



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDONÓPOLIS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE

EVERTON DOS SANTOS GOMES

**ATIVIDADE ANTI-*Leishmania* DE PRODUTOS NATURAIS: EXTRATO AQUOSO
DE *Echinaceae purpurea* E TANINOS ISOLADOS DA CASCA DE *Mimosa tenuiflora***

Rondonópolis

2025

EVERTON DOS SANTOS GOMES

ATIVIDADE ANTI-*Leishmania* DE PRODUTOS NATURAIS: EXTRATO AQUOSO DE *Echinaceae purpurea* E TANINOS ISOLADOS DA CASCA DE *Mimosa tenuiflora*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Federal de Rondonópolis como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Orientador(a): Ludiele Souza Castro

Coorientador(a): Camila Martins de Oliveira

Rondonópolis

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte

Ficha Catalográfica elaborada de forma automática com os dados fornecidos pelo(a) autor(a). Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

D722a dos Santos Gomes, Everton.
ATIVIDADE ANTI-Leishmania DE PRODUTOS NATURAIS [recurso eletrônico]
: EXTRATO AQUOSO DE Echinaceae purpurea E TANINOS ISOLADOS DA
CASCA DE Mimosa tenuiflora / Everton dos Santos Gomes. –
Dados eletrônicos (1 arquivo : 75 f., il. color., pdf). – 2025.

Orientador(a): Ludiele Souza Castro. Coorientador(a):
Camila Martins de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Rondonópolis, Faculdade de
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde,
Rondonópolis, 2025. Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Bioprospecção. 3. Compostos Naturais. 4. Leishmanioses. I.
Castro, Ludiele Souza, *orientador*. II. Oliveira, Camila Martins de, *coorientador*. III.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDONÓPOLIS

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE PRODUTOS NATURAIS: EXTRATO AQUOSO DE *ECHINACEAE PURPUREA* E TANINOS CONDENSADOS ISOLADOS DA CASCA DE *MIMOSA TENUIFLORA*”.

AUTOR: MESTRANDO EVERTON DOS SANTOS GOMES

Dissertação defendida e aprovada em 14 de **FEVEREIRO** de 2025.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. PROFA. DRA. CAMILA MARTINS DE OLIVEIRA (PRESIDENTE BANCA / COORIENTADORA)

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Rondonópolis

2.1. PROF. DR. MARCELO BIONDARO GOIS (MEMBRO INTERNO)

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Rondonópolis/PPGBioS

3. PROFA. DRA. PATRÍCIA SAMPAIO TAVARES VERAS (MEMBRO EXTERNO)

INSTITUIÇÃO: Instituto Gonçalo Moniz – IGM/FIOCRUZ

RONDONÓPOLIS, 14/02/2025.

MESTRADO: FOLHA DE APROVAÇÃO 17 (0461559) SEI 23853.000678/2025-

13 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Camila Martins de Oliveira**, **Docente - UFR** em 21/02/2025, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Biondaro Gois**, **Docente - UFR** em 12/03/2025, às 19:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Sampaio Tavares Vera**, **Usuário Externo** em 12/03/2025, às 20:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo= informando o código verificado **0461559** e o código CRC **6E568CB4**.

MESTRADO: FOLHA DE APROVAÇÃO 17 (0461559)

SEI 23853.000678/2025-

13 / pg. 2

Dedico este trabalho aos meus orientadores e amigos com admiração e gratidão pelo seu apoio, carinho e presença ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, os quais tenho como família, por todo apoio e incentivo nos momentos de fragilidade. Em especial, agradeço a Josué Ferreira, Gabriela Dumont e Samantha Ramos por estarem sempre ao meu lado em momentos que quis desistir, servindo como ponto de alicerce e garantindo minha persistência. Amo vocês!

Agradeço as minhas amigas de profissão Amanda Varago, Amanda Freitas, Daniele Menin e Kamilla Bulhões pelo apoio e incentivo para trilhar este caminho, sempre acreditando no meu potencial e me ajudando em momentos de nervosismo desde a graduação e momentos em que trabalhamos juntos.

Ao Gustavo Soares, agradeço pelo apoio emocional e momentos de descontração que tem sido fundamentais para a reta final desta etapa da minha vida. Sou grato por me incentivar e me ajudar a esclarecer em momentos difíceis.

Agradeço à minha orientadora Professora Dr^a. Ludiele Souza Castro, por sua orientação, paciência e apoio ao longo deste percurso. Professora admirável e profissional exemplar, sua expertise e dedicação foram fundamentais para meu desenvolvimento e crescimento profissional e pessoal. Reforço meu apreço pela sua paciência, sempre me ensinando e me apoiando em uma área onde ambos éramos iniciantes. Serei eternamente grato e inspirado pela sua pessoa.

Ao Professor Dr. Marcelo Biondaro Gois, gostaria de agradecer todo o apoio e compreensão. Respeitável professor que me serviu de inspiração para atuação como pesquisador, sua ajuda foi essencial para a execução e conclusão deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde por sua dedicação em nos ensinar e moldar nosso conhecimento crítico e científico. Em especial, agradeço aos professores Dr. João Gabriel Luz e Dr. Bruno Carneiro pelas suas contribuições críticas e construtivas fundamentais para o presente trabalho.

Aos meus colegas de mestrado pela parceria e momentos de descontração, além das trocas de experiências e conhecimento entre as múltiplas áreas da saúde. Agradeço especialmente meu amigo Tiago Silva Peixoto, pela sua amizade, apoio e companheirismo durante esta etapa de nossas vidas.

À toda equipe de técnicos, professores e alunos do Laboratório de Parasitologia Humana/UFMS pela sua colaboração e por terem me aceito em suas instalações para execução do presente trabalho.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Carla Cardozo Pinto de Arruda por ter aceito a colaboração, permitindo que eu efetuasse meus objetivos, bem como sua acolhedora recepção.

Agradeço a doutoranda Fernanda da Silva, uma admirável e inspiradora profissional, pela sua dedicação e paciência em me ensinar e passar todo seu conhecimento técnico e científico.

A Professora Dr^a. Thalita Bachelli Riul, agradeço sua disponibilidade e dedicação em momentos cruciais do trabalho, bem como sua paciência em ensinar e contribuir com seu conhecimento e experiência.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia das <i>Leishmania</i> sp.	15
Figura 2 - Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i> sp.	17
Figura 3 - Mapa mundial do número de casos para leishmaniose tegumentar.....	18
Figura 4 - Espécies atuantes na manifestação de leishmaniose tegumentar.....	19
Figura 5 - Mapa mundial do número de casos de leishmaniose visceral	22
Figura 6 - Estrutura química do antimoniato de N-metilglucamina.....	23
Figura 7 - Estrutura química da Anfotericina B	24
Figura 8 - Estrutura química da pentamidina	25
Figura 9 - Estrutura química da miltefosina	26
Figura 10 - Estrutura química dos taninos hidrolisáveis	28
Figura 11 - Estrutura química dos taninos condensado.....	29
Figura 12 - Interação entre taninos e proteínas de membrana.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SMF	Sistema Monocítico Fagocitário.....	12
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio.....	12
OMS	Organização Mundial de Saúde.....	16
NE	Elastase de Neutrófilos.....	16
NET's	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos.....	16
LT	Leishmaniose Tegumentar.....	18
LC	Leishmaniose Cutânea.....	18
LM	Leishmaniose Mucosa.....	18
LV	Leishmaniose Visceral.....	20
Sb⁺⁵	Antiamoniais pentavalente.....	22
IRA	Insuficiência Renal Aguda.....	23
AmB	Anfotericina B.....	24
ON	Óxido Nítrico.....	31

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas com alta prevalência em países emergentes e em desenvolvimento. Atualmente a quimioterapia é a principal opção para o tratamento desta antropozoonose, entretanto, as drogas utilizadas apresentam limitações, estando associadas à efeitos colaterais graves devido seu perfil tóxico. A prospecção de substâncias com potencial terapêutico é imprescindível visto que o número de casos tem aumentado nos últimos anos. Neste cenário, os produtos naturais representam uma fonte promissora de moléculas com potencial para o desenvolvimento biotecnológico de fármacos. Os taninos condensados são moléculas com atividade inibitória no crescimento de microrganismos através de diferentes mecanismos que resultam em morte celular, enquanto que os preparos de *Echinaceae purpurea* são conhecidos por suas inúmeras atividades biológicas, as quais dependem do seu preparo e fitoconstituíntes. Diante o exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos taninos condensados isolados de *Mimosa tenuiflora* e do extrato aquoso de *Echinaceae purpurea*. Trata-se de um trabalho experimental testando *in vitro* a atividade dos produtos selecionados sobre o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e a citotoxicidade sobre fibroblastos NIH/3T3 de camundongos. Todo o estudo foi realizado utilizando meios de cultura para células e *L. amazonensis*, os quais foram expostos aos grupos testes em diferentes concentrações durante 24h e comparados as drogas de referência (Anfotericina B e Pentamidina). As placas de teste foram lidas em espectrofotometria em diferentes comprimentos de onda para avaliação de viabilidade e mortalidade. Como resultado, os taninos condensados de *M. tenuiflora* apresentaram IC₅₀ 24,59µM, CC₅₀ > 1.000µM e IS > 40,65, mostrando inibição no crescimento das promastigotas, baixa toxicidade e alta seletividade para o parasito; quando comparado aos fármacos de referência, os taninos condensados apresentam similaridade de efeito anti-*Leishmania* ($p > 0,01$) e diferença no perfil citotóxico ($p < 0,01$). O extrato aquoso de *E. purpurea* apresentou uma inibição de 41,87% nas maiores concentrações testadas e com CC₅₀ > 1.000µM, evidenciando uma baixa atividade dentro da faixa testada, abrindo perguntas para estudos com novas concentrações devido seu perfil de baixa toxicidade. Diante o exposto, pode-se afirmar que os taninos condensados isolados de *M. tenuiflora* são moléculas promissoras para o refinamento e desenvolvimento de novas drogas anti-*Leishmania*, enquanto que o extrato aquosos de *E. purpurea* possui um potencial biotecnológico a ser explorado.

Palavras-chave: Biotecnologia; Bioprospecção; Compostos naturais; Leishmanioses.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease with high prevalence in emerging and developing countries. Currently, chemotherapy is the main treatment option for this anthroponosis; however, the drugs used have limitations, being associated with serious side effects due to their toxic profile. The search for substances with therapeutic potential is essential since the number of cases has increased in recent years. In this scenario, natural products represent a promising source of molecules with potential for the biotechnological development of drugs. Condensed tannins are molecules with inhibitory activity on the growth of microorganisms through different mechanisms that result in cell death, while *Echinaceae purpurea* preparations are known for their numerous biological activities, which depend on their preparation and phytoconstituents. Given the above, the present study aims to evaluate the anti-*Leishmania* activity of condensed tannins isolated from *Mimosa tenuiflora* and the aqueous extract of *Echinaceae purpurea*. This is an experimental study testing in vitro the activity of selected products on the growth of promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and the cytotoxicity on NIH/3T3 mouse fibroblasts. The entire study was carried out using cell culture media and *L. amazonensis*, which were exposed to the test groups at different concentrations for 24h and compared to the reference drugs (Amphotericin B and Pentamidine). The test plates were read spectrophotometrically at different wavelengths to assess viability and mortality. As a result, the condensed tannins of *M. tenuiflora* presented IC50 of 24.59 μ M, CC50 > 1,000 μ M and IS > 40.65, showing inhibition of promastigote growth, low toxicity and high selectivity for the parasite; When compared to the reference drugs, the condensed tannins showed similar anti-*Leishmania* effect ($p > 0.01$) and difference in the cytotoxic profile ($p < 0.01$). The aqueous extract of *E. purpurea* showed an inhibition of 41.87% at the highest concentrations tested and with CC50 > 1,000 μ M, evidencing a low activity within the tested range, opening questions for studies with new concentrations due to its low toxicity profile. Given the above, it can be stated that the condensed tannins isolated from *M. tenuiflora* are promising molecules for the refinement and development of new anti-*Leishmania* drugs, while the aqueous extract of *E. purpurea* has a biotechnological potential to be explored.

Keywords: Biotechnology; Bioprospecting; Natural compounds; Leishmaniasis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Gênero <i>Leishmania</i>	14
2.1.1 Ciclo evolutivo e transmissão	16
2.2 Leishmanioses	17
2.2.1 Leishmaniose Tegumentar	18
2.2.2 Leishmaniose Visceral	21
2.3 Tratamento	22
2.3.1 Antimoniais pentavalentes	22
2.3.2 Anfotericina B	24
2.3.3 Pentamidina	25
2.3.4 Miltefosina	25
2.4 Produtos naturais	26
2.4.1 Produtos naturais e as leishmanioses	27
2.5 Taninos	28
2.6 <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	31
REFERÊNCIAS	33
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 ARTIGO CIENTÍFICO	41
4.1 ARTIGO 1 – ATIVIDADE ANTI-<i>Leishmania</i> DE TANINO ISOLADOS DA CASCA DE <i>Mimosa tenuiflora</i>: PROSPECÇÃO PARA ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS (a ser submetido na Revista Brasileira de Farmacognosia)	41
Atividade Anti-<i>Leishmania</i> de taninos isolados da casca de <i>Mimosa tenuiflora</i>: prospecção para alternativas terapêuticas	41

RESUMO	42
Palavras-chave: Leishmanioses; Docking molecular; Produtos naturais.	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAIS E MÉTODOS	44
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
4.2 ARTIGO 2 – ATIVIDADE ANTI-<i>Leishmania amazonensis</i> DO EXTRATO AQUOSOS DE <i>Echinaceae purpurea</i> (L.) MOENCH (a ser submetido na Future Journal of Pharmaceuticals Sciences)	61
RESUMO	62
INTRODUÇÃO	63
RESULTADOS	64
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	68
MATERIAIS E MÉTODOS	68
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causada por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatório do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF). A transmissão ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas do gênero *Lutzomyia* (Ozbilgin *et al.*, 2016; Pachiega *et al.*, 2020). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), esta doença pode se manifestar de várias formas, desde lesões cutâneas até infecções viscerais graves.

Atualmente, o tratamento das leishmanioses é medicamentoso e frequentemente é associado a efeitos adversos graves devido seu perfil hepatotóxico, nefrotóxico, cardiotoxico e toxicidade gastrointestinal (Ezatpour *et al.*, 2015; Mendonça e Antônio, 2020). Diante disso, a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos adversos se torna imprescindível à medida que os números de novos casos aumentam, levando pesquisadores a explorar o potencial anti-*Leishmania* dos produtos naturais (Shen e Hao, 2020; Garza-Torvan *et al.*, 2020; Gervazoni *et al.*, 2020).

Produtos naturais diversos têm mostrado atividade promissora sobre o crescimento de *Leishmania* spp. e outros agentes infecciosos (Silva-Rodrigues *et al.*, 2024). Dentre esses produtos, destacam-se os taninos e os fitoconstituintes dos preparos de *Echinacea purpurea* (L.) Moench, que possuem propriedades bioativas capazes de interferir no ciclo de vida de microrganismos patogênicos (Castro; Calder; Roche, 2021; Pizzi, 2021).

Os taninos são polifenóis encontrados em diversas plantas, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Das *et al.*, 2020; Molino *et al.*, 2019). Estudos indicam que os taninos podem inibir o crescimento de bactérias, fungos e protozoários através da indução de estresse oxidativo e da modulação do sistema imunológico do hospedeiro, podendo ser uma molécula alvo para o estudo de princípios ativos anti-*Leishmania* (Kolodziej; Kinderlen, 2005; Kolodziej *et al.*, 2005).

A espécie *Echinacea purpurea* (L.) é uma planta oriunda da América do Norte representante da família Asteraceae que apresenta grande importância para medicina tradicional devido sua eficiência curativa no tratamento e prevenção de doenças do trato respiratório e urinário (Cheng *et al.*, 2020). Ademais, seus preparos apresentam uma diversidade de atividades biológicas, as quais estão relacionadas aos seus fitoconstituintes, os quais incluem derivados de ácido cafeico, polissacarídeos, compostos fenólicos, alquilamidas e outros, sendo estas moléculas com atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antivirais (Awortwe; Bruckmueller; Kaehler; Cascorbi, 2021; Fierascu *et al.*, 2022).

