de 1980, principalmente para os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (BATES *et al.*, 1992; ROCHETTE *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2012; CHANMOL *et al.*, 2019).

A primeira tentativa de cultivo axênico de amastigotas foi descrito e realizado por PAN, em 1984, através da elevação da temperatura de 23 °C para 35 °C para estimular a diferenciação em *Leishmania mexicana* (PAN, 1984).

Vários pesquisadores tem aperfeiçoado metodologias para a obtenção de amastigotas axênicos de diversas espécies de *Leishmania*, incluído na metodologia diferenças de temperatura, pH e adição de nutrientes posteriormente específicos nos meios de cultura para estimular a diferenciação (TEIXEIRA *et al.*, 2002; DEBRABANT *et al.*, 2004; GUPTA, GOYAL, RASTOGI; 2001; DIAS LOPES *et al.*, 2021). As condições ideais para ativar a diferenciação *in vitro* de amastigotas axênicos variam entre pH ácido e alternância da temperatura em diferentes espécies e cepas de *Leishmania*. No entanto, as condições de cultivo devem ser padronizadas para cada novo isolado a ser estudado (GUPTA, GOYAL, RASTOGI; 2001).

Crítérios biológicos, bioquímicos e moleculares como a infectividade e expressão gênica diferencial tem sido importantes para confirmar a semelhança de amastigotas axênicos com os amastigotas intracelulares. Em *Leishmania sp.*, a forma promastigota desempenha uma função essencial para a transformação em amastigotas, como foi demonstrado por CYSNE em 1998 com *Leishmania amazonensis*, demonstrando a importância e necessidade de promastigotas como a população inicial para a transformação em amastigotas de *L. amazonensis* (CYSNE *et al.*, 1998; GUPTA, GOYAL, RASTOGI; 2001).

As formas amastigotas estão relacionadas a todas as manifestações clínicas da doença no hospedeiro vertebrado. Sendo assim, o estabelecimento de culturas axênicas de amastigotas de *Leishmania* é importante para entender os mecanismos de sobrevivência, patogenicidade e os mecanismos que regulam a sua diferenciação (CHANG, 1980).

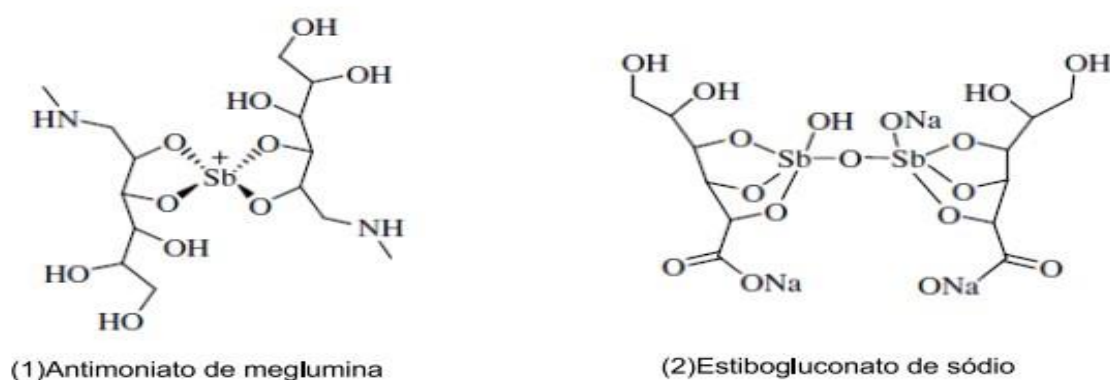
O cultivo *in vitro* de amastigotas é considerado confiável, porque fornece fonte ilimitada de organismos viáveis livres da contaminação de componentes derivados do hospedeiro (GUPTA, GOYAL, RASTOGI; 2001). Além disso, torna-se extremamente importante e adequado utilizar esta fase do ciclo de vida do parasita para identificar e desenvolver alvos moleculares e quimioterápicos (CHANG, 1980), principalmente para a utilização na triagem de novos compostos leishmanicidas (GUPTA *et al.*, 1996).

1.5 Tratamento

Atualmente, dois complexos de fármacos antimoniais pentavalentes como, Pentostan (estibogluconato de sódio) e Glucantime (antimoniato de N-metil glucamina), (**Figura 8**) são

indicações terapêuticas de primeira escolha para o tratamento em todas as formas clínicas das leishmanioses. No entanto, quando a utilização destes fármacos apresenta baixa eficácia, são utilizados antibióticos como a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, a miltefosina e a pentamidina. Porém, todos estes medicamentos podem ocasionar diversos efeitos colaterais, além de apresentar toxicidade e possível surgimento de resistência por parte do parasito (SANTIAGO *et al.*, 2021).

Figura 8. Representação esquemática dos antimônios pentavalentes: Glucantime e Pentostam, respectivamente.



Fonte: Carvalho *et al.*, 2015.

Os antimoniais foram introduzidos no Brasil em 1912 por Gaspar Viana na sua fórmula trivalente (SbIII) porém, foram substituídos pelos antimônios pentavalentes (SbV) em 1945, com o intuito de diminuir efeitos secundários severos (HENDRICKX, CALJON, MAES; 2019).

O antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime) é o fármaco comercializado no Brasil. Apresenta-se comercialmente em frascos de 5mL que contém 1,5g do antimoniato bruto, correspondendo a 405mg de SbV. Portanto, uma ampola com 5mL corresponde a 405mg de SbV e cada mL contém 81mg de Sb+5. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb+5/kg/dia (BRASIL, 2017).

O mecanismo de ação dos antimônios se dá através da inibição de enzimas como tripanotona redutase (TR) presentes nos protozoários da família Trypanosomatidae, responsável pelo metabolismo redox do tiol, sendo essencial para a sua manutenção de vida, induzindo a apoptose nos parasitos e agindo como um antioxidante parasitário de defesa ao estresse oxidativo do hospedeiro (TIWARI *et al.*, 2018). Além disso, também é responsável por inibir a atividade da enzima topoisomerase (importante para a homeostase do DNA), encontrada no núcleo e na mitocôndria da *Leishmania* (SUN *et al.*, 2020). Uma outra proposta de

mecanismo de ação se dá pela inibição da adenosina trifosfato (ATP) e da guanosina trifosfato (GTP) através da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise (KOFF e ROSEN, 1994).

Apesar de serem utilizados como primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose, os antimônios apresentam algumas desvantagens devido à sua longa duração de tratamento, dificuldades de administração (via de administração intramuscular), alto custo, além de apresentarem efeitos adversos como dor abdominal, febre, mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal (SILVA-LÓPEZ, 2010; HENDRICKX; CALJON; MAES, 2019).

Os fármacos de segunda escolha também apresentam toxicidade, efeitos colaterais e alto custo. A anfotericina B não apresenta boas propriedades físico-químicas, é fracamente absorvida e possui baixa biodisponibilidade oral, sendo exclusivamente via intravenosa. A Miltefosina, possui administração via oral, porém pode causar problemas gastrointestinais e renais severos. A pentamidina tem apresentado casos de resistência e efeitos graves, como diabetes *mellitus* (SANTIAGO *et al.*, 2021).

Devido a todas estas falhas apresentadas pelos fármacos atuais utilizados como fonte de tratamento da Leishmaniose, o estudo de novos compostos de fontes naturais e/ou sintéticos tem se tornado importante para adquirir novas alternativas terapêuticas que apresente baixa toxicidade e alta especificidade.

1.6 Compostos naturais como potenciais quimioterápicos

A utilização das plantas medicinais com o intuito de prevenir e tratar algumas enfermidades é de extrema importância na medicina tradicional (WANG *et al.*, 2020).

A busca por novas atividades antimicrobianas tem aumentado significativamente devido à resistência as drogas de patógenos humanos (STROBEL e DAISY, 2003). Devido a este fator, extratos naturais de plantas com baixo custo e que possuem compostos ativos eficientes estão sendo cada vez mais estudados e pesquisados para um possível controle biológico (HARIKRISHNAN, BALASUNDARAM, HEO; 2011).

O extrato aquoso de plantas é utilizado na primeira etapa de efeitos biológicos. Além disso, apresenta vantagens como: preservação das substâncias aromáticas, baixa densidade, alta permeabilidade em membranas e baixa toxicidade (COWAN, 1999).

Alguns compostos originários de fontes naturais já foram testados pelo nosso grupo de laboratório. Recentemente, foi o efeito tóxico de extrato de folhas de *Palicourea (Rubiceae)* sobre epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, que foi capaz de inibir o seu crescimento e causar

deformações na sua morfologia, apresentando retração do corpo do parasito, citoplasma alongado e perda do conteúdo citoplasmático (ALEXANDRINO *et al.*, 2016).

Outro exemplo foi a ação de um extrato proteico e uma fração enriquecida com inibidor de protease da semente de *Jatropha curcas* que foram testadas no desenvolvimento de taquizoítos de células Vero infectadas com *Toxoplasma gondii*. Os resultados mostraram que o extrato proteico reduziu o percentual de infecção e o número de parasitas intracelulares, mas não teve efeito sobre a morfologia das células Vero. A fração enriquecida com inibidor de cisteína protease, reduziu tanto o número de células infectadas por *T. gondii* quanto parasitas intracelulares. Sugerindo assim, que os compostos interferem no crescimento intracelular de *T. gondii* (SOARES *et al.*, 2015).

No entanto, vários outros trabalhos com compostos naturais foram executados pelo nosso grupo contra parasitas de *Toxoplasma gondii* (MELO; VILELA; CARVALHO, 2011; SOARES *et al.*, 2015), *Trypanossoma cruzi* (ALEXANDRINO *et al.*, 2016) e *Leishmania amazonensis* (DO NASCIMENTO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2013).