O controle das leishmanioses é um desafio significativo para a saúde pública global. A exploração de produtos naturais oferece uma alternativa promissora na descoberta de compostos bioativos com alta eficiência e baixa toxicidade, potencialmente reduzindo os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, o presente trabalho busca avaliar *in vitro* a ação anti-*Leishmania* dos taninos condensados isolados da casca da *Mimosa tenuiflora* e do extrato aquosos de *Echinaceae purpurea* (L.) Moench sobre as formas promastigotas de *L. amazoniensis* trazendo possíveis contribuições biotecnológicas para o desenvolvimento de novos fármacos anti-*Leishmania*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

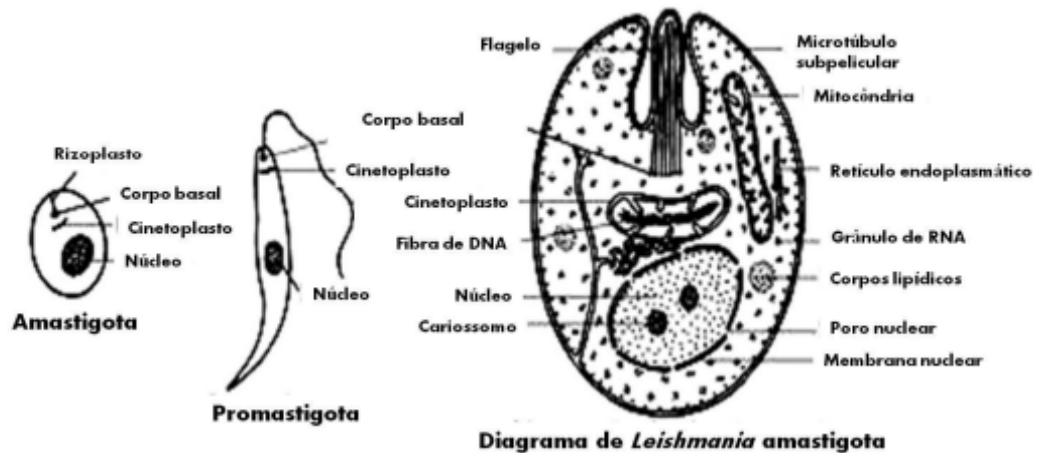
2.1 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* abrange espécies de protozoários intracelulares obrigatórios do SMF que atuam como agentes etiológicos das Leishmanioses. Taxonomicamente, estes organismos pertencem a Ordem: *Kinetoplastida* e Família: *Trypanosomatidae*, no qual o gênero se diferencia em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Rey, 2008). Os protozoários da ordem *Kinetoplastida* são assim classificados devido a presença de uma organela rica em DNA que fornece a capacidade de autorreplicação para estes organismos, o cinetoplasto, sendo a família dos tripanossomatídeos a mais rica e diversa em espécies de protozoários desta ordem. Estes indivíduos são de grande importância médica devido seu potencial patológico para humanos e animais (Rey, 2008; Dias-Lopes *et al.*, 2021).

Morfologicamente, estes protozoários podem apresentar modificações de acordo com a fase evolutiva em que se encontra e com o hospedeiro, distinguindo-se nas seguintes formas: amastigota, promastigota, epimastigota, tripomastigota, opistomastigota, esferomastigota e coanomastigota (Rey, 2008). Essa capacidade de diferenciação de forma permite que estes organismos se adaptem a diferentes meios, sendo capazes de parasitar animais vertebrados e invertebrados (Engroff *et al.*, 2021).

Segundo Rey (2008), os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam somente as formas: 1) amastigota (Figura 1), quando encontrado parasitando o interior das células de vertebrados. Possui formato circular ou ovoide, corpo achatado com pouco citoplasma, núcleo grande, cinetoplasto evidente e flagelo reduzido a cavidade intracelular, tornando o protozoário imóvel e de difícil reconhecimento em técnicas de microscopia; e 2) promastigota (Figura 1), forma encontrada no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados, podendo ser mantidas em meios de cultura. Caracteriza-se por citossomo longo e achatado, núcleo central e cinetoplasto na região anterior próximo ao local onde se encontra a saída do flagelo.

Figura 1- Morfologia das *Leishmanias*



Fonte: Martins, 2013.

Devido à similaridade morfológica entre as inúmeras espécies de protozoários pertencentes a este gênero, há uma dificuldade de diferenciação e identificação das mesmas. Sendo assim, para classificá-las, são considerados aspectos clínicos, epidemiológicos, genéticos, imunológicos, tecido onde se encontra o parasita no hospedeiro e comportamento e crescimento em meio de cultura. Considerando tais evidências, as espécies deste gênero são agrupadas em complexos (Tabela 1) (Silveira; Lainson; Corbett, 2004).

Tabela 1 - Complexos do gênero *Leishmania* e suas respectivas espécies

<i>Leishmania</i>		
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. donovani</i>
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. pifanoi</i>	<i>L. infantum</i>
<i>L. panamensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>
	<i>L. venezuelensis</i>	
	<i>L. garnhame</i>	

Fonte: Adaptado de Rey, 2008.

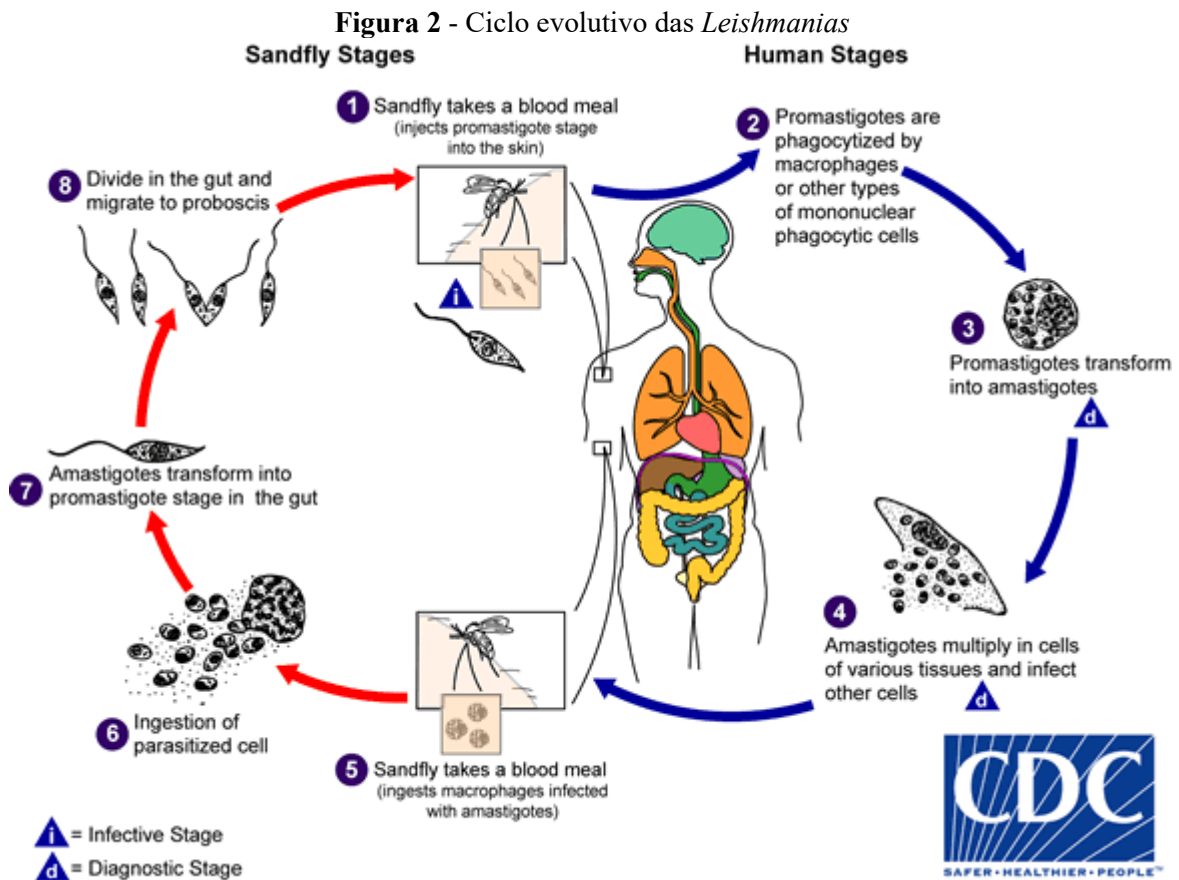
De acordo com Chagas *et al.*, (2022), ainda existem limitações taxonômicas referentes as espécies de *Leishmania*, entretanto são descritas mais de 30 espécies encontradas em mamíferos e répteis dentro do gênero e apenas uma espécie é encontrada somente no flebotomíneo transmissor. Destas, 20 espécies são patógenas para humanos em todo o mundo, com espécies restritas a determinadas áreas de endêmica.

2.1.1 Ciclo evolutivo e transmissão

As espécies do gênero *Leishmania* apresentam ciclo de vida heteroxênico, também conhecido como digenético, que alterna entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os animais vertebrados não humanos, quando infectados por *Leishmania*, podem ser considerados reservatórios quando responsáveis por abrigar o parasita e garantir sua circulação no meio ambiente em um recorte espaço-tempo. Neste sentido, existe uma gama de mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos e felídeos) atuando como reservatório para os protozoários (Ashford, 2000; Melo, 2008; Rey, 2008; Roque; Jansen, 2014; Engroff *et al.*, 2021).

Por outro lado, os invertebrados atuam como vetores, garantindo sua dispersão pelo ambiente. A transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas pertencentes ao gênero *Lutzomya* (Ordem: *Diptera*, família: *Psychodidae*, subfamília: *Phlebotominae*), popularmente conhecido como mosquito-palha, birigui, asa branca, tatuquira, cangalhinha e outros, variando de acordo com a área de ocorrência (OPAS, 2023). As fêmeas infectadas deste inseto são responsáveis pela vetorização do parasito devido seus hábitos hematófagos para garantir maturação dos ovos (Conceição-Silva; Morgado, 2019).

A infecção do hospedeiro vertebrado se inicia após o contato das promastigotas presentes na saliva do vetor com a pele do hospedeiro (Figura 2). Após a picada inicia-se o processo inflamatório ocasionado pelo trauma gerado pelo contato da probóscide do inseto com a pele do hospedeiro, havendo liberação de alarminas, citocinas e quimionas responsáveis por aumentar a infiltração de neutrófilos no local de interesse (Castro, 2014; Morais *et al.*, 2014). Os neutrófilos atuam na defesa contra microrganismos patogênicos através da produção e liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), Elastase de Neutrófilos (NE) e Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NET's). Este mecanismo de defesa cria um ambiente tóxico para as promastigotas que precisam invadir células hospedeiras e se modificar para a forma amastigota a fim de evadir do ambiente extracelular. Uma vez dentro dos neutrófilos ocorre a modificação para a forma amastigota seguida da sua replicação, resultando em apoptose. Os corpos apoptóticos serão fagocitados pelos macrófagos, desencadeando uma resposta anti-inflamatória. Parasitando macrófagos e monócitos de vários tecidos, é possível que o protozoário sob forma amastigota irá se replicar no interior dos fagossomos levando a ruptura celular e liberação dos novos indivíduos no meio extracelular que, por sua vez, serão fagocitados outros macrófagos garantindo o avanço da infecção (Conceição-Silva; Morgado, 2019; Altamura *et al.*, 2022).



2.2 Leishmanioses

As leishmanioses consistem em um grupo de doenças tropicais negligenciadas que representam um grande problema de saúde pública, afetando principalmente países emergentes e populações pobres (OMS, 2023).

Inicialmente, esta zoonose apresentava carácter de predominância em área rural, entretanto, com o aumento exponencial dos centros urbanos, as leishmanioses tornaram-se mais frequentes nas populações que residem em centros urbanos e regiões periurbanas devido aumento do contato humano com vetores, animais reservatórios e espécies do parasito, ocasionados por ações antrópicas (Condino *et al.*, 2008; Xavier, Mendes; Rossi-Barbosa, 2016).

Em razão do potencial patológico de várias espécies do gênero *Leishmania*, as leishmanioses possuem um amplo espectro clínico, apresentando diferentes manifestações clínicas de acordo com a espécie infectante (OMS, 2023). Atualmente, sabe-se que diferentes cepas podem coexistir em locais de alta transmissão, resultando em coinfeções por diferentes

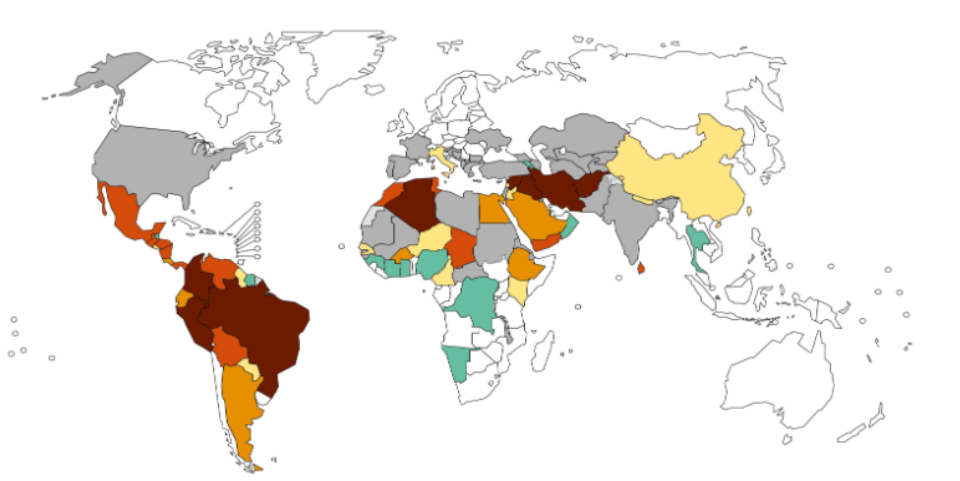
subpopulações de parasitos, ocasionando quadros clínicos mais graves. O avanço e a manifestação clínica das leishmanioses dependem de fatores individuais, como: estado imunológico do paciente, espécie envolvida na infecção do hospedeiro e relação parasito-hospedeiro (Moura *et al.*, 2014; Chagas *et al.*, 2022).

2.2.1 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma manifestação clínica caracterizada por ulcerações dérmicas. Considerando os aspectos ulcerativos, a LT pode apresentar diferentes formas, sendo elas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose mucosa (LM) (Vasconcelos *et al.*, 2018; Brasil, 2021). Por ocasionar lesões físicas, essas manifestações resultam problemas psicológicos e incapacitantes ao paciente devido sua capacidade de causar perdas mecânicas e gerar feridas permanentes (Oliveira *et al.*, 2016; Cerutti *et al.*, 2017).

Oriunda das Américas, a LT se tornou um grande problema de saúde pública devido ao crescente número de casos em virtude da expansão urbana e ações antrópicas que favorecem sua transmissão (Souza *et al.*, 2005). Apesar da baixa morbidade, esta forma clínica possui alta prevalência representando 75% dos casos notificados e uma ampla distribuição geográfica, fatores que a tornam a forma clínica mais comum das leishmanioses com perfil endêmico em 89 países (Figura 4) (OPAS, 2022). Segundo dados epidemiológicos recentes da OMS, no ano de 2021 foram notificados, aproximadamente, 222.000 novos casos autóctones de ambas as formas clínicas da LT, perfil contínuo até os dias atuais.