Todavia, mais estudos devem ser realizados para a pesquisa de novos compostos de fontes naturais contra estes parasitas, especialmente em *Leishmania amazonensis*, para estabelecer novas formas quimioterápicas.

1.7 *Trichilias*

As espécies de plantas pertencentes a família *Meliaceae* possuem 50 gêneros, incluindo mais de 550 espécies, que são árvores ou arbustos perenes ou de folha caduca encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Estas plantas são bastante utilizadas para uso medicinal e controle de pragas. No Brasil, são encontrados sete gêneros (*Cedrela*, *Cabralea*, *Swietenia*, *Carapa*, *Guarea*, *Trichilia* e *Khaya*) e aproximadamente 100 espécies dessa família (PARITALA *et al.*, 2015).

Essas plantas são conhecidas por serem ricas fontes de limonóides, que são grupos de triterpenos oxidados, sendo considerado o mais relevante constituinte fitoquímico isolado de diferentes partes desta planta. Os limonóides exibem uma gama de atividades biológicas, com propriedades inseticidas, efeitos antifúngicos, antibacterianas, antimaláricos, antivirais e anticancerígenos (ROY e SARAHF; 2006; YASOTHA e RAJENDRAN, 2019). Alguns estudos revelaram que os limonoídes de frutas cítricas demonstraram *in vitro* a capacidade de induzir apoptose e inibir a proliferação de células de neuroblastoma (POULOSE, HARRIS, PATIL, 2005).

As *Trichilias* possuem cerca de 81 espécies na América tropical, apresentando uma grande diversidade geográfica nesta região. O gênero consiste em árvores que estão distribuídas em quase todos os estados do Brasil, possuindo 46 espécies (24 são endêmicas) ocorrendo principalmente na Amazônia e domínios da Mata Atlântica (PENNINGTON, 2016).

A *Trichilia casaretti*, popularmente conhecida como “Murta-vermelha” é uma espécie arbórea que possui até 10 metros de altura, seus frutos são cápsulas, com 1-3 sementes ovaladas, de testa membranácea e recobertas parcialmente por um arilo vermelho-alaranjado. São caracterizados pelo seu pequeno porte, sendo recomendados na arborização urbana. Além disso, apresentam baixa densidade em sua madeira, sendo utilizadas principalmente na fabricação de embalagens (PENNINGTON, 2016).

A *Trichilia lepidota*, também conhecida como “Cedrinho” é uma árvore de 3 a 6 metros de altura e sua madeira é utilizada para a produção de móveis (PATRÍCIO e CERVI, 2005). Constituintes químicos dos extratos das suas folhas demonstraram presença de hidrocarbonetos, esteróides e aminoácidos em sua composição (PUPO *et al.*, 2002).

A *Trichilia hirta*, também conhecida como “Catiguá”, é uma árvore que possui de 5 a 10 metros de altura, podendo chegar à 25 metros sob condições úmidas. É utilizada na medicina natural para o tratamento contra câncer, devido a suas propriedades antitumorais e anti-inflamatórias (SOSA, NAVARRO, CASTEJÓN; 2010).

2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

A Leishmaniose é uma doença negligenciada, que representa um dos maiores problemas de saúde pública mundial em áreas tropicais e subtropicais. Esta doença é causada por parasitas do gênero *Leishmania* que apresentam várias manifestações clínicas. Estas manifestações afetam diferentes regiões do corpo, incluindo lesões cutâneas ulcerativas (feridas na pele), inflamação destrutiva das mucosas e infecção visceral disseminada.

O desenvolvimento terapêutico tradicional contra a Leishmaniose baseia-se em antimônios penta valentes como Pentostan e Glucantime. No entanto, esses fármacos podem apresentar toxicidade, administração prolongada e possível surgimento de resistência por parte do parasito, tornando um grande problema e desafio em relação ao seu tratamento (TIWARI *et al.*, 2018).

Tendo em vista a importância da leishmaniose e as dificuldades envolvidas em seus tratamentos, torna-se necessário a busca de alvos biológicos para novas possibilidades de fármacos. A *Leishmania amazonensis* é uma espécie que está relacionada a uma variedade de formas clínicas da doença. No entanto, os estudos de compostos naturais testados contra as formas infectivas de *Leishmania* são extremamente importantes para a perspectiva de uma possível forma de tratamento efetiva contra este parasito.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Demonstrar a ação de extratos naturais de *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta* contra promastigotas e amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

Testar a diferenciação do cultivo de formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*;

Testar diferentes escalas de concentrações de compostos naturais contra formas promastigotas e amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis*;

Avaliar e comparar a toxicidade dos compostos naturais contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*;

Determinar a relação de toxicidade dos compostos naturais observando as alterações morfológicas causadas no parasito.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo de promastigotas de *Leishmania amazonensis*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* da cepa LV79 foram mantidas a 28°C em meio de cultura Warren's (FLUKA e SIGMA) contendo 10% de Soro fetal bovino - SFB (GIBCO), suplementado com 0.01% de ácido fólico e 0.4% de hemina (SIGMA). Estas formas foram observadas e quantificadas diariamente com o objetivo de montar a curva de crescimento do parasito. Ao atingirem o fim da fase exponencial de crescimento, as culturas foram submetidas a um novo repique, onde uma alíquota de 1 mL do meio com promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi transferida para um novo tubo contendo meio fresco e SFB, garantindo a manutenção da cultura *in vitro* de promastigotas (DE CARVALHO; HELD, DE MELO, 2020).

4.2 Cultivo de amastigotas axênicos

Cultura de promastigotas na fase logarítmica foi centrifugada à 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi homogeneizado em meio 199 (SIGMA) suplementado com 10 mM de ácido succínico (DINÂMICA), 25% SFB (GIBCO) e titulado em pH 5,5. Os parasitos foram incubados a 37°C em uma incubadora de 5% CO₂ por 24 horas. Após 24 horas, a cultura foi diluída na proporção de 1:10, adicionando uma solução do meio 199 suplementado com ácido succínico, SFB e pH 5,5. Com isso, foram incubados por mais 4 dias até começarem a se diferenciar em amastigotas.

Os parasitos começaram a se diferenciar em 24 horas, porém a partir de 48 horas após as condições de diferenciação obteve maiores quantidades de amastigotas, sendo assim, utilizados a partir deste tempo para executar os experimentos (ZILBERSTEIN e NITZAN, 2019).

4.3 Preparação e Tratamento dos Extratos Brutos

Os produtos naturais utilizados foram extratos de folhas de três espécies de plantas: *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta* (P1, P2 e P3, respectivamente), obtidas da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, localizada em São Francisco do Itabapoana - RJ.

As folhas de cada planta foram colocadas em infusão com água desmineralizada à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 24 horas sob à proteção da luz. Após as 24 horas, o sobrenadante foi filtrado em membrana (28 µm), armazenado (Erlenmeyer) e liofilizado. O concentrado foi diluído em DMSO (MERCK) e PBS (GIBCO) para a obtenção da solução estoque e filtradas em seringas para obtenção de solução esterilizada.

As amostras foram adicionadas ao meio suplementado com 5% de SFB para obter as concentrações finais de uso (50mg/mL; 80mg/mL e 100mg/mL). Posteriormente, foram homogeneizadas e adicionadas às culturas para os testes nos seguintes tempos de incubação: 0, 24h, 48h, 72h, 96h (MELO; VILELA; CARVALHO, 2011).

4.4 Quantificação e observação estrutural por microscopia óptica

No início e após cada tratamento com os extratos naturais, as amostras foram distribuídas quatro vezes em tubos cônicos estéreis, representando o controle e as respectivas concentrações para obter a contagem dos parasitas.

Para examinar e monitorar todas as preparações, as alíquotas de parasitas foram fixadas em solução de formaldeído 4% (v/v) e contadas através da câmara de Neubauer durante 5 dias.

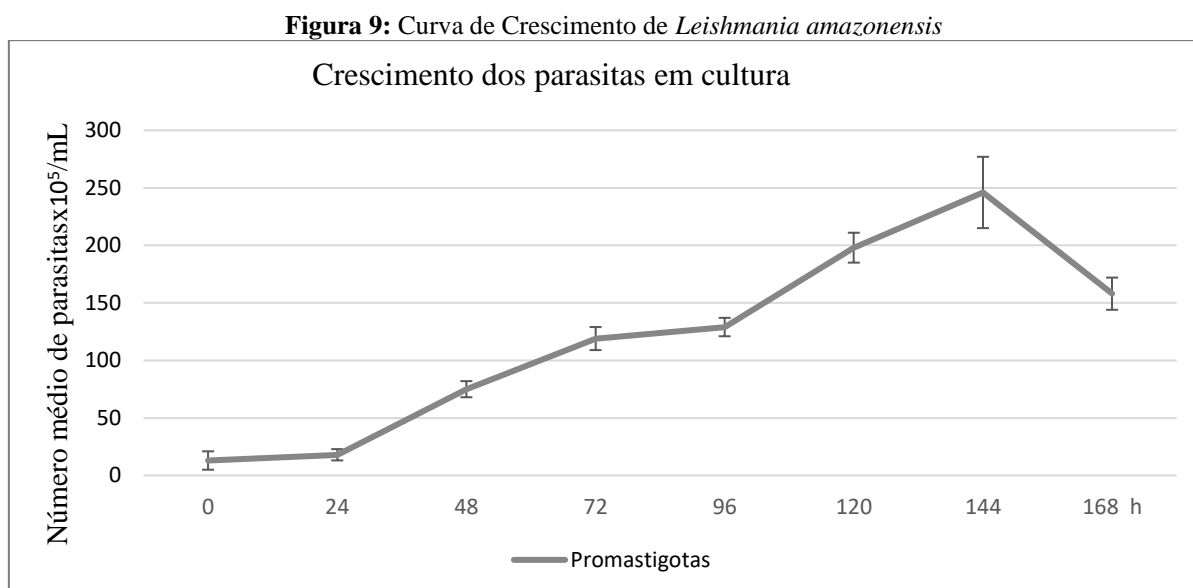
Cada amostra foi pesada, centrifugada por 3 minutos e, foi realizado o esfregão em lâminas de vidro. Para que a amostra secasse, foi deixada por 20 minutos dentro da estufa de secagem 56°C e, após este tempo, foram coradas com Solução de Giemsa (1:10) diluída em PBS e deixadas em *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com água destilada.