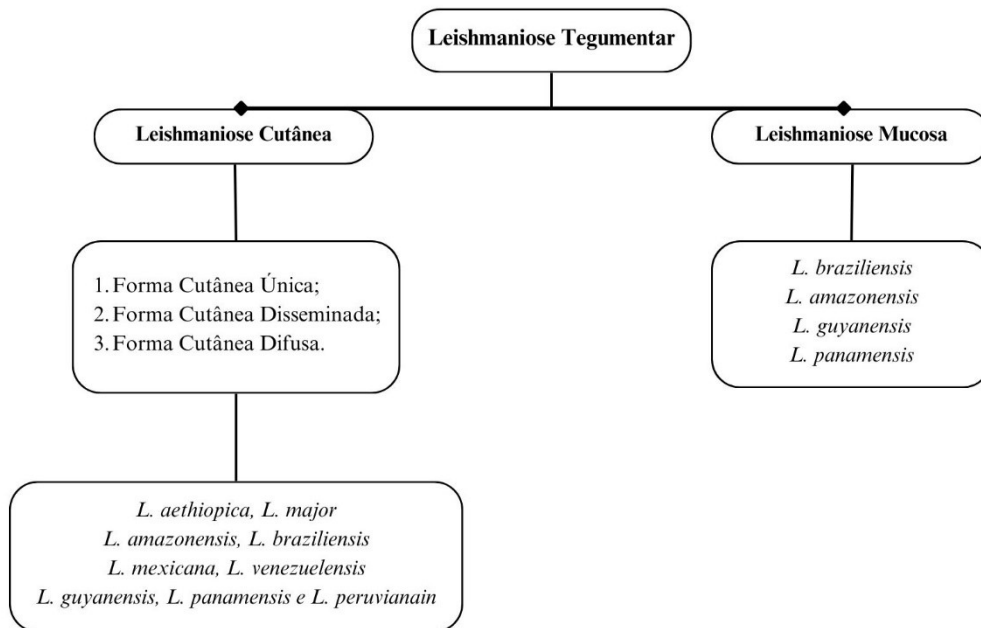
Figura 3 - Mapa mundial do número de casos para leishmaniose tegumentar



Fonte: OMS, 2022. Legenda: Marrom: ≥ 5.000 casos; Laranja: 1000-4999 casos; Amarelo: 100-999 casos; Bege: < 100 ; Verde: 0 casos reportados; Branco: nenhum caso autóctone reportado; Cinza: não aplica.

De acordo com Oliveira *et al.* (2016), as manifestações e formas clínicas das leishmanioses dependem da espécie envolvida na infecção. Atualmente são descritas 19 espécies de *Leishmania* (Figura 6) amplamente distribuídas atuando na manifestação das diferentes formas de leishmaniose tegumentar.

Figura 4 - Espécies atuantes na manifestação de leishmaniose tegumentar



Fonte: Oliveira *et al.*, 2016; Abádias-Granado *et al.*, 2021

Popularmente conhecida como “úlceras orientais” e “furúnculo de Delhi”, a LC caracteriza-se pela formação de pápula eritematosa que evolui em um período de seis meses para lesões indolores com formato côncavo de base avermelhada, borda demarcada e espessa que apresenta granulações grosseiras e fundo avermelhado (Cerutti *et al.*, 2017; Mendonça; Antônio, 2020). Nesta manifestação não há presença de sintomas sistêmicos. Por se iniciar no local onde ocorreu a picada do flebótomo, normalmente as lesões iniciais estão localizadas nas pernas e braços em razão da alta exposição da superfície destes membros (Abádias-Granado *et al.*, 2021; Engroff *et al.*, 2021).

A manifestação cutânea, apesar de mais frequente, apresenta menor letalidade quando comparada as outras. Atualmente a LC ocorre em 21 países apresentando perfil endêmico em 19 deles. Aproximadamente 95% dos casos notificados de LC são oriundos das Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Dentre estas regiões a maioria dos casos

provêm dos países americanos. Segundo a OMS, há um déficit de notificações visto que foram notificados cerca de 200.000 novos casos em todo o mundo no ano de 2021, mas devido à ampla distribuição geográfica do parasito, estima-se que, por ano, ocorram entre 600 mil a um milhão de novos casos de LC (OPAS, 2023).

Quando manifestada de forma isolada, a lesão tende a cicatrizar-se no período de alguns meses ou anos, deixando uma cicatriz semelhante a uma queimadura. Entretanto, a lesões pode evoluir para uma manifestação difusa, a depender da espécie infectante (Cerutti *et al.*, 2017). A forma difusa evolui insidiosamente com o surgimento de uma lesão única nodular que raramente formam ulcerações, a qual evolui de forma lenta para placas extensas dispersas, espalhando-se gradualmente por uma grande extensão dérmica (Vasconcelos *et al.*, 2018; Abádias-Granado, 2021).

A Leishmaniose Cutânea Disseminada caracteriza-se pelo surgimento múltiplo de pápulas, normalmente mais de 10, semelhantes a acnes que não evoluem para ulcerações e pode acometer diversas regiões do corpo, incluindo rosto (Cerutti *et al.*, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2018; Abádias-Granado, 2021).

A Leishmaniose Mucosa representa uma grande preocupação devido sua capacidade de causar obstruções que levam a destruição parcial ou total da boca, garganta e mucosas nasais e podendo ser concomitante, ocasionando seu agravamento (Abádias-Granado *et al.*, 2021). Dependendo da espécie envolvida na infecção, a LM pode surgir após cicatrização das lesões ocasionadas pela forma cutânea ou ambas coexistirem, sendo esta resultado da infecção por diferentes espécies (Vasconcelos *et al.*, 2018).

Segundo Abádias-Granado (2021), o surgimento LM ocorre via disseminação linfática ou hemática anos após a resolução da LC. Caracterizada pelo surgimento de lesões ulceradas secundárias na região facial, principalmente boca e nariz, que podem se estender para região da orofaringe e nasofaringe acometendo cartilagens e cordas vocais causando obstrução dos tecidos e desfiguração. Estudos epidemiológicos apontam que 20% dos casos evoluem para manifestação mucosa em regiões endêmicas. De acordo com a OMS, 90% dos casos de LM ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (Cerutti *et al.*, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2018).

Além dos problemas físicos e mecânicos a LM é potencialmente debilitante, sendo o tratamento a forma mais efetiva para controle infeccioso (Abádias-Granado, 2021). Entretanto, quando o tratamento não surte efeito desejado leva a falha terapêutica, pode haver recidivas da forma mucosa ou evolução para forma difusa, situações dependentes do sistema imunológico do hospedeiro (Cerutti *et al.*, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2018).

2.2.2 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é a manifestação clínica mais grave dentre este grupo de zoonoses. Popularmente conhecida como “calazar”, a LV é uma doença sistêmica resultante da disseminação de macrófagos infectados através do retículo endotelial afetando a medula óssea, baço e fígado, podendo também acometer regiões dérmicas dependendo da espécie infectante (Abádias-Granado *et al.*, 2021). As espécies envolvidas na manifestação visceral estão compreendidas pelo complexo *Leishmania donovani*, sendo elas: *Leishmania donovani*, normalmente associada em infecção de adultos; *Leishmania infantum*, encontrada nas infecções que acometem crianças e pacientes imunossuprimidos (Sousa *et al.*, 2018).

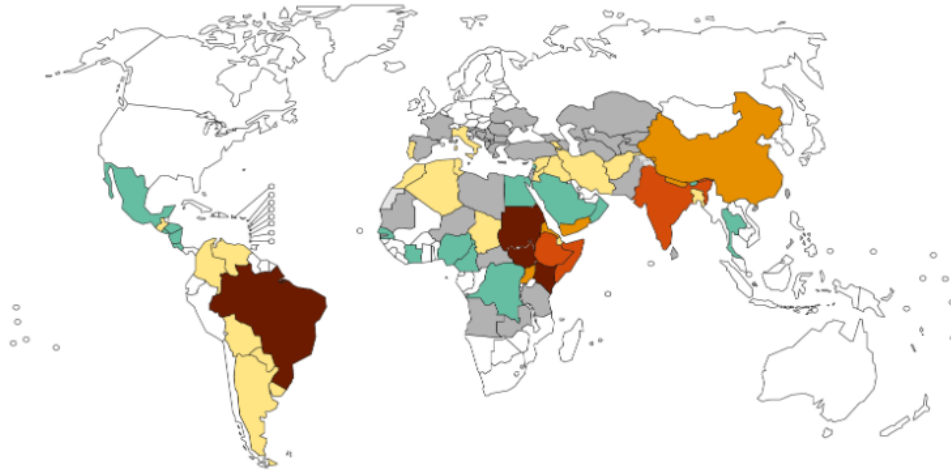
Caracterizada por sua progressão crônica e insidiosa, a LV pode ser assintomática em casos específicos, mas reconhecida pelas crises irregulares de febre seguida de astenia, perda de peso, inchaço do fígado e baço (hepatoesplenomegalia) e anemia. Além disso, exames clínicos podem apontar leucopenia, plaquetopenia intensa, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. O avanço da doença pode ocasionar novas manifestações clínicas que dificultam o diagnóstico preciso, sendo elas: icterícia, diarreia, emagrecimento severo, vômito e edema periférico (Sousa *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2019; Ferreira, 2020).

Segundo Ferreira (2020), a LV é prevalente em diferentes classes sociais e faixas etárias, havendo estudos relatando presença sorológica em todas, entretanto, sabe-se que esta manifestação acomete com maior frequência idosos, crianças e gestantes devido a questões relacionadas ao sistema imunológico. Além disso, a leishmaniose visceral pode se apresentar como uma infecção oportunista de pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sendo estas o grupo mais susceptível.

As ulcerações dérmicas também podem surgir na LV, em uma manifestação denominada leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) podendo ocorrer anos após resolução da forma visceral. Normalmente associada a infecções por *L. donovani*, as lesões dessa manifestação podem ser específicas, caracterizadas pela presença de pápulas, nódulos e úlceras, ou inespecíficas com o surgimento de púrpura ou hiperpigmentação (Abádias-Granado *et al.*, 2021).

De acordo com a OMS, a leishmaniose visceral ocorre em 80 países (Figura 5), sendo grande parte países sul-americanos com letalidade média de 8,2%. Em um contexto global, a maioria dos casos notificados são oriundos do Brasil, África Oriental e Índia, sendo o Brasil responsável por 93% dos registros, apresentando cerca de 3.500 novos casos por ano (OPAS, 2023).

Figura 5 - Mapa mundial do número de casos de leishmaniose visceral



Fonte: OMS, 2022. Legenda: Marrom: ≥ 5.000 casos; Laranja: 1000-4999 casos; Amarelo: 100-999 casos; Bege: <100 casos; Verde: 0 casos reportados; Branco: nenhum caso autóctone reportado; Cinza: não aplica.

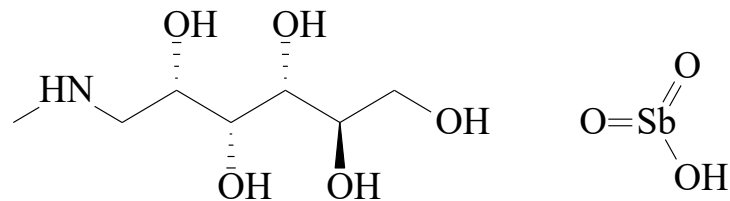
2.3 Tratamento

O tratamento precoce das leishmanioses está entre uma das medidas de controle da doença estabelecidas pela OMS. Atualmente estão disponíveis cinco medicamentos para o tratamento das leishmanioses, sendo eles: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina (OPAS, 2023). A escolha do tratamento depende de inúmeros aspectos clínicos, como a manifestação, a condição física do paciente e toxicidade do tratamento. Além disso, há outros aspectos que podem interferir no tratamento, como custo, adesão do paciente e até mesmo espécie do protozoário envolvida na infecção. Inúmeros estudos evidenciam respostas heterogêneas ao tratamento que são diretamente influenciadas pelo perfil imunológico do paciente, localização geográfica e perfil epidemiológico da região (Santos *et al.*, 2020; Ezatpour *et al.*, 2015).

2.3.1 Antimoniais pentavalentes

Seguindo as diretrizes da Organização Mundial de Saúde, as drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antiamoniais pentavalentes (Sb^{+5}) (Figura 6). Desenvolvido ao longo das décadas, os antiamoniais estão disponíveis nas seguintes formulações: antiamoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime[®]) e estibogluconato de antimônio de sódio (Pertostam[®]) (Brasil, 2017). Atualmente estes são os medicamentos mais utilizados em regiões endêmicas, entretanto o estibocluconato de sódio não se encontra disponível no Brasil (Nühs *et al.*, 2013; Gervazoni *et al.*, 2020).

Figura 6 - Estrutura química do antiamoniato de *N*-metilglucamina



Apesar do tratamento utilizando antiamoniais estar disponível no mercado há mais de 60 anos o seu mecanismo de ação ainda não é bem definido. Considerados pró-fármacos, acredita-se que os antiamoniais atuam diretamente sobre as vias bioenergéticas das formas amastigotas inibindo a glicólise e oxidação de ácidos graxos e reduzindo a produção de ATP e GTP (Moore e Lockwood, 2010; Nühs *et al.*, 2014; Gervazoni *et al.*, 2020; Roatt *et al.*, 2020).

A quimioterapia empregada no tratamento das leishmanioses possui administração intramuscular ou intravenosa, sendo recomendado que a dose administrada seja calculada em miligramas do antiamonial de acordo com o peso corporal por dia ($20 \text{ mg Sb}^{+5}/\text{Kg}/\text{dia}$) (Brasil, 2017).

O regime terapêutico recomendado para administração dos antiamoniais varia de 20 a 30 dias, sendo comum a ocorrência de um ou mais efeitos adversos, como: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e Insuficiência Renal Aguda (IRA). O surgimento de efeitos colaterais durante o tratamento medicamentoso não resulta em interrupção do mesmo, somente em circunstâncias onde a concentração plasmática atinge limites tóxicos, fator que pode acarretar em alterações cardíacas, pancreáticas ou renais (Brasil, 2017; Moore; Loockwood, 2010).

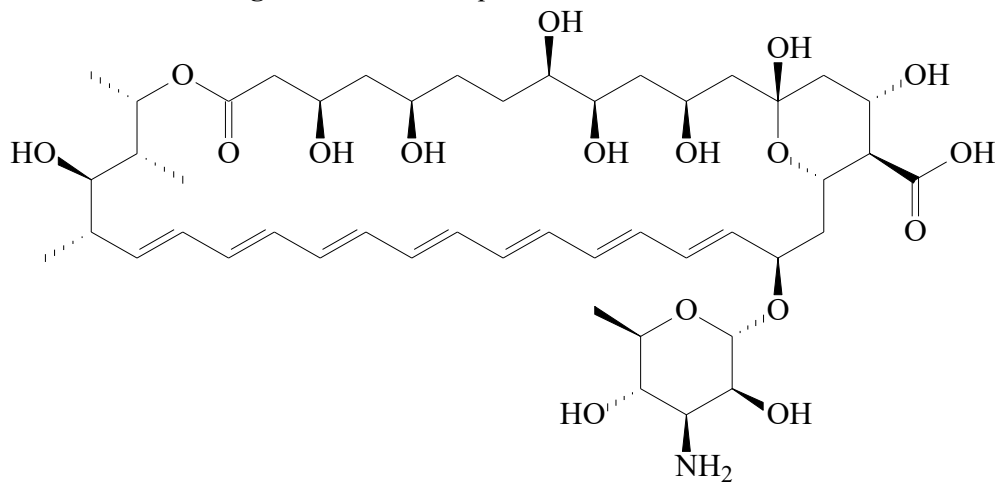
Em razão da toxicidade os antiamoniais são contraindicados para gestantes, visto que esta droga pode transpor a barreira placentária, podendo causar danos ao sistema nervoso

central do feto. Ademais, o tratamento é restrito para pacientes com idade superior a 50 anos, cardiopatas, portadores de nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (Brasil, 2017; Silva *et al.*, 2021).