As amostras foram observadas em microscópio Zeiss Axioplan, equipado com objetivas de 20x e 40x usando Olympus DP74 câmera com o software Analysis System para obtenção das imagens (DE CARVALHO; HELD; DE MELO, 2020).

5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento de *Leishmania amazonensis*

Para demonstrar a ação de extratos naturais contra promastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro*, a cultura foi quantificada por meio de uma câmara de Neubauer no microscópio óptico ZEISS com objetiva de 40x por um período de 8 dias a cada 24 horas, para analisar o crescimento dos parasitas e determinar o melhor momento para a incubação com os extratos naturais. Conforme mostra a **Figura 9**, o crescimento logarítmico se inicia partir de 24 horas. O final da fase logarítmica foi no tempo de 144 horas, iniciando assim o declínio do número de parasitas.



5.2 Efeitos tóxicos e morfológicos de *Trichilia casaretti* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Analisando os efeitos de *Trichilia casaretti* (**Figura 10**). A concentração de 50mg/mL apresentou redução no número médio de promastigotas a partir dos tempos de 48 horas e 72 horas, sendo mais eficiente no tempo de 96 horas, tendo uma redução de aproximadamente 58% de parasitos em relação ao controle.

No tratamento com a concentração de 80mg/mL, houve uma redução de 56% no tempo de 72 horas. Porém, em 96 horas a redução do número médio de parasitos observados foi de 77%, aproximadamente.

No entanto, o tratamento com a concentração de 100mg/mL foi a que apresentou um menor número de parasitos em relação ao controle, onde no tempo de 72 horas, foi observado uma redução de 72% e no tempo de 96 horas constatou-se uma redução de 92% do número médio de parasitos.

Além disso, foram observadas através da microscopia óptica alterações morfológicas nos parasitos tratados com o extrato. Estas mudanças morfológicas incluem formato arredondado, flagelo ausente e parasitos apresentados em dupla (**Figura 11**).

Figura 10: Ação de *Trichilia casaretti* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL.

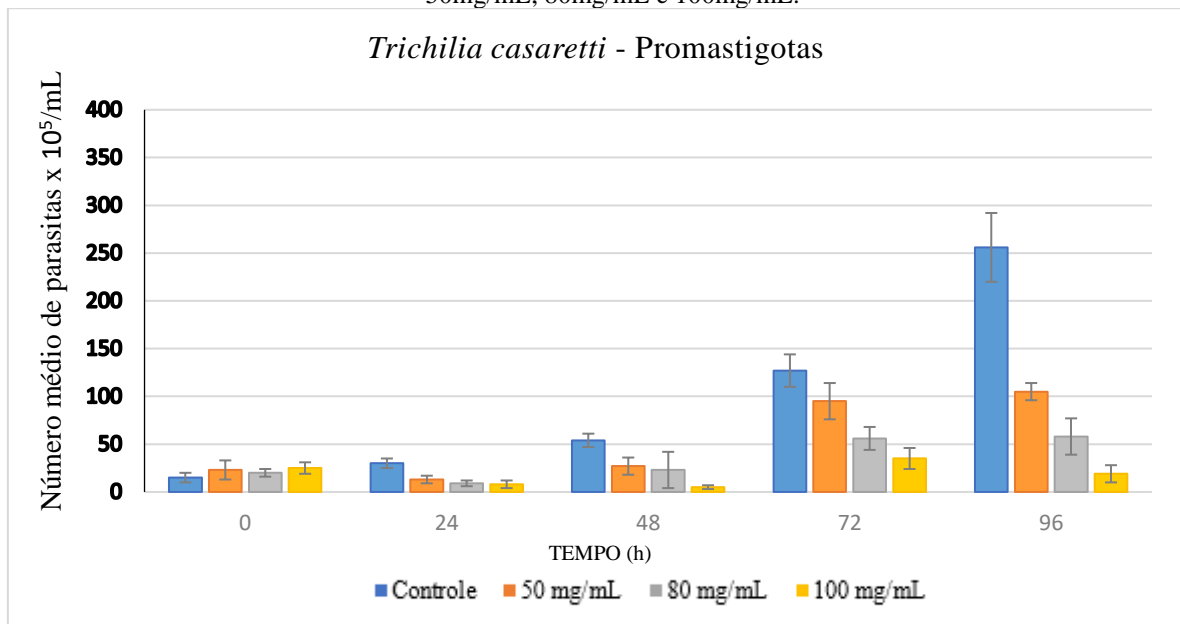
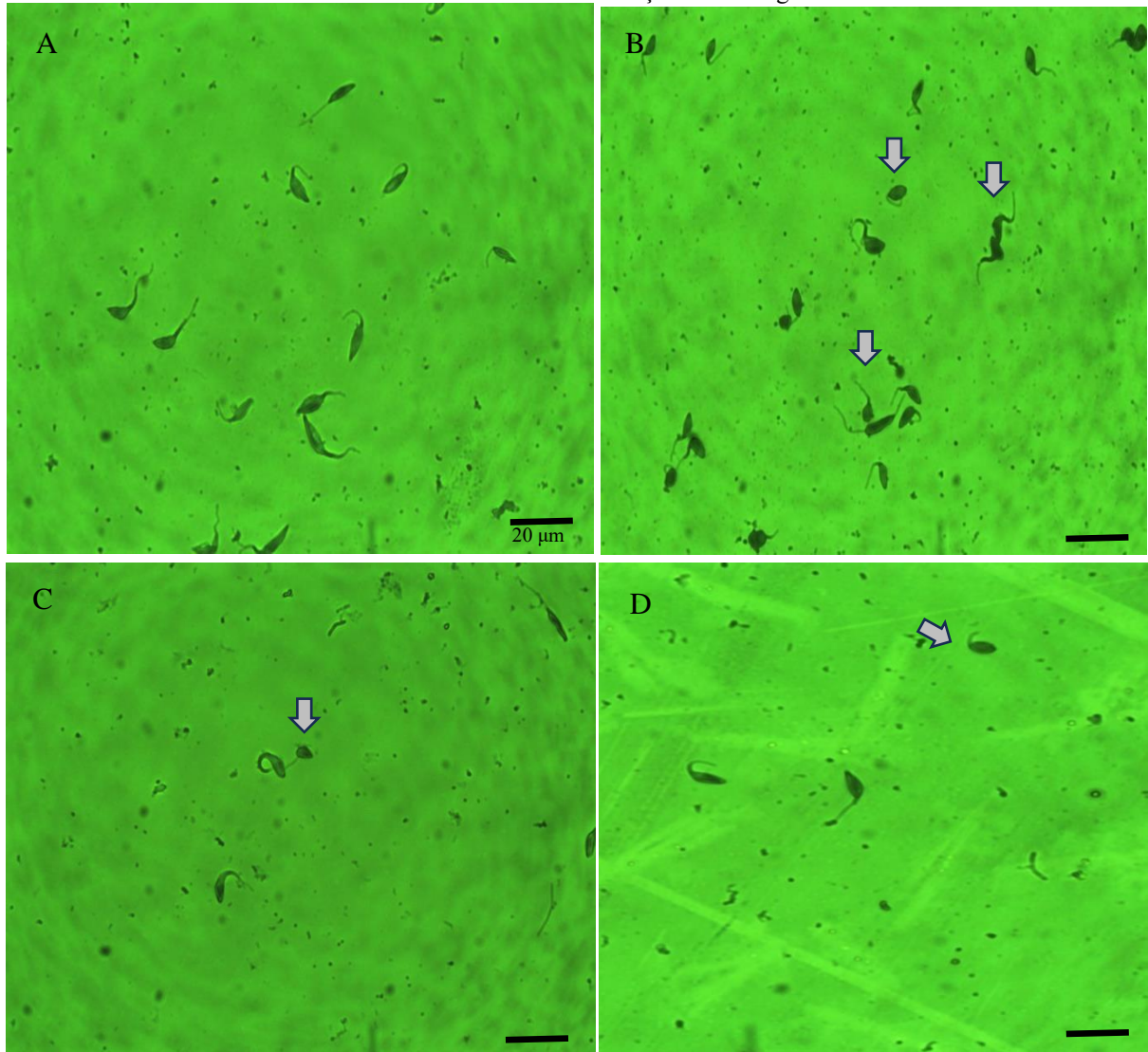


Figura 11. Principais alterações morfológicas de *Trichilia casaretti*.
(A) Controle 72h. **(B)** Tratado- 50mg/mL /48h **(C)** Tratado- 100mg/mL / 72h. **(D)** Tratado- 80mg/mL/96 h.
 As setas cinzas indicam as alterações morfológicas.



5.3 Efeitos tóxicos e morfológicos de *Trichilia lepidota* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Analisando os efeitos de *Trichilia lepidota* (**Figura 12**), na concentração de 50mg/mL, a partir de 24 horas a redução observada foi de 77% do número médio de promastigotas. Posteriormente, nos tempos 72 horas e 96 horas, houve uma redução de 39% e 47%, respectivamente.

Na concentração de 80mg/mL, os resultados observados mostraram uma redução de 75% no tempo de 48 horas. No entanto, em 72 horas a redução foi de 84% e, no tempo de 96 horas a redução foi de 83%.

Analisando a concentração de 100mg/mL, as observações mostraram que a partir dos tempos de 72 horas, apresentou uma redução de 90% e, no tempo de 96 horas, a redução observada foi de 92%.

Todavia, além da redução da quantidade de promastigotas encontrados nos extratos tratados, observações feitas através da microscopia óptica demonstraram modificações estruturais dos parasitos, com ausência de flagelo, formato arredondado e em dupla, como mostra a **Figura 13**.

Figura 12: Ação de *Trichilia lepidota* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL.

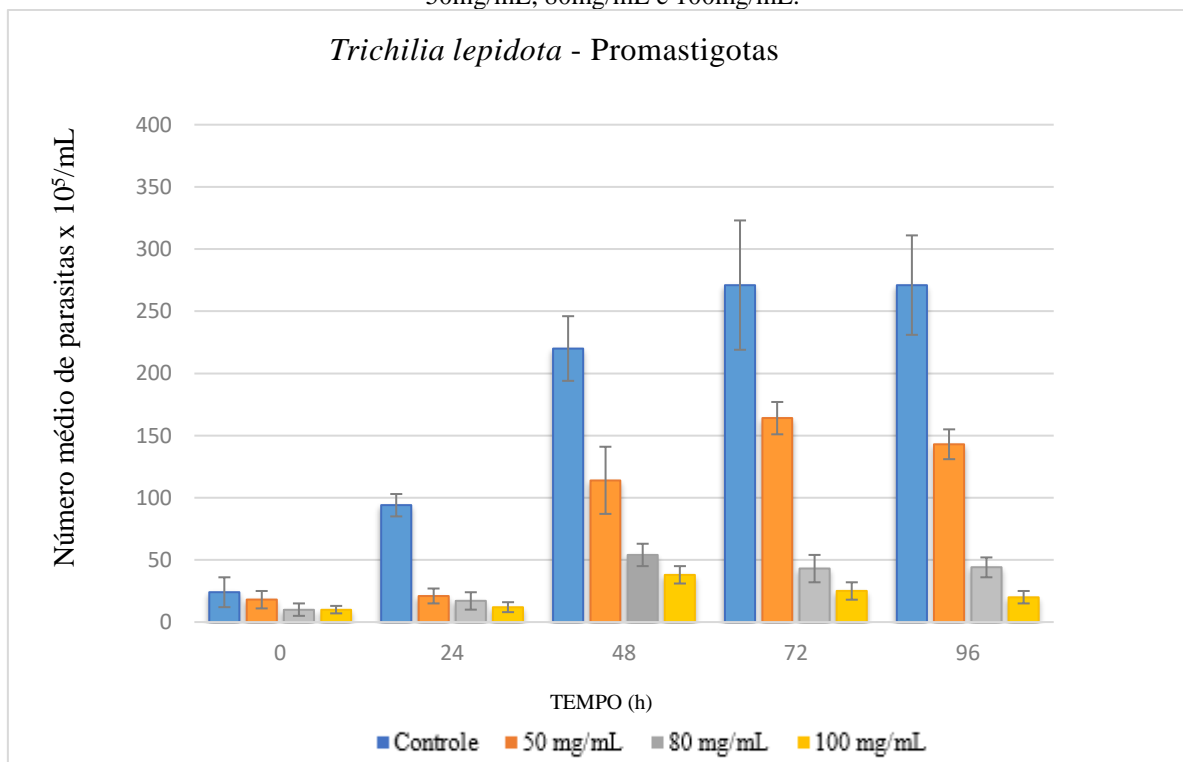
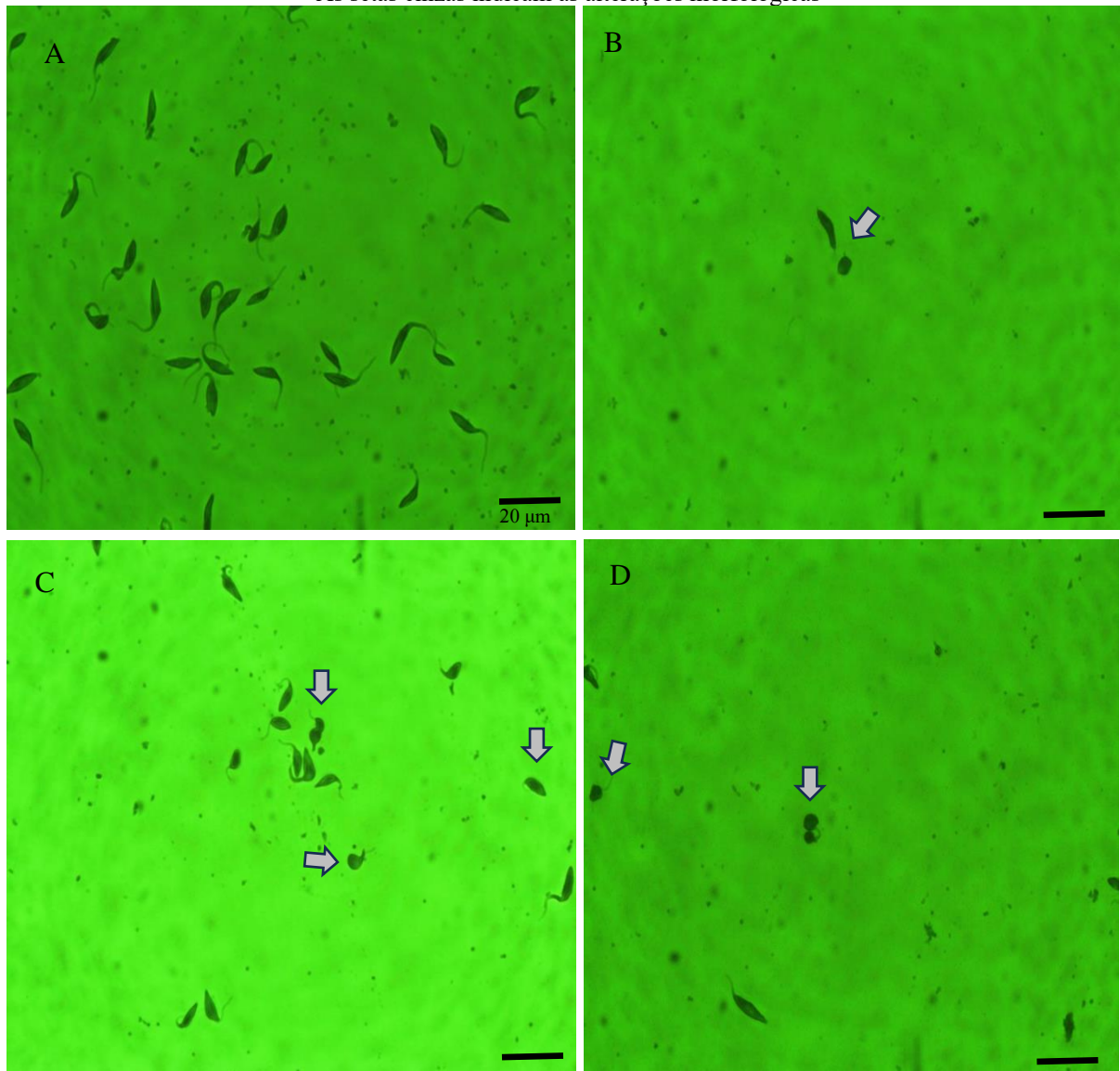


Figura 13. Principais alterações morfológicas de *Trichilia lepidota*
(A) Controle 48h. **(B)** Tratado- 100mg/mL / 72h. **(C)** Tratado- 50mg/mL /48h. **(D)** Tratado 100mg/mL/ 96h
 As setas cinzas indicam as alterações morfológicas



5.4 Efeitos tóxicos e morfológicos de *Trichilia hirta* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Analisando os efeitos tóxicos de *Trichilia hirta* (**Figura 14**), na concentração de 50mg/mL houve uma redução no tempo de 24 horas de aproximadamente 47%, em 48 horas, aproximadamente 47%; em 72 horas aproximadamente 49%; e em 96 horas com 51% de redução.

Na concentração de 80mg/mL, em 24 horas a redução foi de 59%. Todavia, em 48 horas a redução foi de 68%, porém os parasitos estavam morfológicamente alterados. Em 72 horas e

96 horas, a redução foi de 49% e 46%, respectivamente com parasitos totalmente diferentes do seu formato ideal.

Na concentração de 100mg/mL, em 24 horas a redução foi de 70%, em 48 horas de 89%, em 72 horas 72% e em 96 horas de 83%. Apesar da porcentagem variar, os parasitos observados no tratado (em todas as concentrações) tiveram sua morfologia alterada conforme mostra a **Figura 15**, com aspecto arredondado e sem flagelo.

Figura 14. Ação de *Trichilia hirta* contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL.