2.3.2 Anfotericina B

A Anfotericina B (AmB) (Figura 7) é um antibiótico macrólido polieno com potente ação antifúngica que apresenta ótimos resultados para as diferentes formas evolutivas de *Leishmania* (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015). Este fármaco atua diretamente nos esteróis ligados a membrana plasmática do parasito aumentando a permeabilidade e resultando na perda de cátions como K^+ , levando à morte do protozoário (Garza-Tovar *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

Figura 7 - Estrutura química da Anfotericina B



A efetividade do tratamento com AmB depende do tempo de exposição e da quantidade de doses administradas, podendo muitas vezes ser tóxico. No Brasil, a dosagem recomendada pelo Ministério Brasileiro de Saúde é de 0,7 a 1 mg/Kg/dia. A administração da AmB é intravenosa e pode apresentar efeitos colaterais, como: hipocalcemia, anorexia, hipertensão, miocardites e agravamento de complicações nas funções renais, sendo contraindicado para pacientes com IRA ou Insuficiência Renal Crônica (IRC) (Brasil, 2017; Burza; Croft; Boelaert, 2018; Barrett *et al.*, 2019; Garza-Tovar *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

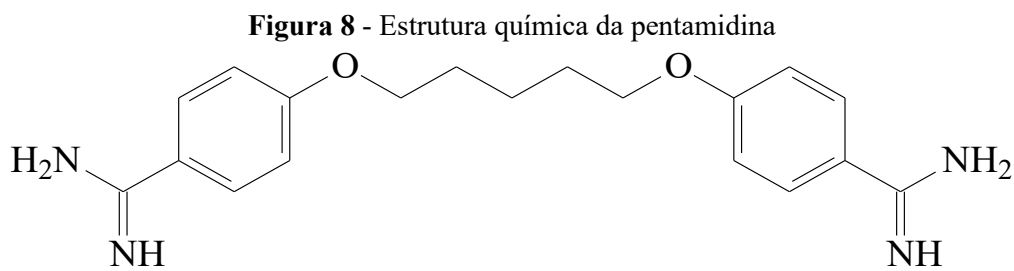
Atualmente, a AmB está disponível em quatro formulações: Anfotericina B Lipossomal (AmBisone[®]); Anfotericina B em dispersão coloidal (Anfocil[®]); e Anfotericina B em complexo lipídico (Abelcet[®]) (Brasil, 2017). Apesar de fortemente recomendadas pela OMS devido sua baixa toxicidade, as formulações das AmB são medicamentos de alto custo e sua administração

requer hospitalização do paciente, fatores que a tornam inviável visto que as leishmanioses acometem populações carentes (Moore; Lockwood, 2010; Roatt *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

2.3.3 Pentamidina

Outra droga utilizada no tratamento das leishmanioses é a pentamidina (Figura 8), uma diamidina aromática utilizada nas regiões endêmicas das américas e nos continentes africano e asiático. A pentamidina encontra-se disponível em duas formulações: Di-B-Hidroxietano-Sulfonato (Isotionato) e Di-B-Hidroximetil-Sulfonato (Mesilato). Sua administração intravenosa e intramuscular, caracterizando-a em um perfil de medicamento hospitalar, sendo recomendado uma dose de 4 mg/Kg/dia (Brasil, 2017).

Apesar da alta capacidade leishmanicida, a pentamidina apresenta alta toxicidade com efeitos colaterais severos, os quais incluem: pancreatite, arritmia cardíaca, leucopenia, IRA, hipocalcemia e taquicardia ventricular (Ghorbani; Farhoudi, 2018). Além disso, pode apresentar hipoglicemia acompanhada de hiperglicemia em razão do medicamento ter ação no mecanismo glicolítico. Ademais, o medicamento está diretamente associado ao risco de desenvolvimento de *Diabetes Mellitus* (DM) devido sua alta toxicidade para as células β -pancreáticas (Silva *et al.*, 2021).

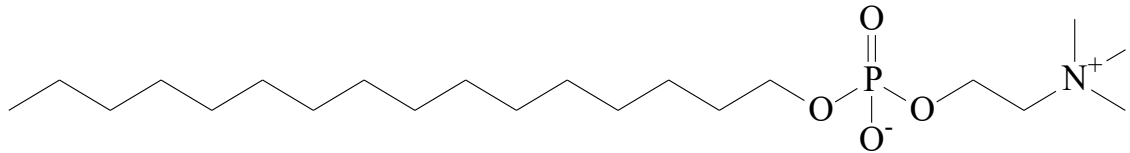


2.3.4 Miltefosina

Desenvolvida inicialmente como um antineoplásico, a Miltefosina (Impavido[®]) (Figura 9) é um alquilfosfolípido, sendo este o único medicamento de administração oral para a leishmaniose (Brasil, 2017). Apesar da sua alta efetividade contra o parasita, o sucesso do tratamento utilizando tal fármaco é relativo e depende da forma clínica da doença bem como a espécie de parasita infectante (Roatt *et al.*, 2020).

Evidências já apontam seu potencial é maior no tratamento de LC visto que essa droga apresenta maior eficiência contra *Leishmania* sp. do novo mundo, apresentando ótimos resultados contra as espécies: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Roatt *et al.*, 2020; Garza-Tovar *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

Figura 9 - Estrutura química da miltefosina



O uso da Miltefosina no Brasil foi aprovado em 2018 pelo SUS, sendo indicado para o tratamento de LC. A dose oral recomendada pela OMS é 2,5 mg/Kg/dia de 2 a 3 dia uma dose limite de 150 mg/dia (Brasil, 2020). Este medicamento apresenta efeitos hepatotóxico e alta toxicidade gastrointestinal, sendo recomendado alimentação antes da administração a fim de diminuir tais efeitos colaterais. Devido seu potencial teratogênico, a miltefosina é contraindicada para gestantes. Apesar do alto poder de cura ofertado pela miltefosina, esta terapia apresenta limitações em razão do seu alto custo e cepas resistentes (Roatt *et al.*, 2020; Garza-Tovar *et al.*, 2020).

Este fármaco também se encontra disponível em uma formulação veterinária utilizada no tratamento de leishmaniose visceral canina (Milteforan[®] – Virbac), entretanto sua efetividade depende da espécie infectante (Santos *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

2.4 Produtos naturais

Em razão da sua incapacidade de locomoção, as plantas desenvolveram mecanismos que permitissem sua adaptação a fatores bióticos e abióticos sem que houvesse comprometimento de células e processos fisiológicos primários (Borges e Amorim, 2020). Esses mecanismos são responsáveis por gerar metabólitos que possuem grande importância para uma série de processos essenciais da planta, sejam eles evolutivos ou ecológicos (Roatt *et al.*, 2020). Esses metabólitos, por sua vez, podem apresentar diversas atividades biológicas de interesse farmacêutico, sendo investigados para possível tratamento de inúmeras doenças.

Entretanto, não só a plantas são fontes de produtos naturais, os fungos e bactérias são fundamentais na prospecção de moléculas com atividade biológica. Atualmente existe uma

variedade de antibióticos oriundos de microrganismos, dentre eles estreptomicina (*Streptomyces griseus*) e anfotericina B (*S. nodosus*), a qual é utilizada no tratamento das leishmanioses (Silva-Rodrigues *et al.*, 2024).

Quanto ao uso de fungos no tratamento de doenças infecciosas, o gênero *Penicillium* originou o primeiro antibiótico, a penicilina, a qual é utilizada até os dias atuais em razão de sua alta eficiência e amplitude (Silva-Rodrigues *et al.*, 2024).

Os metabólitos produzidos por esses organismos possuem uma variedade de composições químicas, e podem ser divididos primários e secundários. Os metabólitos primários são aqueles que estão diretamente relacionados ao crescimento e desenvolvimento da planta, sendo produzidos por todas elas sem especificação (Borges; Amorim, 2020).

Os metabólitos secundários, são altamente específicos e desempenham diversas funções ecológicas importantes para evolução e manutenção da espécie (Borges; Amorim, 2020). Em razão da sua diversidade química, os metabólitos secundários são classificados de acordo com sua função e biossíntese em: I. Terpenos, compostos voláteis e aromáticos que dão sabor e aroma as plantas; II. Alcaloides, compostos nitrogenados encontrados nas plantas; e, III. Compostos fenólicos, estes compostos possuem uma grande variedade de funções em razão da sua ampla diversidade química, podendo ser funcionais na defesa contra outros organismos, incluindo patogênicos, além de produção de cores atrativas para polinizadores e substâncias alelopáticas (Monteiro *et al.*, 2005; Borges; Amorim, 2020; Sánchez, 2022).

2.4.1 Produtos naturais e as leishmanioses

A utilização de plantas medicinais frente a parasitos causadores de LT e LV se mostram relevantes e com resultados promissores, como evidenciados nos trabalhos de Machado *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2020) que avaliou o efeito anti-*Leishmania braziliensis* dos extratos de *Eugenia dysenterica* e *Uncaria tomentosa*, respectivamente, encontrando atividade leishmanicida sobre diferentes formas evolutivas do parasito.

Diversas plantas brasileiras apresentam resultados através de mecanismos distintos, mas eficientes, frente a infecção por *Leishmania* spp. De acordo com Dutra *et al.* (2024), diversos extratos brutos de plantas endêmicas do Brasil apresentam atividades promissoras sobre diferentes espécies do parasito, mas nem todos os extratos passam por caracterização fitoquímica, evidenciando que os trabalhos existentes são iniciais, mas apresentam resultados importantes para o avanço científico, visto que abrem possibilidade para a identificação e isolamento de potenciais moléculas.

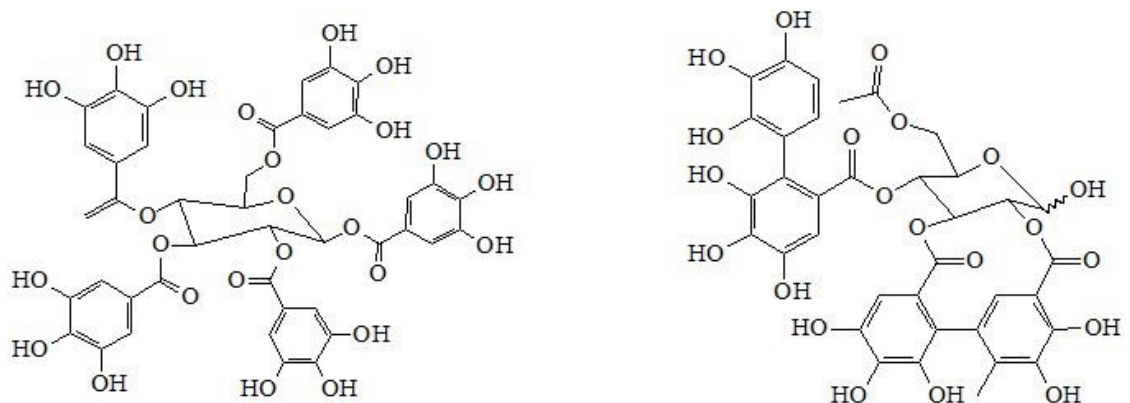
Os produtos naturais oferecem uma gama diversa de compostos químicos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas drogas com mecanismos únicos que possam atuar sobre *Leishmania* spp. (Salem, Werbovets, 2006; Afonso *et al.*, 2023). Entretanto, torna-se necessário refinar os estudos, realizando o isolamento e identificação das moléculas presentes em compostos ativos a fim de obter o princípio ativo que atue sobre as formas amastigotas e promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* com baixos níveis tóxicos.

2.5 Taninos

Os taninos são metabólitos secundários classificados como compostos fenólicos com peso molecular entre 500 e 3000 Dalton. Essas moléculas possuem alta complexidade devido sua natureza polifenólica com grupos hidroxila e outras substâncias adequadas, como grupos carbonila, para formar macromoléculas (Monteiro *et al.*, 2005).

Amplamente encontrados em gimnospermas e angiospermas, os taninos são quimicamente classificados em hidrolisáveis e condensados de acordo com sua estrutura química (Das *et al.*, 2020). Os taninos hidrolisáveis (Figura 10) possuem vários constituintes principais que os diferenciam em galotaninos e elagitaninos de acordo com os produtos oriundos de sua hidrólise (Monteiro *et al.*, 2005). Aqueles classificados como galotaninos apresentam ácido gálico e glicose em sua constituição, enquanto que os elagitaninos apresentam ácido elágico (presença de dois anéis aromáticos) e glicose, sendo estes encontrados em maior frequência na natureza em comparação aos galotaninos (Monteiro *et al.*, 2005; Pizzi, 2021).

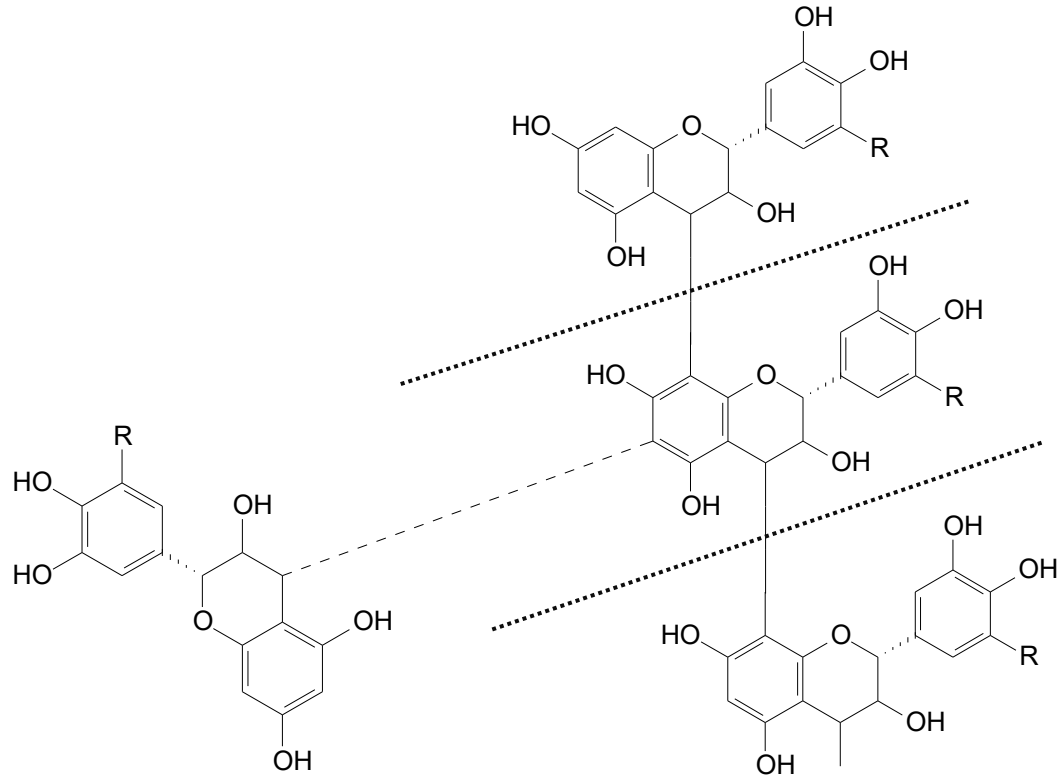
Figura 10 - Estrutura química dos taninos hidrolisáveis. A) Galotanino; B) Elagitanino



Os taninos condensados (Figura 11) são amplamente encontrados no reino vegetal, principalmente em plantas lenhosas (Das *et al.*, 2020). Também conhecidos como

protocianidinas, estas moléculas são compostas por flavolanos ou polímeros de flavan-3-ol (catequinas) e/ou flavan 3,4-diol (leucoantocianidina), ambos são resultados do metabolismo do fenilpropanol (Monteiro *et al.*, 2005; Pizzi, 2021).

Figura 11- Estrutura química dos taninos condensado



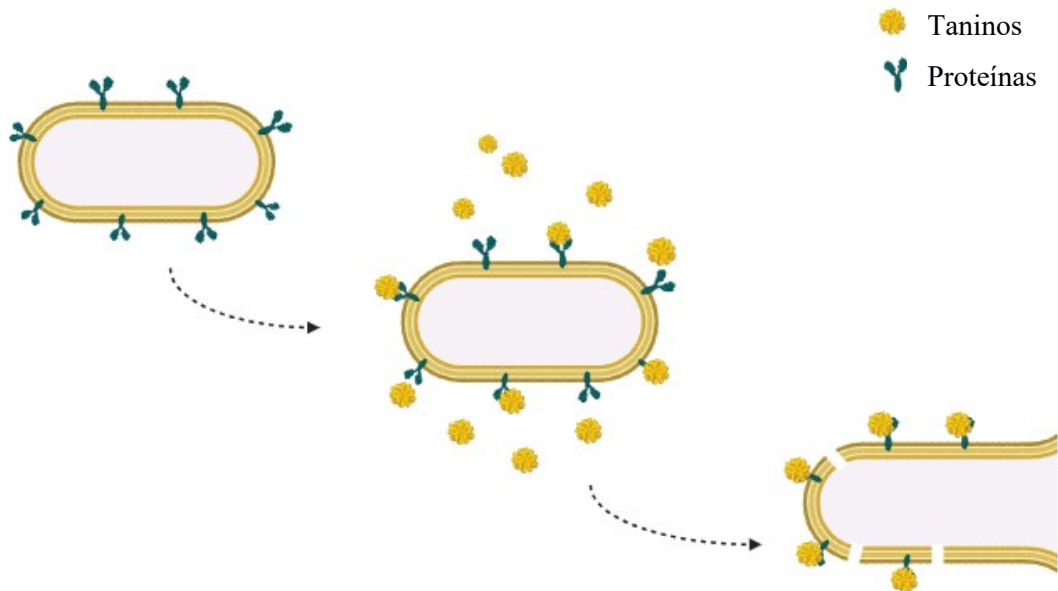
Estes compostos possuem papel crucial na defesa das plantas contra patógenos, onde atuam inibindo o crescimento de fungos patogênicos através de mudanças estruturais na parede celular dos mesmos, resultando no aumento da defesa da planta (Huang *et al.* 2024). Este mecanismo classifica os taninos como moléculas de interesse farmacológico, visto que suas propriedades podem ser investigadas para agentes patogênicos de animais e humanos (Monteiro *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2020; Pizzi, 2021).