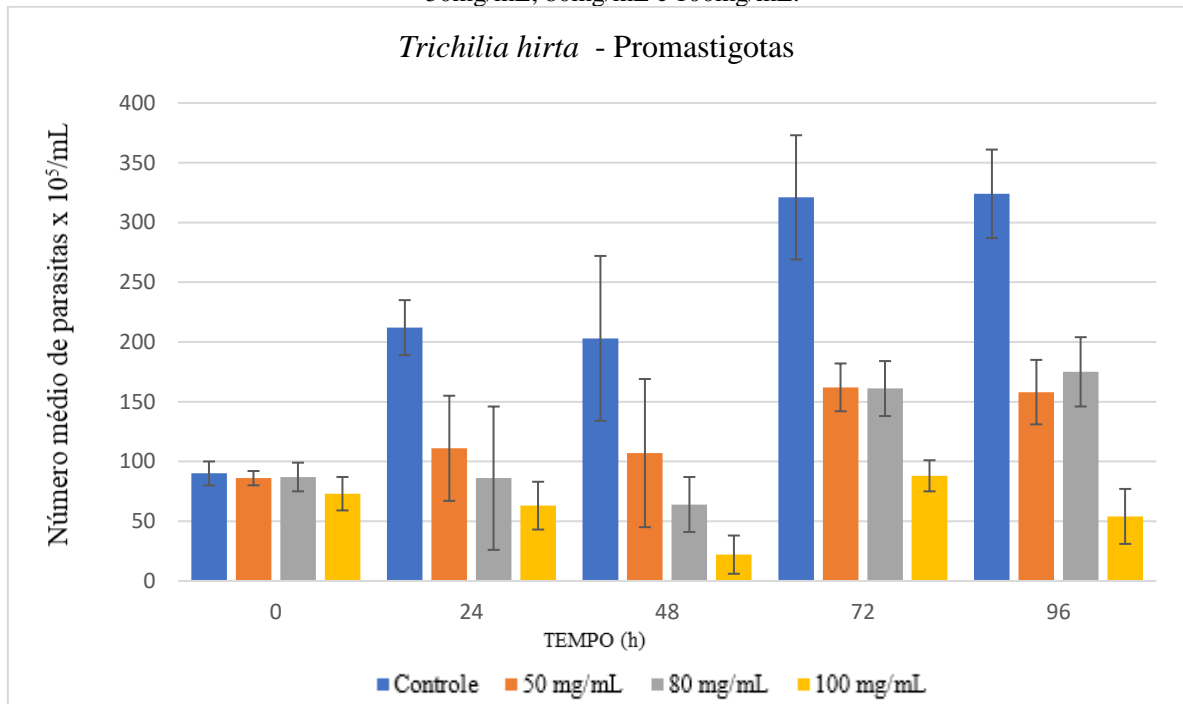
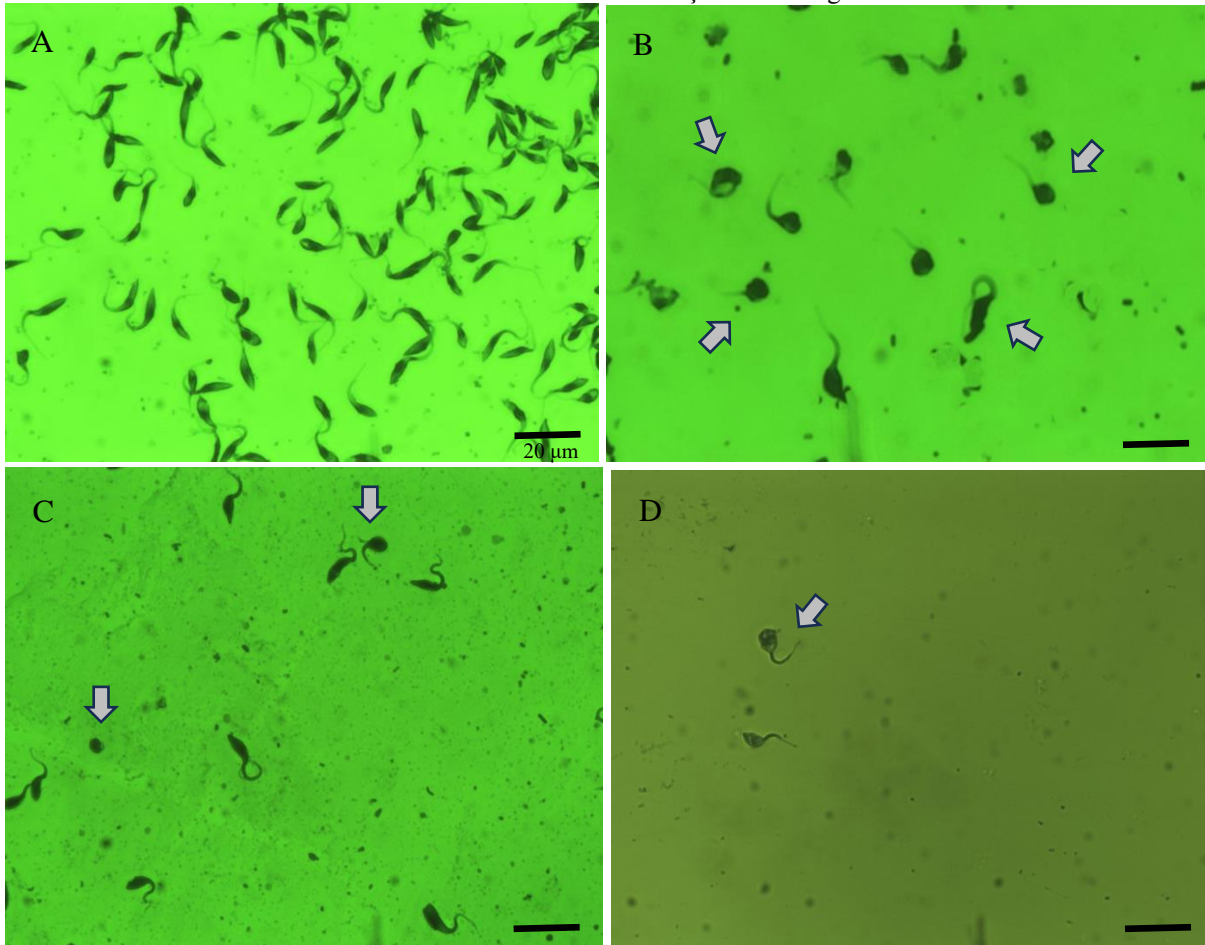
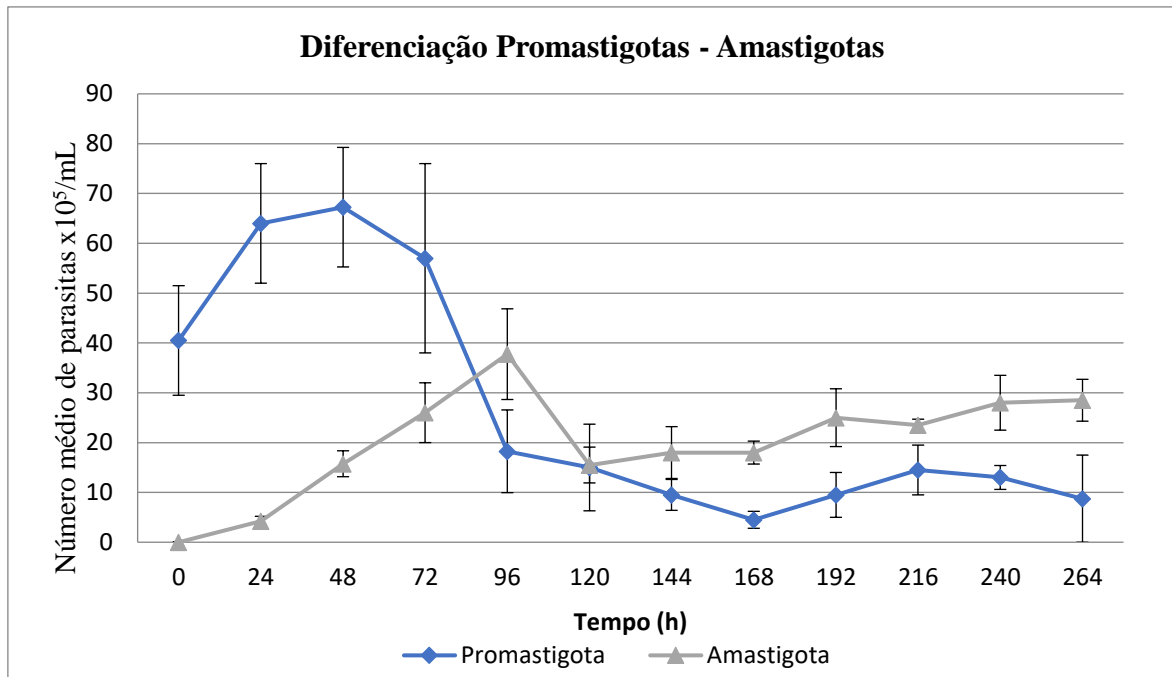


Figura 15. Principais alterações morfológicas de *Trichilia hirta*
(A) Controle 72h. **(B)** Tratado- 50mg/mL/ 48h. **(C)** Tratado- 100mg/mL/ 24h. **(D)** Tratado 100mg/mL/ 72h
 As setas cinzas indicam as alterações morfológicas



5.5 Curva de crescimento de amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*

Para obter o cultivo de amastigotas axênicas, foi realizado a diferenciação dos promastigotas na fase logarítmica, como está descrito no tópico de metodologia (3.2). As contagens foram feitas tanto para as formas promastigotas encontradas como as formas diferenciadas de amastigotas axênicas. Observa-se através da **Figura 16**, que não houve uma diferenciação com uma população totalmente homogênea. A diferenciação de amastigotas axênicas observadas iniciou -se a partir de 24 horas.

Figura 16. Diferenciação promastigotas – amastigotas axênicos.