Em ensaios *in vitro*, os taninos apresentaram resultados antibacterianos e antifúngicos promissores. Os mecanismos de inibição no crescimento ocasionado por taninos são diversos, podendo causar alterações no DNA, privação de nutrientes ou desestabilização de organelas importantes no metabolismo celular, além de outros mecanismos evidenciados (Molino *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2024).

Segundo Ferreira e Evangelista (2021), estes compostos podem interagir com a membrana plasmática das células, formando complexos com as proteínas a partir de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, perturbando a função e integridade da membrana,

levando a morte celular por lise (Figura 12) (Molino *et al.*, 2019). Além disso, os taninos tem capacidade de inibir enzimas fundamentais para o metabolismo microbiano, impedindo que estes organismos desempenhem funções essenciais, retardando seu crescimento (Pizzi, 2019).

Figura 12 - Interação entre taninos e proteínas de membrana



Fonte: Adaptado de Molino *et al.*, (2019); ilustrações utilizadas foram obtidas gratuitamente no BioRender.

De acordo com Molino *et al.* (2019), os taninos também podem quelar íons minerais essenciais para o metabolismo de patógenos, resultando na privação de nutrientes e interferindo no desenvolvimento do microrganismo. Além disso, o processo de quelatação de íons está relacionado com a inibição das enzimas essenciais para o metabolismo de agentes patogênicos, afetando negativamente a capacidade dos microrganismos em multiplicar (Ferreira; Evangelista, 2021; Kovac *et al.*, 2023). Estes mecanismos não ocorrem somente em bactérias, como também em fungos, evidenciando que os taninos possuem um amplo espectro de atuação frente a diversos agentes patogênicos, podendo afetar também os protozoários do gênero *Leishmania* (Ghodsian *et al.*, 2020; Ferreira; Evangelista, 2021; Huang *et al.*, 2024).

Estudos utilizando taninos para ensaios anti-*Leishmania* são escassos, mas apresentam resultados significativos para considerar esta uma molécula de interesse para tal atividade biológica. Conforme observado no trabalho de Alves *et al.* (2017), o ácido gálico (AG) e o ácido elágico (AE), encontrados em taninos hidrolisáveis, demonstraram inibição no crescimento de promastigotas de *Leishmania major*, com $IC_{50} < 20\mu\text{g/mL}$ para ambos, além de

diminuir a infecção em macrófagos infectados com amastigotas de *L. major* com $IC_{50} < 5\mu\text{g/mL}$.

Os mecanismos de ação dos taninos são múltiplos e pouco elucidados, podendo atuar diretamente sobre o patógeno ou fortalecer células do sistema imune na defesa do hospedeiro. Segundo Kolodziej *et al.* (2001), os taninos podem estimular a função dos macrófagos, aumentando a liberação de Óxido Nítrico (NO) e Fator de Necrose Tumoral (TNF), que são essenciais para resposta imunitária contra agentes patogênicos. Ademais, estimulam a liberação de várias citocinas (IL-1, IL-10, IL-12, IL-18 e Interferons), além de aumentar a disponibilidade de mRNA da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) em células parasitadas, reforçando que estas moléculas aumentam a resposta imunitária dos macrófagos (Kolodziej; Kinderlen, 2005; Kolodziej *et al.*, 2005)

Diante do exposto, observa-se que os taninos são moléculas eficientes no combate de diferentes agentes infecciosos, seja inibindo seu crescimento ou aumentando a capacidade de defesa do hospedeiro. Entretanto, são moléculas pouco estudadas contra diferentes espécies de *Leishmania*, com estudos iniciais avaliando extratos brutos contendo substâncias tânicas em sua composição fitoquímica.

2.6 *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Popularmente conhecida como flor do cone roxo, a *Echinacea purpurea* (L.) Moench é uma planta arbustiva representante da família Asteraceae com uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada na China, Austrália e Europa, com alto endemismo no leste da América do Norte (Cheng *et al.*, 2020).

A *E. purpurea* (L.) Moench desempenha papel importante na medicina tradicional. Suas preparações apresentam propriedades altamente curativas e imunomoduladoras, sendo utilizadas para prevenção e tratamento de resfriados, infecções do trato urinário e respiratório (Wolkart *et al.*, 2006). Segundo Kumar e Ramaiah (2011), os preparos de *E. purpurea* apresentam polissacarídeos, derivados de ácido cafeico, alquilamidas, compostos e fenólicos, dentre outros, os quais lhe conferem uma série de atividades biológicas (Awortwe; Bruckmueller; Kaehler; Cascorbi, 2021; Fierascu *et al.*, 2022).

Inúmeros estudos vêm investigando as propriedades farmacológicas dos diferentes preparos dessa planta e de seus fitoconstituintes, sendo reportado atividades antibacteriana, antifúngicas, anti-inflamatórias, antiproliferativa, antiviral e antioxidante (Dosoky *et al.*, 2023). Uma vez que a bioatividade dos preparos de *E. purpurea* (L.) Moench são altamente

dependentes de seus constituintes, esta planta se torna promissora para a prospecção de compostos antimicrobianos e de interesse farmacológico (Yazdanian *et al.*, 2022).

Estudos prévios mostram que os polissacarídeos encontrados nos preparos de *E. purpurea* (L.) Moench estão associados com suas propriedades inibitórias sobre o crescimento de agentes patogênicos (Balciunaite *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2021). Garzoli *et al.* (2023) relatam que os preparos desta planta exibiram atividade inibitória sobre o crescimento de bactérias patogênicas de humanos, incluindo as gram negativas, sendo este um grupo de bactérias comumente resistente a antibióticos.

Ademais, estudos elaborados por Burlou-Naji *et al.* (2023) mostra que o extrato das folhas de *E. purpurea* (L.) Moenchi com altos teores de flavonoides e compostos fenólicos apresentam atividade sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo estas moléculas capazes de causar alterações na membrana, interferir no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos, diminuir a patogenicidade e aumentar a permeabilidade de membrana (Xie *et al.*, 2014; Górnaiak *et al.*, 2019; Shamsudin *et al.*, 2022).

As atividades inibitórias dos preparos de *E. purpurea* (L.) Moench apresentam resultados significativos sobre o crescimento de bactérias, principalmente aquelas que acometem o trato respiratório e urinário (Gou *et al.*, 2023). Os mecanismos de atuação destes preparos ainda não são elucidados, visto que as respostas biológicas variam de acordo com o tipo de extrato, origem, preparo e fitoconstituintes, mas os estudos utilizando-o focam em sua atividade imunoestimulante e anti-inflamatória, sendo pouco explorado *in vitro* para atividade inibitória de microrganismos (Vieira *et al.*, 2022).

Considerando tais evidências, observa-se que os extratos de *Echinacea purpurea* (L.) Moenchi apresentam amplo espectro de atuação com eficiência para diferentes patogenias infecciosas a depender de sua composição e preparo, sendo uma potencial fonte de novas moléculas para exploração biotecnológica.

REFERÊNCIAS

ABÁDIAS-GRANADO, L.; *et al.* Leishmaniasis cutânea y mucocutânea. **ACTAS Dermo-Sifiliográficas**, v. 112, p. 601-618, 2021.

AFONSO, R. C.; *et al.* Promising natural products for the treatment of cutaneous leishmaniasis: A review of in vitro and in vivo studies. **Experimental Parasitology**, v. 251, 2023.

ALTAMURA, F.; *et al.* The current drug Discovery landscape for trypanosomiasis and leishmaniasis: Challenges and strategies to identify drug target. **Drug Development Research**, v. 83, p. 225-252, 2022.

ALVES, M. M. M.; *et al.* Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 2017.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 269-281, Nov. 2000.

AWORTWE, C.; BRUCKMUELLER, H.; KAEHLER, M.; CASCORBI, I. Interaction of Phytocompounds of *Echinacea purpurea* with ABCB1 and ABCG2 Efflux Transporters. **Molecular pharmaceutics**, v. 18, 2021.

BALCIUNAITĖ, G.; JUODŠNUKYTĖ, J.; SAVICKAS, A.; RAGAZINSKIENĖ, O.; SIATKUTĖ, L.; ZVIRBLYTĖ, G.; MISTINIENĖ, E.; SAVICKIENĖ, N. Fractionation and evaluation of proteins in roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **Acta Pharmaceutica**, v. 65, n. 4, p. 473-479, 2015.

BARRETT, M. P.; *et al.* Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. **Nature Reviews/Microbiology**, v. 17, 2019.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 1ªed. Editora MS: Brasília, 2017. 189p.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Nota informativa 13* (0015545077). Brasília, 2020. 16p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ceará, CE. Ministério da Saúde; 2021.

BURLOU-NAGY, C.; *et al.* Determination of the Bioactive Compounds from *Echinacea purpurea* (L.) Moench Leaves Extracts in Correlation with the Antimicrobial Activity and the In Vitro Wound Healing Potential. **Molecules**, v. 28, 2023.

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

- CARVALHO, A. G.; *et al.* Análise da ocorrência de leishmaniose visceral humana no estado brasileiro de mato grosso: um panorama espacial e demográfico atualizado (2001-2016). In: Simpósio Nacional de Geografia da Saúde, 4º, 2019, Blumenau.
- CERUTTI, P. H. P.; *et al.* Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55-59, 2017.
- CHAGAS, B.D.; *et al.* Interspecies and Intrastrain interplay among *Leishmania* spp. **Parasites. Microorganisms**, v. 10, 2022.
- CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; *et al.* New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, p. 235-242, 2015.
- CHENG, Z. Y.; *et al.* Sesquiterpenes from *Echinacea purpurea* and their anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 179, 1 nov. 2020.
- COHEN, A.; AZAS, N. Challenges and tools for *In vitro* *Leishmania* exploratory screening in the drug development process: An updated review. **Pathogens**, v. 10, 2021.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. *Leishmania* Spp-Host interaction: There is Always na onset, but is there an End?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019.
- CONDINO, M. L. F.; *et al.* Leishmaniose tegumentar americana no litoral norte paulista, período de 1993 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 635-641, 2008.
- DAS, A. K.; *et al.* Review on Tannins: Extraction processes, applications and possibilities. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 58-70, 2020.
- DIAS-LOPES, G.; *et al.* Axenic amastigotes of leishmania species as a suitable model for in vitro studies. **Acta Tropica**, v. 220, 2021.
- DOSOKY, N. S.; *et al.* Volatile composition, antimicrobial activity, and in vitro innate immunomodulatory activity of *Echinacea purpurea* (L.) Moench essential oils. **Molecules**, v. 28, 2023.
- DUTRA, A. S. D. S.; *et al.* Estudo dos casos de Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana na Região Nordeste do Brasil e da utilização de medicamentos fitoterápicos em seu tratamento. **Brazilian Journal Of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 2026-2040, 2024.
- ENGROFF, Paula; MÜLLER, Guilherme C.; MANSOUR, Eva; e outros. **Clínica de Parasitologia**. Porto Alegre: Grupo A, 2021. *E-book*. ISBN 9786556901572. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786556901572/>. Acesso em: 19 fev. 2024.
- EZATPOUR, B.; SAEDI DEZAKI, E.; MAHMOUDVAND, H.; AZADPOUR, M.; & EZZATKHAH, F. (2015). In vitro and in vivo antileishmanial effects of *Pistacia khinjuk*

against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/149707>.

FERREIRA, T. L.; EVANGELISTA, A. J. J. *Mimosa tenuiflora*'s antimicrobial activity on bacteria and fungi from medical importance: an integrative review. **Archives of Microbiology**, 2021.

FIERASCU, I. C.; *et al.* Phytosynthesis of Biological Active Silver Nanoparticles Using *Echinacea purpurea* L. Extracts. **Materials**, v. 15, 2022.

FRÉZARD, F. J. G. (2015) A caminho da cura da leishmaniose visceral canina. Publicado em 4 de dezembro de 2015.

GARZA-TOVAR, T. F.; SACRISTE-HERNÁNDEZ, M. I.; JUÁREZ-DURÁN, E. R.; ARENAS, R. An overview of the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Faculty Opinions*, v. 9, n. 28, 2020.

GARZOLI, S.; *et al.* Chemical Characterization and Antimicrobial Properties of the Hydroalcoholic Solution of *Echinacea purpurea* (L.) Moench and Propolis from Northern Italy. **Molecules**, v. 28, 2023.

GERVAZONI, L. F. O.; *et al.* Use of natural products in leishmaniasis chemotherapy: an overview. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 2020.

GHORBANI, M.; FARHOUD, L. R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Desig DevelopThera**, v. 12, p. 25-40, 2018.

GÓRNIAK, I.; *et al.* Antibacterial activity of medicinal plants and their constituents in the treatment of respiratory tract infections. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5311, 2019.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Bio Mol Intern**, p. 1-23, 2011.

HONORATO, Antonio Marcos. **Atividade in vitro do antiomoniato de meglumina impregnado em diferentes tipos de sílica mesoporosa sobre *Leishmania (Leishmania) amazoniensis***. Orientadora: Carla Cardozo Pinto de Arruda. 2017. 39 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em farmácia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2017.

HUANG, J.; *et al.* Tannins as antimicrobial agents: Understading toxic effects on pathogens. **Toxicon**, v. 247, 2014.

KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O.; FERREIRA, D.; KOŁODZIEJ, H. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor a in macrophages *in vitro*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.56, n. 5, p. 444-454, 2001.

KOŁODZIEJ, H.; BURMEISTER, O.; *et al.* Tannins and related compounds induce nitric oxide synthase and cytokines gene expressions in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 6470-6476, 2005.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; *et al.* Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor- α release in macrophages in vitro. **Planta Med**, v. 67, p. 825-832, 2001.

KOŁODZIEJ, H.; KINDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2056-2071, 2005.

KOVAC, J.; *et al.* Therapeutic potential of flavonoids and tannins in management of oral infectious diseases: A review. **Molecules**, v. 28, n. 158, 2023.

KUMAR, K. M.; RAMAIAH, S. Pharmacological importance of *Echinacea purpurea*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 4, p. 304-314, 2011.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

MACHADO, M.; *et al.* In vitro activity of *Eugenia dysenterica* DC. on *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 13-21, 2018.

MARTINS, Thaís Viana Fialho. **Purificação e caracterização de proteína ligante de heparina de promastigota de *Leishmania chagasi*: implicação na infecciosidade do parasito**. Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.

MELO, L. A. **Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG**. Orientador: Célia Maria Ferreira Gontijo. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2008.

MENDONÇA, L. B.; ANTÔNIO, C. R. S. S. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Mato Grosso. **Revista Eletrônica Interdisciplinar Barra do Garças-MT, Brasil**, v. 12, n. 2, 2020.

MOLINO, S.; *et al.* Natural Tannin Wood Extracts as a Potential Food Ingredient in the Food Industry. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 2836-2848, 2019.

MONTEIRO, J. M.; *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOORE, E. M.; LOOCKWOOD, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, 2010.

MORAIS, C.G.V.; *et al.* The dialogue of the Host-Parasite relationship: *Leishmania* spp. And *Trypanosoma cruzi* infection. **BioMed Reseach International**, 2015.

MOURA, L. M. A.; *et al.* Nível dos conhecimentos sobre as Leishmanioses Visceral e Tegumentar pela População d alguns bairros de Teresina, Piauí, Brasil. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 17, n. 1, p. 21-30, 2014.

NETO, V. L. S.; *et al.* Perfil diagnóstico de enfermagem para pessoas com leishmaniose. **RECOM**, v. 7, 2017.

NÜHS, A.; *et al.* A novel marker, ARM58, confers antimony resistance to *Leishmania* spp. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistan**, v. 4, p. 37-47, 2014.

OLIVEIRA, B. C.; *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Citometry: A review. **Journal of Medical Microbiology e Diagnosis**, v. 5, n. 1, 2016.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Leishmaniose**: Leishmaniose cutânea e mucosa. Disponível in: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-cutanea-e-mucosa>.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. Leishmaniose. Disponível in: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>.