5.6 Efeitos de *Trichilia casaretti* contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis*.

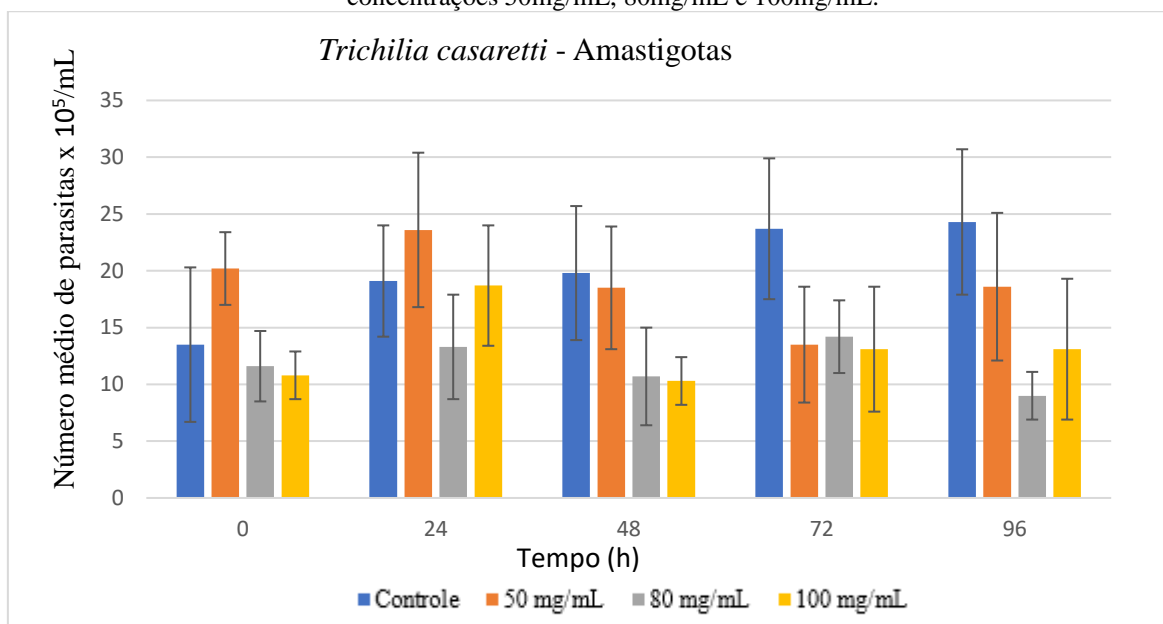
Analisando os efeitos de *Trichilia casaretti* em formas amastigotas axênicas (**Figura 17**), na concentração de 50mg/mL, a partir de 72 horas houve uma redução do número médio de amastigotas em 46% e, em 96 horas a redução foi de 26%.

Na concentração de 80mg/mL, os resultados mostraram uma redução de 45% a partir de 48 horas. As observações posteriores demonstraram redução de 40% e 46% nos tempos de 72 horas e 96 horas.

Avaliando a concentração de 100mg/mL, a partir de 48 horas, a quantidade média de parasitos reduzidos foi de 47%. No entanto, em 72 horas e 96 horas, houve também uma redução apresentando 44% e 46%, respectivamente.

Além disso, alguns ninhos de amastigotas foram observados durante a quantificação dos parasitos (dados não mostrados).

Figura 17. Ação de *Trichilia casaretti* contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis* nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL.



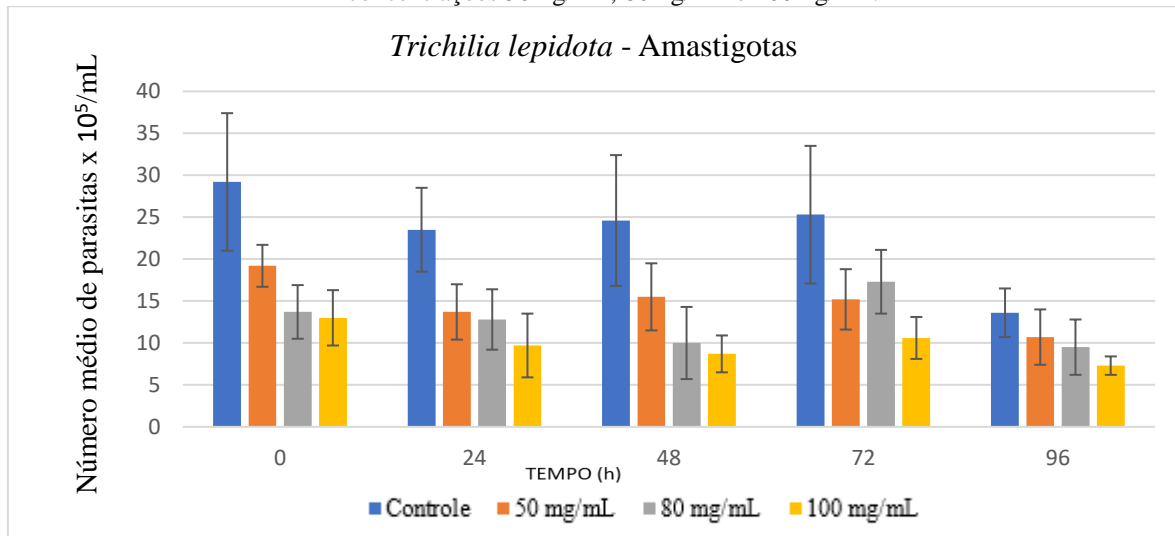
5.7 Efeitos de *Trichilia lepidota* contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis*.

Analisando os efeitos de *Trichilia lepidota* em formas amastigotas axênicas (**Figura 18**), na concentração de 50mg/mL, a redução analisada foi de 41%; já em 48 horas foi obtida uma diminuição de 36% do número médio de amastigotas. Nos tempos de 72 horas e 96 horas, o número médio obtido foi de 39% e 21% de redução, respectivamente.

Na concentração de 80mg/mL, em 24 horas a redução foi de 45%, em 48 horas o valor analisado foi de 59%. Contudo, nos tempos de 72 horas a redução do número médio foi de 31% e em 96 horas a porcentagem de números médios analisados foi de 46%.

Na concentração de 100mg/mL, a porcentagem de diminuição do número médio observados em 24 horas foi de 58%, em 48 horas ocorreu 64% de redução, em 72 horas, 58% e em 96 horas a redução do número médio de amastigotas obtidos foi de 46%.

Figura 18. Ação de *Trichilia lepidota* contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis* nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL.



5.8 Efeitos de *Trichilia hirta* contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis*.

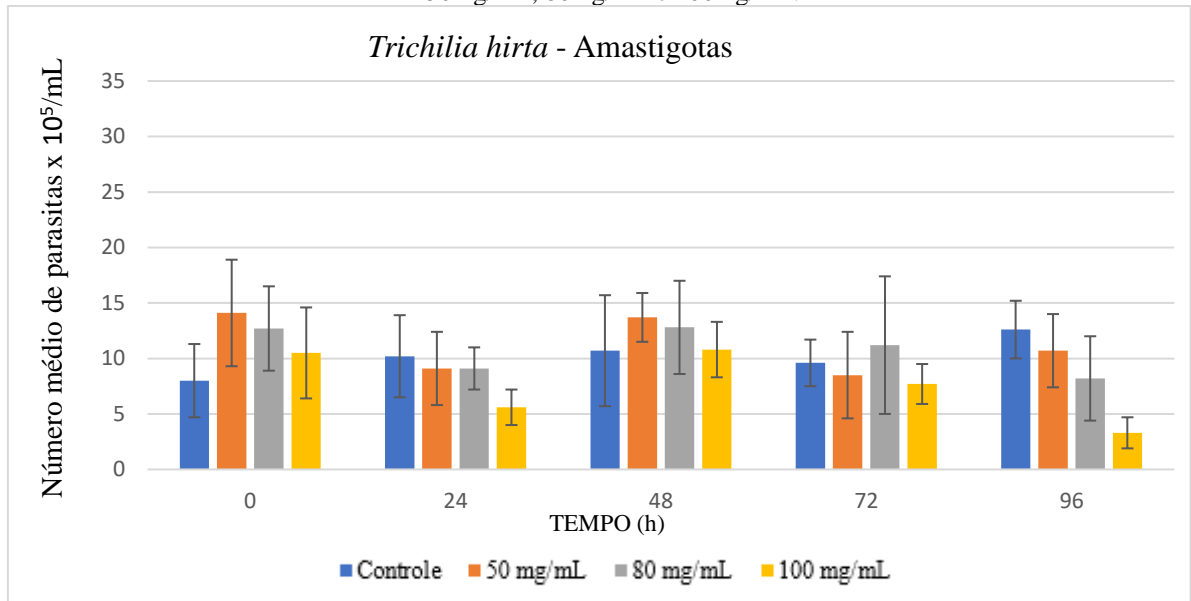
Analisando os efeitos de *Trichilia hirta* em formas amastigotas axênicos (**Figura 19**), na concentração de 50mg/mL, a partir do tempo de 24 horas, a redução do número médio de amastigotas foi de 10%, e em 96 horas observamos uma redução de 15%.

Na concentração de 80mg/mL, em 24 horas a redução foi de 11%. Contudo, verificou-se que no tempo de 96 horas a redução observada designou em 34%.

Na concentração de 100mg/mL, no tempo de 24 horas, a redução foi de 45%. Porém, ao analisar o tempo de 96 horas, foi observado que obteve uma redução de aproximadamente 73% do número médio de parasitos.

Além disso, vários ninhos de amastigotas foram observados nos controles e em algumas concentrações (dados não mostrados).

Figura 19: Ação de *Trichilia hirta* contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis* nas concentrações 50mg/mL, 80mg/mL e 100mg/mL.



6 DISCUSSÃO

Desde as antigas civilizações humanas, a utilização de produtos naturais derivados de plantas já era evidenciada. Contudo, as plantas medicinais são as principais fontes naturais para a síntese de medicamentos, o que lhes confere destaque no cenário mundial (REIS *et al.*, 2004). Nos dias atuais, muitas plantas são utilizadas na sua forma bruta, fitoterápica ou como princípio ativo isolado. Devido a este fator, o estudo de compostos com fontes naturais tem aumentado e se tornado de grande interesse (TORRES e SOUZA, 2010).

A utilização da defensina *PvDI* de sementes de *Phaseolus vulgaris* (cv. *Perola*), um peptídeo antimicrobiano natural, foi testado contra *Leishmania amazonensis* pelo nosso grupo de laboratório e colaboradores e, demonstrou que esta defensina foi capaz de causar ruptura da membrana plasmática seguida de vazamento de material citoplasmático, fragmentação citoplasmática e vacuolização. Além disso, a quantidade de 300µg/mL de *PvDI* inibiu 70% da proliferação do protozoário, após 24 horas de incubação (DO NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Neste estudo, utilizamos extrato bruto das folhas de *Trichilias* para a testagem deste composto natural contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*. As *Trichilias*, pertencem a família *Meliaceae*, extremamente importantes e que vêm sendo pesquisadas por apresentarem efeitos microbicidas, antivirais e antiparasitárias (PUPO *et al.*, 2002).

Diversas plantas, pertencentes a esta família, têm sido fonte de estudos contra diversos patógenos. O extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (*nim*) e *Melia azedarach* L. (*canela ou Santa Bárbara*) foram testados nas concentrações: 0.15, 0.3, 0.5, 1, 2, 3 e 5 mg mL⁻¹ e incubadas por 24 horas. Após as 24 horas de incubação, o número de taquizoítos intracelulares e a porcentagem de infecção decaiu drasticamente. Além disso, foi observada uma desorganização morfológica progressiva e estrutural que levou a formação vesicular e completa destruição do parasita, apresentando uma estrutura amorfa, antes da completa eliminação do meio intracelular. No entanto durante o tratamento com os extratos, efeitos morfológicos não foram observados nas estruturas da célula hospedeira. Contudo, o *Nim* reduziu a infecção em 2 mg mL⁻¹ (60%), 3 mg mL⁻¹ (75%) e 5 mg mL⁻¹ (85%), respectivamente. Esta diminuição da infecção está associada com a eliminação de taquizoítos intracelulares. Em baixas concentrações, como 0,1 e 1 mg mL⁻¹, não foi observado efeito significativo na infecção ou redução de parasitas intracelulares. Todavia, foi demonstrado que os extratos interferem no desenvolvimento intracelular do *T. gondii*, sendo capaz de eliminar taquizoítos intracelulares e reduzir a sua infecção (MELO; VILELA; CARVALHO, 2011).

Um estudo realizado utilizando extratos metanólicos de folhas e sementes da *M. azedarach* foram testados contra o *Anopheles stephensi* Liston e mostraram ação contra as fases de larva, pupa, adultos e ovos. Os resultados demonstraram que os extratos obtidos das folhas apresentaram ativos nas doses maiores de 1 e 2%, já os extratos que foram obtidos das sementes, demonstrou elevada bioatividade em todas as doses testadas, sendo capaz de suprimir a fase adulta do *A. stephensi* com uma dose de 0,5%. (NATHAN *et al.*, 2006).

Em outro estudo, foram investigados em condições de laboratório, os efeitos dos extratos metanólicos de sementes de *nim* (*Azadirachta indica*) e *bakain* (*Melia azedarach*) no comportamento de oviposição e eclodibilidade de ovos de *Earias vittella* nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10% de ambos os extratos para comparar com nimbecidina e controle não tratado. Sob condições de escolhas, os adultos preferiram depositar um maior número de ovos na porção não tratada (30,33 ovos) do substrato de oviposição (musselina) em comparação com a porção tratada com extrato (10% do nim onde apenas 6,66 ovos foram postos). Porém, sob condições sem escolha, concentrações mais elevadas de extratos causaram reduções proporcionais no número de ovos postos. *Nim* em 8% (46,33 ovos) e 10% (38,66 ovos) e *bakain* em 10% (40,66 ovos) foram significativamente melhores que nimbecidina (62,33 ovos). Os extratos também se manifestaram atividade repelente, reduzindo o número de ovos postos mesmo quando as fêmeas que ovipõem não estavam em contato direto com os extratos (GAJMER *et al.*, 2002).

No presente trabalho, promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* foram tratados com três concentrações diferentes de extrato bruto de plantas por 5 dias. Em decorrência do tratamento, foi observada a redução do número de promastigotas logo nos primeiros dias, sendo mais evidente no tempo de 96 horas (último dia de tratamento) e na maior quantidade da concentração do extrato. Além disso, nas formas promastigotas, foram observadas alterações na estrutura do parasito, como: ausência de flagelo, formato arredondado e apresentados em dupla.

Resultados semelhantes foram observados em estudos utilizando extrato aquoso da raiz da planta *Physalis angulata* (*AEPa*) contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e, mostraram que 100µg/mL de *AEPa* induziu 99,8% (IC₅₀ de 39,5µg/mL ± 5,1) da atividade antileishmania, promovendo uma redução dose-dependente do parasito. No entanto, esta inibição do crescimento foi associada as alterações morfológicas das formas promastigotas após a incubação com o extrato, que causou redução, arredondamento do volume celular e duplicação do flagelo. Além disso, os resultados demonstraram que o *AEPa* promove efetivamente a atividade antileishmania devido as alterações morfológicas causadas e que não tem efeitos citotóxicos nas células hospedeiras (DA SILVA, *et al.*, 2015).

Duran *et al.*, (2008), a fim de investigar os efeitos *in vitro* de extrato etanolico de amostras de própolis *Adana* no crescimento de *Leishmania tropica*, utilizou as concentrações de 25, 50, 100, 50, 500 e 750µg/ml do extrato como forma de tratamento para as células do parasito. Porém, com base nas análises dos resultados dos experimentos, as concentrações de até 100µg/ml de própolis não apresentaram atividade antileishmania contra as células do parasita e também, não houve alterações morfológicas. Contudo, nas concentrações de 250µg/mL, 500µg/mL e 750 µg/mL dos extratos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na contagem de células em comparação ao grupo controle, além de alterações morfológicas no formato do corpo e do flagelo do parasito.

Estudos sugeriram que as alterações morfológicas dos parasitos podem ser causadas pela interferência de fármacos e extratos de plantas no processo de divisão celular. Alguns compostos podem também causar alterações ultraestruturais, indicando a progressão do tipo apoptose e morte celular autofágica em *Leishmania* (ADADE e SOUTO- PADRON, 2010).

Para a testagem e análise das culturas axênicas de amastigotas de *Leishmania amazonensis* com os extratos naturais, o critério utilizado durante o processo de diferenciação para considerar a forma amastigota foi determinada através da morfologia arredondada e ausência de flagelo livre.

Estudos mostram que promastigotas de *Leishmania amazonensis* na forma metacíclica resultou em uma cultura 100% de amastigotas axênicos, sem apresentar nenhuma forma promastigota. Porém, todas as outras culturas com uma quantidade de formas metacíclicas abaixo de 50% não resultou na diferenciação completa (CYSNE *et al.*, 1998).

Vários protocolos já foram demonstrados e realizados para a obtenção de amastigotas axênicas. Em geral, esses protocolos se diferem de espécie para espécie, variando entre mudanças graduais de pH e temperatura para obter resultados significativos (BALANCO *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 2017).

Um estudo utilizando extratos etanólicos de oito espécies (*Carica papaya L.* (*Caricaceae*), *Piper dennisii Trel* (*Piperaceae*), *Hedychium coronarium J. König* (*Zingiberaceae*), *Cestrum racemosum Ruiz & Pav.* (*Solanaceae*), *Renealmia alpinia* (Rottb.) *Zingiberaceae*, *Lantana sp.* (Verbenáceas), *Hyptis lacustris A. St.-Hil. ex Benth.* (Lamiaceae) e *Calea montana Klat.* (Asteráceas); apresentaram interessantes atividades leishmanicidas (contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis*) apresentando IC₅₀ < 10µg/ml (CELINE *et al.*, 2009).

Um outro estudo descreveu uma triagem de 19 espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional brasileira contra as formas promastigotas e amastigotas axênicos de

Leishmania amazonensis e contra a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* *in vitro* utilizando a concentração de 100 µg/ml. As plantas *Baccharis trimera*, *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla*, *Mikania glomerata*, *Ocimum gratissimum*, *Piper regnellii*, *Prunus domestica*, *Psidium guajava*, *Sambucus canadensis*, *Stryphnodendron adstringens*, *Tanacetum parthenium* e *Tanacetum vulgare*, apresentaram efeito significativo contra um ou ambos parasitas com a porcentagem de inibição de crescimento entre 49,5 % e 99%. Os extratos de *O. gratissimum*, *P. domestica*, *P. guajava* e *S. canadensis* mostraram inibição de crescimento entre 52 e 91,5% em promastigotas de *L. amazonensis*, enquanto esses extratos foram fracamente ativos contra *T. cruzi*. Particularmente, contra formas amastigotas de *L. amazonensis*, os extratos de *M. glomerata*, *O. gratissimum* e *P. domestica* demonstraram excelentes resultados, apresentando uma porcentagem de 97,5; 91,5 e 90,0% de inibição de crescimento, respectivamente (LUIZE *et al.*, 2005).

A testagem com os extratos de folhas de *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta*, resultou na redução da quantidade de parasitos, o que possibilita que este extrato interfere no processo de desenvolvimento e multiplicação do parasito.