Organización Panamericana de la Salud. Síntesis de evidencia y recomendaciones: directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. *Rev Panam Salud Publica*. 2023;47:e43. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.43>

OZBILGIN, A.; *et al.* Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation od leishmania major from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 6, p. 783-791, 2016.

PACHIEGA, J.; SILVA, G. M. S.; COSTA, R. M.; LONGHI, F. G.; ESPINOSA, A. S. Z.; DOMÍNGUEZ, O. A. S. Incidência da leishmaniose tegumentar americana no centrosul de Mato Grosso, Brasil entre 2000 a 2009. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.11, n.4, p. 126-135, 2020.

PIZZI, A. Tannins medical / pharmacological and related applications: A critical review. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 2021.

PIZZI, A. Tannins: prospectives and actual industrial applications. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 344, 2019.

REY, Luis. **Parasitologia, 4ª edição**. São Paulo: Grupo GEN, 2008. *E-book*. ISBN 978-85-277-2027-4. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2027-4/>. Acesso em: 19 fev. 2024.

ROATT, B. M.; *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 8965-8977, 2020.

ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. Hospedeiros e Reservatórios de *Leishmania* sp. e sua Importância na Manutenção dos Ciclos de Transmissão nos Ambientes Silvestre e Sinantrópico. In: CONCEIÇÃO SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. *Leishmanioses do continente americano* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 233-257.

- SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2571-2598, 2006.
- SÁNCHEZ, H. L. Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios em su adaptación y defensa. **Revista Digital Universitária**, v. 22, n. 2, 2022.
- SANTI, A. M. M.; MURTA, S. M. F. Impacto of genetic diversity and genome plasticity of *Leishmania* spp. In treatment and the search for novel chemotherapeutic targets. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.
- SANTOS, S. S.; *et al.* Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, 2020.
- SHAMSUDIN, S. H.; *et al.* *Echinacea purpurea* root extract mitigates hepatotoxicity induced by hexavalent chromium in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 22, p. 33672-33685, 2022.
- SHEN, Y.; HAO, X. Natural products sciences: an integrative approach to the innovations of plant natural products. **Sci China Life Sci**, v. 63, n. 11, 2020.
- SILVA, F. M.; *et al.* In vitro leishmanicidal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Lantana camara* L.: Antiproliferative effect, ultrastructural alterations and interaction with host cells. **Phytomedicine**, v. 79, 2020.
- SILVA, V. N. S.; *et al.* Considerations on leishmaniasis and the current scenario for developing new forms of treatment. **J trop Pathol**, v. 50, n. 4, p. 255-264, 2021.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, maio 2004.
- SOUSA, N. A.; *et al.* Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose visceral em Sobral – CE de 2011 a 2015. **SANARE**, v. 17, n. 1, p. 51-57, 2018.
- SOUZA, M. A.; *et al.* Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 137-141, 2005.
- VASCONCELOS, J. M.; *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 221-227, 2018.
- VIEIRA, S. F.; *et al.* On the Bioactivity of *Echinacea purpurea* Extracts to Modulate the Production of Inflammatory Mediators. **International Journal of Molecules Scienses**, v. 23, 2022.

WOELKART, K.; *et al.* Bioavailability and pharmacokinetics of *Echinacea purpurea* preparations and their interaction with the immune system. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, n. 9, p. 401–408, 2006.

XAVIER, K. D.; MENDES, F. C. F.; ROSSI-BARBOSA, L. A. R. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico-epidemiológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 1210-1222, 2016.

XIE, Y.; *et al.* Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1149, 2014.

XU, X.; *et al.* Multi-protective role of *Echinacea purpurea* L. water extract in *Allium cepa* L. roots exposed to hexavalent chromium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 40, p. 56938-56948, 2021.

YAZDANIAN, M. *et al.* Evaluation of antimicrobial and cytotoxic effects of *Echinacea* and *Arctium* extracts and *Zataria* essential oil. **AMB Express**, v. 12, n. 75, 2022.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a ação anti-*Leishmania* dos taninos condensados isolados da casca de *Mimosa tenuiflora* e do extrato aquoso de *Echinacea purpurea* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade dos taninos condensados isolados da casca da *M. tenuiflora* e do extrato aquoso de *E. purpurea* sobre o crescimento e sobrevivência das formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Investigar o potencial citotóxico dos taninos condensados isolados da casca da *M. tenuiflora* e do extrato aquoso de *E. purpurea* sobre células de mamíferos;
- Avaliar a capacidade seletiva dos compostos testados.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 ARTIGO 1 – ATIVIDADE ANTI-*Leishmania* DE TANINO ISOLADOS DA CASCA DE *Mimosa tenuiflora*: PROSPECÇÃO PARA ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS (a ser submetido na Revista Brasileira de Farmacognosia)

Atividade Anti-*Leishmania* de taninos isolados da casca de *Mimosa tenuiflora*: prospecção para alternativas terapêuticas

Everton dos Santos Gomes¹; Fernanda da Silva²; Rafael Francisco Rosalem²; Lara Nicolly Dias Santana³; Thalita Bachelli Riul⁴; Andreia Vieira Pereira⁵; Marcelo Biondaro Gois¹;
Ludiele Souza Castro¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde/Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Rondonópolis (UFR), Avenida dos Estudantes, 5.055, Cidade Universitária, 78736-900, Rondonópolis-MT, Brasil. Autor para correspondência: Evertonsgomes2@gmail.com.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Costa e Silva, s/nº – Bairro Universitário, CEP: 79070-900, Campo Grande – MS.

³ Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN). Universidade Federal de Rondonópolis (UFR), Avenida dos Estudantes, 5.055, Cidade Universitária, 78736-900, Rondonópolis-MT, Brasil.

⁴ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição. Faculdade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Costa e Silva, s/nº – Bairro Universitário, CEP: 79070-900, Campo Grande – MS.

⁵ Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

RESUMO

As leishmanioses são doenças parasitárias negligenciadas que representam um desafio significativo à saúde pública devido à toxicidade dos tratamentos convencionais. O presente estudo investigou a atividade anti-*Leishmania* de taninos condensados isolados da casca de *Mimosa tenuiflora*. Foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar a atividade anti-promastigota contra *Leishmania amazonensis* e a citotoxicidade em fibroblastos NIH/3T3. Além disso, estudos de *docking* molecular foram realizados para avaliar as interações entre o tanino e a arginase de *Leishmania mexicana*. Os resultados mostraram que os taninos condensados apresentaram atividade inibitória significativa sobre as formas promastigotas e baixa toxicidade celular, com índice de seletividade > 40. A análise de *docking* revelou interações críticas com os aminoácidos do sítio ativo da enzima. Estes achados destacam os taninos condensados como candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes anti-*Leishmania*.

Palavras-chave: Leishmanioses; Docking molecular; Produtos naturais.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o tratamento das leishmanioses é medicamentoso, com predomínio do emprego de quatro fármacos: antiamoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e miltefosina (Santos et al. 2020; Ezatpour et al. 2015). Entretanto, as drogas disponíveis estão associadas a uma série de efeitos colaterais devido seu perfil hepatotóxico, nefrotóxico, cardiotoxico, dentre outros. Além disso, miltefosina e glucantime são contraindicadas para gestantes devido ao potencial teratogênico e capacidade de causar retardo fetal (Garvazoni et al. 2020; Silva et al. 2021; Garza-Tovar et al. 2020; Roatt et al. 2020; Ghorbani e Farhoudi 2018). Ademais, a taxa de cura dos tratamentos em curso é limitada, podendo ser de apenas 50%. Finalmente, o fato da administração da maior parte deles ser por via intravenosa com cursos de longa duração, relata-se abandono do tratamento por parte dos pacientes e aumento da ocorrência de falha terapêutica (Chappuis et al. 2007; Croft e Coombs 2003).

Uma vez que todos os medicamentos disponíveis para tratamento das leishmanioses apresentam limitações e toxicidade elevada, torna-se necessário a prospecção de substâncias anti-*Leishmania* com potencial para o tratamento da doença de forma isolada ou associadas aos fármacos de referência, e que apresentem menos efeitos colaterais em relação aos atuais (Shen e Hao 2020). Neste cenário, os produtos naturais, aqueles oriundos de plantas e microrganismos, tornam-se alternativas promissoras na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (Borges e Amorim 2020; Sánchez 2022; Pye et al. 2017).

A *Mimosa tenuiflora* é uma planta utilizada na medicina tradicional brasileira devido sua eficiência no tratamento de queimaduras, aceleração de cicatrização e ulcerações venosas (Bezerra et al. 2010; Hernandez et al. 2021). Além disso, possui grande ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*

(Ferreira e Evangelista 2021). Suas propriedades farmacológicas são decorrentes de sua composição química, as quais incluem vários fitoindoles como saponinas e taninos, sendo os taninos moléculas encontradas em abundância na casca de *M. tenuiflora* (Crepaldi et al. 2021; Santos et al. 2022; Borges et al. 2017).

Os taninos condensados são moléculas de grande interesse medicinal, visto que o consumo de chás ricos nessa substância estão associados a propriedades anticarcinogênica e anti-inflamatória (Monteiro et al. 2005; Pizzi 2021). Segundo Das et al. (2020), esta molécula se torna um alvo farmacêutico devido sua capacidade de precipitar proteínas dentro das membranas, resultando em neutralização celular, podendo também se complexar a íons metálicos, capacidade de sequestrar radicais livres e perfil antioxidante, podendo ser testado para diferentes agentes infecciosos (Ucella Filho et al. 2022; Pizzi 2021; Azevêdo et al. 2013).

Estudos prévios mostram que os taninos condensados presentes em diferentes frações do extrato de *Stryphnodendron obovatum* Benth. apresentam atividade antifúngica frente às cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (Sanches et al. 2005). Ucella Filho et al. (2022) relatam que os taninos extraídos de diferentes espécies arbóreas apresentam atividade inibitória sobre o crescimento de *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus*.

Tais evidências mostram que os taninos condensados apresentam amplo espectro em razão dos seus múltiplos mecanismos, podendo ser testados para protozoários. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi testar *in vitro* a atividade anti-*Leishmania* de taninos condensados isolados da casca de *Mimosa tenuiflora*.

MATERIAIS E MÉTODOS

- *Tanino condensado*

O tanino condensado utilizado no presente trabalho foi extraído pelo Núcleo de Pesquisa do Semi-Árido (NUPEÁRIDO), município de Patos, Paraíba-PB, aos domínios da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Posteriormente o material foi purificado no

Laboratório de Tecnologia de Produtos Florestais (LTPF) da UFCG e cedido para a Universidade Federal de Rondonópolis, Faculdade de Ciências da Saúde, para execução de estudos de sua atividade biológica.

- Ensaio anti-promastigota

Foram realizados testes de susceptibilidade *in vitro* sobre as formas promastigotas da *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) na fase log de crescimento em meio Schneider® (Sigma-Aldrich®) apropriadamente suplementado. A inibição do crescimento foi avaliada pela viabilidade celular após adição do MTT (brometo de 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrasodium).

Em placas de 96 poços, foram adicionadas 100µL de cultura na concentração de 10⁶ parasitos/ml (19,75 parasitos/mL) e 100µL dos fármacos/compostos a serem testados em diferentes concentrações. Posteriormente, as placas foram incubadas a 26°C por 72h (Bosquiroli et al. 2015).

Após 72h de incubação, foi adicionado 5 mg/ml de MTT em cada poço, posteriormente as placas foram armazenadas novamente a 37°C, 5% CO₂ durante 4h e, em seguida, foi adicionado DMSO para dissolver os cristais de formazan e a absorbância foi estimada em espectrofotômetro, com comprimento de onda a 540nm.

- Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade do tanino condensado, foram utilizadas células NIH/3T3 (ATCC CRL-1658 linhagem de fibroblastos de camundongo) cultivadas em placas de 96 poços (1x10⁴ células em 100µL por poço) em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e soro fetal bovino a 10% durante 12 horas a 37°C e 5% de CO₂ (Oliveira, 2021).

Passado as 12h, o meio foi substituído por meio RPMI fresco contendo diferentes concentrações de cada composto (100 a 3,125µL/ml) em quadruplicatas e incubado por 24h. Para controle de morte celular foram utilizados fibroblastos tratados com as drogas de

referência anfotericina B e pentamidina. O controle de viabilidade/vida foi dado pelos fibroblastos cultivados somente em meio de cultura (Oliveira, 2021).

Posteriormente adicionou-se 10 μ L de solução de risazurina em cada poço seguido de incubação por 4h a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação, a absorbância foi estimada em espectrofotômetro, com comprimento de onda a 570nm para células vivas e 600nm para leitura de células mortas (Oliveira, 2021).

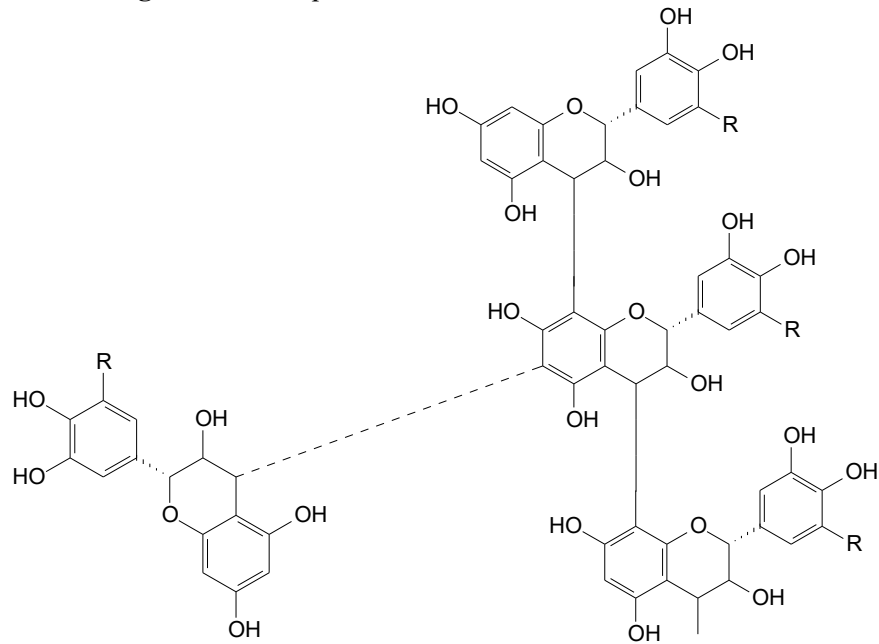
- Docking molecular

O docking molecular foi realizado utilizando *Leishmania mexicana* arginase (LmARG) cristalizada com inibidor ABH (PDBID: 4IU0) (Lohning *et al.*, 2017). Inicialmente a LmARG foi tratada e otimizada no AutoDock Tool (ADT) com o pacote MGLTools (versão 1.5.6), onde foram removidas as moléculas de água e adicionado os hidrogênios polares e cargas para estabelecer ligações rotativas (Chigurupati *et al.* 2022).

Para determinação do sítio ativo da LmARG foi utilizado o software DiscoveryStudio2024 para visualizar o local de inibição da enzima pelo ABH. Após encontrar os resíduos de aminoácidos envolvidos na inibição da LmARG pelo ABH, o GridBox foi confeccionado no ADT, sendo o sítio de ligação ativa entre LmARG e ABH selecionado para interação entre LmARG e tanino condensado isolado da casca de *Mimosa tenuiflora*. O local do GridBox foi definido em x: 4.676, y: -20.0 e z: 4.84 Å, por meio de uma caixa de 30 x 30 x 30 (Chigurupati *et al.* 2022).

A molécula de tanino condensado foi criada no software ChemSketch versão 1.2 de acordo com a estrutura química descrita por Das *et al.* (2020) (Fig.1). Posteriormente foi minimizada e otimizada utilizando o ADT (Chigurupati *et al.* 2022).