Diante dos resultados apresentados, os extratos aquosos mostraram maior eficiência nas concentrações maiores tanto quando testados nas formas promastigotas, quanto para as formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*. Estudos mais detalhados utilizando marcadores apropriados devem ser executados para determinar o mecanismo de ação do extrato e entender onde e como estes compostos naturais podem estar agindo, de modo a impedir o desenvolvimento dos parasitos.

7 CONCLUSÃO

Os extratos de *Trichilia casaretti*, *Trichilia lepidota* e *Trichilia hirta* foram capazes de alterar morfológicamente a estrutura das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, assumindo formato arredondado, ausência de flagelo e em dupla.

As alterações morfológicas decorrentes dos tratamentos com as concentrações dos extratos das plantas foram determinadas a partir do tempo de 24 horas, sendo mais drásticas quanto maior fosse a concentração deste composto e o tempo de tratamento.

Nas maiores concentrações testadas, as plantas mostraram maior eficiência em eliminar o parasito, tanto para promastigotas quanto para amastigotas axênicas.

A redução do número de parasitos nos tratamentos em relação ao controle, indica que os extratos apresentaram atividade *antileishmanicida*, interferindo no desenvolvimento das formas infectivas de *Leishmania amazonensis*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADADE, C. M. e SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **Open Parasitol J**, v. 4, n. 1, pág. 178-87, 2010.
- ALEXANDRINO, C R *et al.* Bioactivity of leaf extracts from species of *Palicourea* (rubiaceae) on *Trypanosoma cruzi*, *Candida sp.* and *Fusarium solani*. **CEP**, v. 20550, p. 013, 2016.
- ANTOINE, Jean-Claude *et al.* The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- BALANCO, J. M. F. *et al.* Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, v. 116, n. 2, p. 103-113, 1998.
- BATES, P. A. *et al.*, Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. **Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 193-202, 1992.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 2017. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual da Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 2006. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerar.pdf>. Acesso em: 20 de Junho de 2023.
- BESTEIRO, S. *et al.*, Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007.
- CAO, De-Ping *et al.* Axenic culture and identification of amastigotes from Sichuan human strain of Chinese *Leishmania* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3-4, p. 353-355, 2012.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Dezembro, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>> . Acesso em: 22 de Junho de 2023.
- CHANMOL, W. *et al.* Axenic amastigote cultivation and in vitro development of *Leishmania orientalis*. **Parasitology research**, v. 118, p. 1885-1897, 2019.
- CHANG, K.P. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**, v. 209, n. 4462, p. 1240-1242, 1980.
- CARVALHO, A. S. *et al.* Um novo processo para a obtenção do antimoniato de meglumina, visando a produção do medicamento genérico. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 684-696, 2015.
- CÉLINE, V. *et al.* Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 413-422, 2009.

- CYSNE-FINKELSTEIN, L. *et al.* *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 89, n. 1, p. 58-62, 1998.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- COSTA, J. M. L. *et al.* Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. 2009.
- DA SILVA, R. R. P. *et al.* *In vitro* biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.
- DEBRABANT, A. *et al.* Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 2, p. 205-217, 2004.
- DE CARVALHO, L.P; HELD, J.; DE MELO, E. J. T. Essential and nonessential metal effects on extracellular *Leishmania amazonensis in vitro*. **Experimental parasitology**, v. 209, p. 107826, 2020.
- DIAS-LOPES, G. *et al.* Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for *in vitro* studies. **Acta tropica**, v. 220, p. 105956, 2021.
- DO NASCIMENTO, V. V. *et al.* PvD1 defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonensis*. **Bioscience reports**, v. 35, n. 5, 2015.
- DURAN, G. *et al.* *In vitro* antileishmanial activity of *Adana* propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1217-1225, 2008.
- GAJMER, T. *et al.* Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach* L) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab.)(Lep., Noctuidae). **Journal of applied Entomology**, v. 126, n. 5, p. 238-243, 2002.
- GOMES, C. B. *et al.* Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during *in vitro* differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition. **Biochimie**, v. 133, p. 28-36, 2017.
- GUPTA, N. *et al.* Membrane characterization of amastigote-like forms of *Leishmania donovani*. **Tropical Medicine & International Health**, v. 1, n. 4, p. 495-502, 1996.
- GUPTA, N., GOYAL, N.; RASTOGI, A. K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 3, p. 150-153, 2001.
- HARIKRISHNAN, R., BALASUNDARAM, C., HEO, M. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. **Aquaculture**, v. 317, n. 1-4, p. 1-15, 2011.
- HENDRICKX, S., CALJON, G., MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology research**, v. 118, p. 2743-2752, 2019.
- HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.
- KAMHAWI, S. *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KOFF, A. B; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 5, p. 693-708, 1994.

LUIZE, P. S. *et al.* Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 85-94, 2005.

MARTINS, A. L. G. P. *et al.* Leishmaniose mucocutânea: dificuldade diagnóstica em lesão crônica. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 36, n. 1, p. 47-50, 2011.

MELO, E. J. T.; VILELA, K. J.; CARVALHO, C. S. Effects of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss.(neem) and *Melia azedarach* L.(Santa Barbara or cinnamon) on the intracellular development of *Toxoplasma gondii*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 215-222, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; Casos de Leishmaniose tegumentar. Brasil, 1980 a 2020; Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/arquivos/lt-graficos-e-mapas.pdf>> Acesso em: 25 de Julho de 2022.

MURRAY, H. W *et al.* **Advances in leishmaniasis**. Lancet, v.366, p.1561–1577, 2005.

NATHAN, S. S. *et al.* Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Bioresource technology**, v. 97, n. 11, p. 1316-1323, 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS, 2022). Plan de acción para fortalecer la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2017-2022. Washington, DC: OPAS; 2017. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34144>>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS), 2023. **Leishmaniose**. Disponível em: < <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em: 04 de Julho de 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas, Nº 10**. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386> (2021). Acesso em: 04 de Julho de 2023.

PAN, Alfred A. *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. **Experimental parasitology**, v. 58, n. 1, p. 72-80, 1984.

PARITALA, V. *et al.* Phytochemicals and antimicrobial potentials of mahogany family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 61-83, 2015.

PATRÍCIO, P.C.; CERVI, A.C. The genus *Trichilia* P. Browne (*Meliaceae*) in the State of Paraná, Brazil. **Acta Biol. Par**, v.34, 2005.

PENNINGTON, T.D. Systematic treatment of American *Trichilia* (*Meliaceae*). **Phytotaxa**, v. 259, n. 1, p. 018-162, 2016.

PIMENTA, P. F.; FREITAS, V. C.; SECUNDINO, N. F. C. A interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. **Tópicos avançados em Entomol. Mol. Cap**, v. 12, p. 1-45, 2012.

POULOSE, S. M.; HARRIS, E. D.; PATIL, B. S. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 4, p. 870-877, 2005.

- PUPO, M. T. *et al.* Terpenoids and steroids from *Trichilia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 382-388, 2002.
- REIS, M. C. P. *et al.* Experiência na implantação do Programa de Fitoterapia do Município do Rio de Janeiro. **Divulg. saúde debate**, p. 42-49, 2004.
- REITHINGER, R. *et al.*, **Cutaneous leishmaniasis**. *Lancet*, v.7, p.581–596, 2007.
- ROCHETTE, A. *et al.* Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 165, n. 1, p. 32-47, 2009.
- ROY, A, SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 191-201, 2006.
- SALAZAR, M., CASTRO, E. Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el Hospital Regional de Pucallpa de 1997 a 1999. **Dermatología Peruana**, v. 11, n. 1, 2001.
- SANTIAGO, *et al.* Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual ea necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, 2010.
- SOARES, A. M. S. *et al.* A protein extract and a cysteine protease inhibitor enriched fraction from *Jatropha curcas* seed cake have in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Experimental parasitology**, v. 153, p. 111-117, 2015.
- SOSA, E. H., NAVARRO, B. A., CASTEJÓN, Y. M. Estudio de estabilidad físico-química e identificación fitoquímica de extractos etanólicos de *Trichilia hirta* (*Meliaceae*). **Revista Cubana de Química**, v. 22, n. 1, p. 22-26, 2010.
- STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- SOUZA, G. S. *et al.* Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 1, p. 116-125, 2013.
- SUN, Chin-Hung *et al.* DNA topoisomerase III β promotes cyst generation by inducing cyst wall protein gene expression in *Giardia lamblia*. **Open Biology**, v. 10, n. 2, p. 190228, 2020.
- TAHGHIGHI, A. Importance of metal complexes for development of potential leishmanicidal agents. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 770, p. 51–60, 2014.
- TEIXEIRA, D. E. *et al.* The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.
- TEIXEIRA, M.C.A *et al.* A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol. Res.*, v. 88, p. 963-968, 2002.
- TIWARI, N. *et al.* Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 26-41, 2018.

TORRES, R. P.; SOUZA, M. A. F. de. A dinâmica do mercado farmacêutico brasileiro segundo o modelo das estratégias genéricas de Porter. **Sociedade, Contabilidade e Gestão**, v. 5, n. 3, 2011.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. de. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VASCONCELOS, J. M *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018.

WANG, W. *et al.* Advances and challenges in medicinal plant breeding. **Plant Science**, v. 298, p. 110573, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 06 de Julho de 2023.

YASOTHA, P.; RAJENDRAN, R. Phytochemical and antimicrobial potential of seed and bark extracts of swietenia mahagoni (L.) Jacq. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 2, p. 712-720, 2019.

ZILBERSTEIN, D.; NITZAN KOREN, R. Host-free systems for differentiation of axenic *Leishmania*. **Leishmania: Methods and protocols**, p. 1-8, 2019.