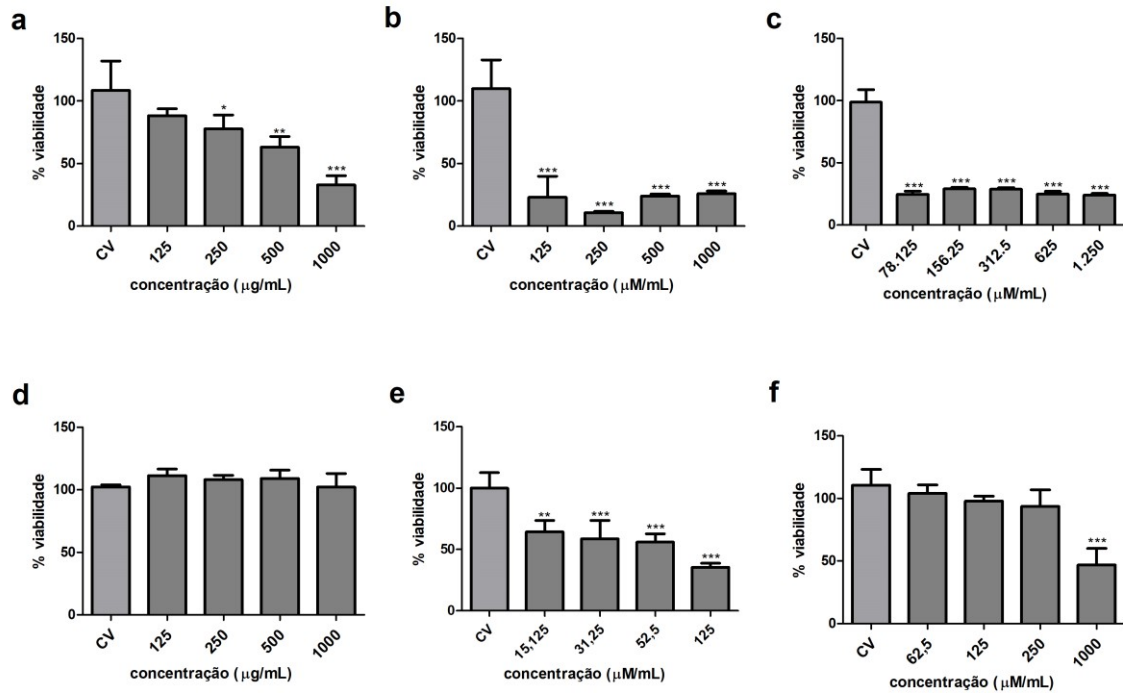
Fig. 1 Estrutura química dos taninos condensado



RESULTADOS

A atividade anti-*Leishmania* dos taninos condensados isolados da casca de *Mimosa tenuiflora* demonstra maior capacidade inibitória sobre o crescimento dos parasitos à medida que aumenta a concentração, como observado na Fig. 2a, enquanto que as drogas de referência utilizadas (anfotericina B e pentamidina) apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* em todas as concentrações testadas (Fig. 2b-c).

Fig. 2 Atividade anti-*Leishmania* e citotóxica dos taninos condensados isolados da casca de *Mimosa tenuiflora* e grupos controles



Legenda: Atividade sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (a-c), a) tanino condensado isolado de *Mimosa tenuiflora*; b) anfotericina B; c) pentamidina. Atividade citotóxica sobre fibroblastos NIH/3T3 murinos (d-f), d) tanino condensado; e) anfotericina B; f) pentamidina. * e *** correspondem a $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA e pós-teste de Tukey).

Quando avaliada a atividade citotóxica sobre fibroblastos 3T3 murinos, observa-se que os taninos condensados isolados da casca de *M. tenuiflora* não apresentaram efeitos de morte celular em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 2d). Por outro lado, a anfotericina B apresentou efeito de morte celular em todas as concentrações utilizadas no experimento, enquanto que a pentamidina mostrou toxicidade somente em sua maior concentração (Fig. 1 e-f).

Os IC_{50} e CC_{50} foram obtidos através de uma regressão linear não paramétrica e os resultados são demonstrados na Tabela 1. O IC_{50} do tanino condensado foi de 24,59 μ M, mostrando capacidade inibitória no crescimento dos parasitos, enquanto que as drogas de

referência utilizadas, apresentaram $IC_{50} <$ as concentrações em μM , sendo este um efeito esperado.

Tabela 1. Atividade anti-*Leishmania* do tanino condensado e grupos controle

Composto	IC₅₀ ($\mu g/ml$ e μM) Promastigotas <i>L. amazonensis</i>	CC₅₀ ($\mu g/ml$ e μM) Fibroblastos NIH/3T3 murinos	IS
Tanino condensado	24,59	>1.000	>40,65
ANFB	0,003851	66,78	17.340
Pentamidina	0,06670	54,17	812,14

A atividade anti-*Leishmania* foi avaliada sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* após 28h. A avaliação da citotoxicidade foi avaliada utilizando fibroblastos 3T3 murinos. O Índice de Seletividade (IS) foi calculado pela relação CC_{50}/IC_{50} . Abreviações: IC_{50} = concentração inibitória máxima; CC_{50} = concentração citotóxica máxima; IS: índice de seletividade. ANFB: anfotericina B usada como droga de referência.

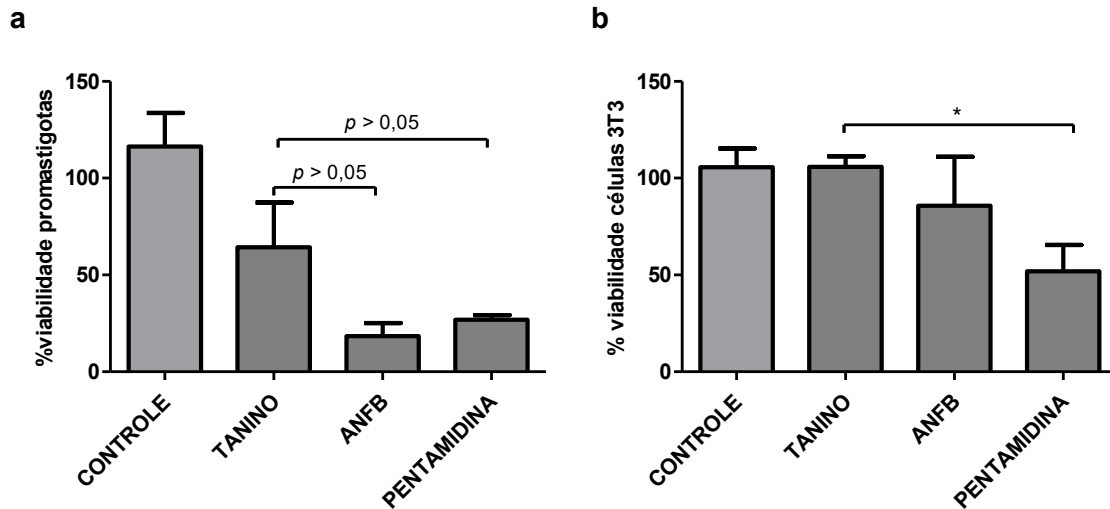
Em relação a capacidade tóxica, o CC_{50} calculado do tanino condensado foi $>1.000 \mu M$.

Por outro lado, as drogas de referência apresentaram $CC_{50} < 100 \mu M$, demonstrando potencial tóxico (Tabela 1).

O Índice de Seletividade (IS) foi calculado para avaliar a capacidade seletiva do composto testado e das drogas de referência. Observa-se na Tabela 1 que o tanino condensado apresentou $IS > 40,65$, mostrando ser seletivo para formas promastigotas de *L. amazonensis*, entretanto, não se pode determinar a seletividade com exatidão visto que o CC_{50} foi além das concentrações testadas.

Na Fig. 3a observa-se a comparação entre a atividade anti-*Leishmania* dos taninos condensados isolados de *Mimosa tenuiflora* e drogas de referência após 72h de exposição. A atividade inibitória é maior nas drogas de referência, entretanto, o efeito que o tanino condensado exerce sobre as promastigotas de *L. amazonensis* é igual ou semelhante ao das drogas de referência ($p > 0,01$).

Fig. 3 Comparação da atividade anti-*Leishmania* e citotóxica entre tanino condensado e drogas de referência



Legenda: a) Comparação da atividade anti-*Leishmania amazonensis* dos taninos condensados e drogas de referência; b) Comparação da atividade citotóxica dos taninos condensados e drogas de referência. * representa $p < 0,01$ (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

Quando realizada a comparação entre a atividade citotóxica dos taninos condensados isolado de *M. tenuiflora* e drogas de referência sobre fibroblastos NIH/3T3 murinos, observa-se que os taninos condensados apresentam menor toxicidade para as células utilizadas em relação as drogas de referência ($p < 0,01$).

O *docking* realizado no presente trabalho mostra interações entre os anéis aromáticos presente no tanino condensado de *M. tenuiflora* e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima (Fig. 4). Foram observadas interações hidrofóbicas do tipo π - π stacked em His 28, His 154 e His 139. Nos resíduos Pro 27 e Ala 192, houve interações hidrofóbicas do tipo π -alkyl. Com a Val 259, houve interação hidrofóbica do tipo π -sigma (Fig. 5). Ademais, foi observado, também, uma interação eletrostática do tipo π -cátion com a His 154 (Figura 4).

Fig. 4 *L. mexicana* arginase com tanino condensado isolado de *M. tenuiflora* ancorado

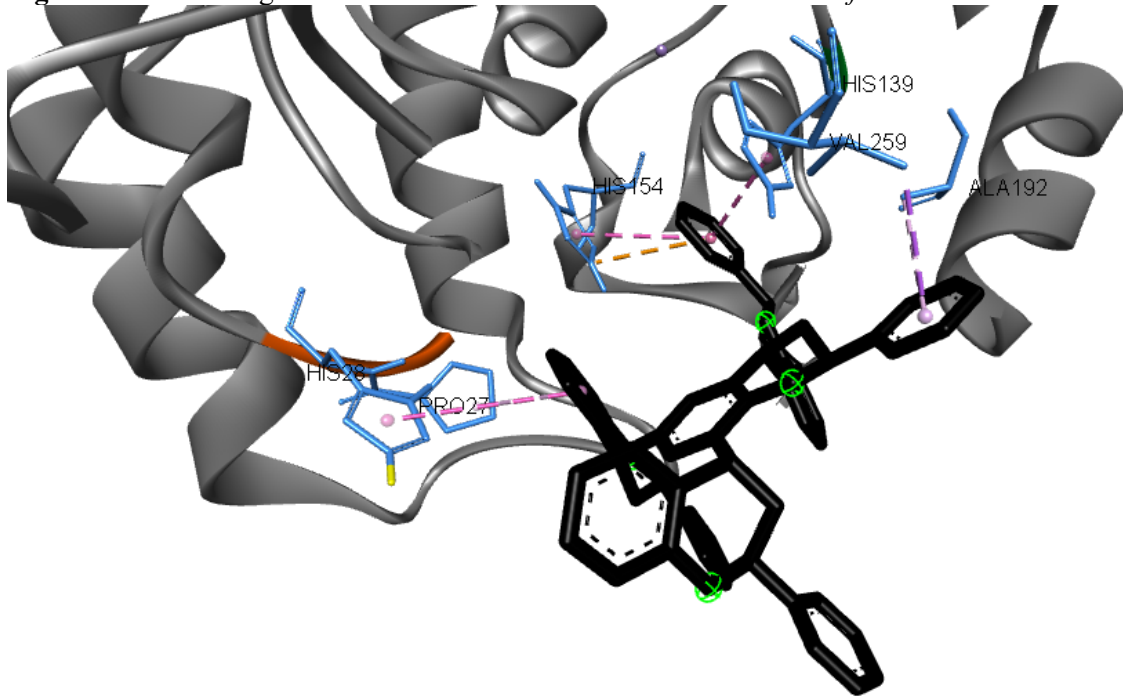
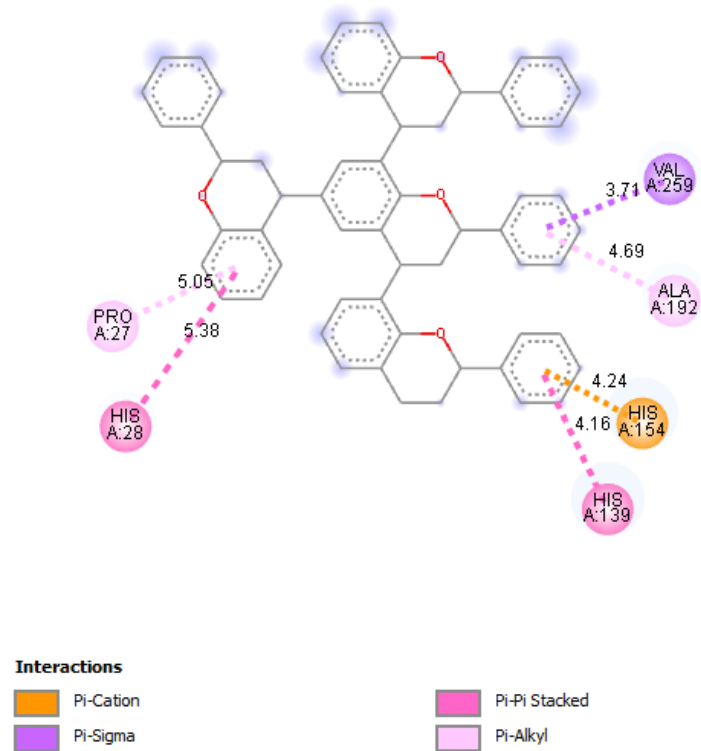


Fig. 5 Diagrama 2D das ligações entre o tanino condensado isolado de *M. tenuiflora* e os resíduos de aminoácidos da *L. mexicana* arginase



DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas que representam um grande problema de saúde pública devido à sua ampla distribuição geográfica (OMS 2023). Trata-se de uma doença que afeta principalmente populações pobres e que vem apresentando desafios em seu tratamento, como eficiência limitada e efeitos tóxicos que resultam em perda de qualidade de vida por parte do paciente (Raj et al. 2020). Neste cenário, torna-se indispensável a prospecção de compostos com atividade anti-*Leishmania* para o desenvolvimento de novas drogas que apresentem resultados significativos e baixa toxicidade em relação aos fármacos convencionais.

Os taninos condensados são oligômeros flavonoides com diferentes graus de polimerização (Jing et al. 2022). Estas moléculas são amplamente utilizadas na área médica devido às suas propriedades, como baixo custo de obtenção, biocompatibilidade, biodegradabilidade e sua abundância na natureza (Guan et al. 2023). Segundo Huang et al. (2024), os taninos condensados possuem papel fundamental na defesa de plantas contra agentes patogênicos, visto que podem causar alterações na parede celular destes.

Os mecanismos antimicrobianos dos taninos condensados são múltiplos. Estas moléculas são capazes de causar alterações no DNA, desestabilizar organelas fundamentais para a homeostase celular, privar absorção de nutrientes e outros (Molino et al. 2019; Huang et al. 2024). Estudos utilizando taninos condensados para atividade anti-*Leishmania* são escassos, sendo este um dos poucos trabalhos que investigam esta atividade. Entretanto, há inúmeros relatos de extratos botânicos contendo substâncias tânicas em sua composição apresentando resultados significativos frente ao parasita.

Lahcene et al. (2023) avaliaram a atividade do extrato aquoso de *Oliveira laperrine* frente às formas promastigotas de *L. infantum*, obtendo um IC_{50} $7,52 \pm 2,71 \mu\text{g/ml}$ e apresentando alto teor de substâncias tânicas em análise fitoquímica (214,89 mg/Kg). Em outro estudo, Ramdane et al. (2017) relatam que o extrato das folhas de *Myrthus nivellei* apresenta atividade inibitória sobre o crescimento das promastigotas de *L. major* e *L. infantum*, com um

teor tânico de 100,92 mg/Kg. Ademais, Ribeiro et al. (2014) avaliaram a atividade do extrato do caule de *Dipteryx alata* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, obtendo um IC₅₀ 0,08µg/ml e encontrando presença de substância tânica em sua composição fitoquímica através de análise qualitativa.

Embora os estudos sejam iniciais e não tenham avaliado a ação de composto isolado, com o presente trabalho pode-se sugerir que os taninos possuem influência na atividade encontrada nos trabalhos citados, visto que os taninos condensados isolados da casca de *M. tenuiflora* apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*.

A atividade inibitória exercida pelo tanino condensado de *M. tenuiflora* torna-se mais efetiva à medida que aumenta a concentração, as quais podem ser aumentadas para estudos futuros. O aumento da concentração do tanino para novos testes torna-se seguro em razão do ensaio de toxicidade sobre célula 3T3 de camundongos, o qual apresentou toxicidade potencialmente baixa. Avaliar novas concentrações para toxicidade e efetividade sobre *Leishmania spp.* do tanino condensado de *M. tenuiflora* torna-se seguro e abre portas para uma nova perspectiva sobre esta molécula.

Apesar das drogas de referência apresentarem resultados mais expressivos sobre a morte do parasito, na comparação entre os grupos é observado que os taninos apresentam a mesma ação que a anfotericina B e a pentamidina, podendo sugerir o refinamento dessa molécula para novos trabalhos. Ademais, quando comparada à toxicidade que ambos os grupos possuem sobre as células 3T3, é observado que os taninos condensados de *M. tenuiflora* possuem menor capacidade de causar morte celular.

O IS calculado não apresenta exatidão, visto que a toxicidade passou o limite das concentrações testadas. Para avaliação do Índice de Seletividade, foram utilizados os parâmetros de Apolinário et al. (2014), o qual indica que compostos com IS > 1 são mais

seletivos para o parasito. Sendo assim, é possível prever que os taninos condensados são moléculas seletivas para o parasito em razão do IS > 40,65, corroborando com Barros et al. (2024) que, testando um composto semi-sintético de produto natural sobre *L. amazonensis*, obteve um IS = 64, mostrando alta seletividade para o parasito.

Já é de consenso científico que os taninos condensados exercem atividade antibacteriana e antifúngica através de diferentes mecanismos, os quais podem ser explorados para outros agentes infecciosos, como os protozoários. Segundo Ferreira e Evangelista (2021), os taninos condensados podem interagir com proteínas de membrana e perturbar sua integridade a partir de interações hidrofóbicas, levando à morte celular (Molino et al. 2019). Além disso, Pizzi (2019) reforça que esta molécula desestabiliza proteínas essenciais para o metabolismo de microrganismos, retardando seu crescimento.

A L-arginase é um alvo para novos medicamentos em razão de suas propriedades funcionais similares, mas estruturalmente distintas, à L-arginase de mamíferos, sendo uma enzima fundamental para a sobrevivência de *Leishmania spp.* (Pudlo; Demougeot e Girard-Thernier 2017).

Na docagem molecular utilizando a estrutura química do tanino condensado e a arginase da *L. mexicana*, foi encontrada interação com resíduos de aminoácidos fundamentais para o funcionamento da enzima. Embora sejam espécies diferentes, a *L. mexicana* e *L. amazonensis* são espécies que fazem parte do mesmo complexo (OPAS 2020). A interação encontrada permite sugerir que a atividade anti-*Leishmania amazonensis* obtida seja através da inibição da L-arginase. Segundo da Silva et al. (2002), a His 139 é um dos aminoácidos envolvidos na ligação de Mn^{2+} e L-arginina, sendo este o sítio ativo da enzima em *Leishmania spp.*. De acordo com Custot et al. (1997), a interação entre His 139 e nor-NOHA bloqueou a atividade da L-arginase. Este mesmo efeito foi observado na interação entre delta-9-THC, derivados de

Benzimidazol e a His 139 da L-arginase de *Leishmania mexicana* (Asvoab; Filaly e Akarid 2022; Betancourt-Conde et al. 2021).

O aminoácido His 154 está diretamente envolvido na ligação de arginase com L-arginina de *L. mexicana* e *L. amazonensis*. A interação com este aminoácido pode inibir a ação enzimática (da Silva et al. 2002; Asvoab; Filaly e Akarid 2022). Fortalecendo o exposto, este efeito foi evidenciado na interação entre compostos de cinamida e His 154 em *L. amazonensis* (Silva et al. 2020; Come et al. 2022).

A interação com a Ala 192 também demonstra capacidade inibitória na função da arginase da *L. amazonensis*, sendo este efeito observado na ligação de fenilhidrazidas e Ala 192 (Lima et al. 2019).

Diante o exposto, pode-se considerar que os aminoácidos His 139, His 154 e Ala 192 são fundamentais para ativação enzimática, podendo sugerir que a interação entre estes aminoácidos e o tanino condensado de *M. tenuiflora* inibiu a ação da L-arginina, resultando em morte das promastigotas de *L. amazonensis*.

Perante os resultados aqui obtidos, observa-se que os taninos condensados apresentam amplo espectro, sendo eficientes como antibacterianos, antifúngicos e até mesmo antiprotozoários. Seus inúmeros mecanismos classificam os taninos condensados como moléculas promissoras para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados abrem portas para novos estudos utilizando tais moléculas no tratamento das leishmanioses, podendo-se concluir que os taninos condensados isolados da casca de *M. tenuiflora* são moléculas promissoras para o desenvolvimento de drogas anti-*Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- APOLINÁRIO AC, et al. (2014) Assessment of the selectivity index of natural and synthetic compounds with antileishmanial activity. *Parasitology Research*, 113(1).
- ASSOUAB A, EL FILALY H, AKARID K (2022) Inhibiting Human and *Leishmania* Arginases Using Cannabis sativa as a Potential Therapy for Cutaneous Leishmaniasis: A Molecular Docking Study. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(12), 400.
- AZEVÊDO TK, et al. (2017) Teor de taninos condensados presente na casca de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) em função das fenofases. V. 24.
- BARROS AM, et al. (2024) Antileishmanial activity in sílico and *in vitro* of semi-synthetic derivatives obtained from natural products. *Scientia Plena*, 20(12).
- BETANCOURT-CONDE I, et al. (2021) Benzimidazole derivatives as new and selective inhibitors of arginase from *Leishmania mexicana* with biological activity against promastigote and amastigote. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 13613.
- BEZERRA DAC, et al. (2009) Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(4), 814-817.
- BORGES IV, et al. (2017) Identificação da fração antimicrobiana do extrato de *Mimosa tenuiflora*. *Comunicata Scientiae*, 8(1).
- BORGES LP, AMORIM VA (2020) Metabólitos secundários de plantas. *Revista Agrotecnologia*, 11(1), 54-67.
- BOSQUIROLI LS, et al. (2015) In vitro anti-*Leishmania infantum* activity of essential oil from *Piper angustifolium*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 124-128.
- CHAPPUIS F, et al. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 873-882.

CHIGURUPATI S, et al. (2022) Molecular docking of phenolic compounds and screening of antioxidant and antidiabetic potential of *Moringa oleifera* ethanolic leaves extract from Qassim region, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29.

COME JAA, et al. (2022) *In vitro* and *in silico* analyses of new cinnamid and Rosmarinic acid-derived compounds biosynthesized in *Escherichia coli* as *Leishmania amazonensis* arginase inhibitors. *Pathogens*, 11, 1020.

CREPALDI AL, et al. (2022) Phytochemical screening, toxicity and antimicrobial activity of different *Mimosa tenuiflora* extracts on *Aeromonas* strains. *Semina: Ciências Agrárias*, 43(2), 641-656.

CROFT SL, COOMBS GH (2003) Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19(11).

CUSTOT J, et al. (1997) The New α -Amino Acid N ω -Hydroxy-nor-l-Arginine: A High-Affinity Inhibitor of Arginase Well Adapted to Bind to Its Manganese Cluster. *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 4086–4087.

DA SILVA ER, et al. (2002) Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *International Journal for Parasitology*, 32, 727-737.

DAS AK, et al. (2020) Review on Tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58-70.

EZATPOUR B, et al. (2015) *In vitro* and *in vivo* antileishmanial effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2015/149707>.

FERREIRA TL, EVANGELISTA AJJ (2021) *Mimosa tenuiflora*'s antimicrobial activity on bacteria and fungi from medicinal importance: an integrative review. *Archives of Microbiology*, 203.

UCELLA FILHO JGM, et al. (2022) Tannin-rich Tree Bark Extracts Inhibit the Development of Bacteria Associated with Bovine Mastitis. *BioResources*, 17(4).

GARZA-TOVAR TF, SACRISTE-HERNÁNDEZ MI, JUÁREZ-DURÁN ER, ARENAS R (2020) An overview of the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Faculty Opinions*, 9(28).

GERVAZONI LFO, et al. (2020) Use of natural products in leishmaniasis chemotherapy: an overview. *Frontiers in Chemistry*, 8.

GHORBANI M, FARHOUD LR (2018) Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy?. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 25-40.

GUAN X, et al. (2023) Natural polyphenol tannin-immobilized composites: rational design and versatile applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 21.

HERNADEZ C, et al. (2021) *Mimosa tenuiflora* aqueous extract: role of condensed tannins in anti-aflatoxin B1 activity in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 13.

HUANG J, et al. (2014) Tannins as antimicrobial agents: Understanding toxic effects on pathogens. *Toxicon*, 247.

JING W, et al. (2022) Pharmacological effects and mechanisms of tannic acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154.

LAHCENE S, et al. (2023) Antileishmanial activities of *Olea europaea* subsp. *Laperrinei* extracts. *Cellular and Molecular Biology*, 69(3), 207-213.

LIMA EC, et al. (2019) Phenylhydrazides as inhibitors of *Leishmania amazonensis* arginase and antileishmanial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27, 3853-3859.

LOHNING AE, STUCKEY JI, KOBRIN EG, WILKINS OM, QUINTANA J, FOX DA, NICHOLSON LK, GRIFFIN PR, KISSELEV LL (2017) A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(5), 1233–1244.

MOLINO S, et al. (2019) Natural Tannin Wood Extracts as a Potential Food Ingredient in the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 2836-2848.

MONTEIRO JM, et al. (2005) Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova*, 28(5), 892-896.

MOURA LMA, et al. (2014) Nível dos conhecimentos sobre as Leishmanioses Visceral e Tegumentar pela População de alguns bairros de Teresina, Piauí, Brasil. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, 17(1), 21-30.

OLIVEIRA AMA (2021) Avaliação da atividade anti-*Leishmania* de extratos de espécies de plantas nativas do Mato Grosso do Sul. Orientadora: Thalita Bachelli Riul. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

OMS – Organização Mundial de Saúde (s.d.) Leishmaniose: Leishmaniose cutânea e mucosa. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-cutanea-e-mucosa>.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde (s.d.) Leishmaniose. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>.

Organización Panamericana de la Salud (2023) Síntesis de evidencia y recomendaciones: directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. Rev Panam Salud Publica, 47, e43. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.43>.

PIZZI A (2021) Tannins medical/pharmacological and related applications: A critical review. Sustainable Chemistry and Pharmacy.

PIZZI A (2019) Tannins: prospectives and actual industrial applications. Biomolecules, 9(8), 344.

PUDLO M, DEMOUGEOT C, GIRARD-THERNIER C (2017) Arginase inhibitors: A rational approach over one century. Medicinal Research Reviews, 37(3), 475-513.

PYE CR, et al. (2017) Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. PNAS, 114(22), 5601-5606.

RAJ S, et al. (2020) Review on natural products as alternative to contemporary anti-leishmanial therapeutics. Journal of Proteins and Proteomics, 11.

RAMDANE F, et al. (2017) Antioxidant antileishmanial cytotoxic and antimicrobial activities of a local plant *Myrtus nivellei* from Algeria Sahara. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(8), 702-707.

RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Experimental Parasitology*, v. 143, p. 60-68, 2014.

ROATT, B. M. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, p. 8965-8977, 2020.

SANCHES, A. C. C. et al. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Strypnodendron obovatum* Benth. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 1, 2005.

SÁNCHEZ, H. L. Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitária*, v. 22, n. 2, 2022.

SANTOS, R. F. et al. Antimicrobial properties of jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (wild.) poir.) pear extracts. v. 8, n. 3, 2022.

SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, 2020.

SHEN, Y.; HAO, X. Natural products sciences: an integrative approach to the innovations of plant natural products. *Sci China Life Sci*, v. 63, n. 11, 2020.

SILVA, E. R. et al. Cinnamides target *Leishmania amazonensis* arginase selectively. *Molecules*, v. 25, n. 5271, 2020.

4.2 ARTIGO 2 – ATIVIDADE ANTI-*Leishmania amazonensis* DO EXTRATO AQUOSOS DE *Echinaceae purpurea* (L.) MOENCH (a ser submetido na Future Journal of Pharmaceuticals Sciences)

Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato aquoso de *Echinaceae purpurea* (L.) Moench

Everton dos Santos Gomes¹; Thalita Bachelli Riul²; Rafael Francisco Rosalem⁴; Lara Nicolly Dias Santana³; Carla Cardozo Pinto de Arruda⁴; Andreia Vieira Pereira⁵; Marcelo Biondaro Gois¹; Ludiele Souza Castro¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde/Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Rondonópolis (UFR), Avenida dos Estudantes, 5.055, Cidade Universitária, 78736-900, Rondonópolis-MT, Brasil. Autor para correspondência: Evertonsgomes2@gmail.com.

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição. Faculdade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Costa e Silva, s/nº – Bairro Universitário, CEP: 79070-900, Campo Grande – MS.

³ Instituto de Ciências Exatas e Naturais (ICEN). Universidade Federal de Rondonópolis (UFR), Avenida dos Estudantes, 5.055, Cidade Universitária, 78736-900, Rondonópolis-MT, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Costa e Silva, s/nº – Bairro Universitário, CEP: 79070-900, Campo Grande – MS.

⁵ Programa de Pós-graduação em Biociências e Fisiopatologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

RESUMO

CONTEXTO:

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Consideradas um problema de saúde pública global, esta parasitose acomete populações pobres e apresenta endemismo em países subdesenvolvidos. Atualmente o tratamento quimioterápico é a forma mais efetiva para prevenção de agravos pela doença, entretanto, as drogas disponíveis apresentam uma série de efeitos colaterais em virtude de seu perfil tóxico, bem como outras restrições e limitações. Devido a isso, a prospecção de substâncias efetivas no controle da doença torna-se uma preocupação por parte dos pesquisadores. Neste cenário, os produtos naturais, como extratos botânicos, representam uma promissora fonte de substâncias efetivas para o desenvolvimento biotecnológico de novos fármacos. A *Echinaceae purpurea* é uma planta endêmica da Europa popularmente utilizada no tratamento de infecções no trato respiratório e urinário, visto que sua composição química lhe garante uma ampla variedade de atividades biológicas. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* do extrato aquoso de *Echinaceae purpurea* sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

RESULTADOS:

O efeito inibitório sobre as promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi observado nas maiores concentrações (500 e 1.000µg/mL), onde o extrato aquoso de *E. purpurea* inibiu 41,87% do crescimento *in vitro* dos parasitos. A atividade citotóxica para células NIH/3T3 foi baixa (CC₅₀ > 1.000µg/mL). Na comparação com drogas de referência encontrou diferença no perfil tóxico e semelhança no efeito inibitório.

CONCLUSÕES:

Com os resultados aqui obtidos, pode se constatar que o extrato aquoso de *E. purpurea* é seguro e eficiente para estudos futuros com novas doses ou formulações combinadas para ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: Produtos naturais; *Leishmania* spp.; Bioprospecção.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública global e uma doença negligenciada que afeta um grande número de pessoas anualmente, sendo estimado 12 milhões de pessoas afetadas e uma população de 300 milhões vivendo em área de risco [1–3].

Considerada uma antropozoonose, as leishmanioses possuem como agente etiológico os protozoários do gênero *Leishmania*, contendo 21 espécies envolvidas nas diferentes manifestações clínicas da doença [4,5]. A *Leishmania (L.) amazonensis* possui um importante papel na prevalência da doença, sendo relatado que 8–12% dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) na América do Sul são causados por esta espécie [6,7]. Ademais, esta espécie acomete cães e humanos com espectro de manifestações clínicas amplo, os quais incluem acometimento cutâneo, mucocutâneo, difuso e visceral [8].

A quimioterapia é a principal opção para o tratamento das leishmanioses, sendo os antimoniais pentavalentes as drogas de primeira escolha, seguidos da anfotericina B e sua formulação lipossomal, miltefosina, paramomicina e diferentes terapias combinadas recomendadas pela OMS [9,10]. Entretanto, as drogas empregadas no tratamento das leishmanioses estão associadas a efeitos colaterais distintos, devido ao seu perfil tóxico, além de relatos de resistência dos parasitos [11,12].

Uma vez que as leishmanioses acometem populações carentes e os medicamentos disponíveis possuem certas limitações, torna-se necessária a prospecção de substâncias com potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias funcionais no tratamento das leishmanioses [13,14]. Neste cenário, os produtos naturais oferecem uma diversidade de compostos químicos que podem ser estudados e refinados para o desenvolvimento de drogas que possam atuar sobre os protozoários do gênero *Leishmania* [15,16].

A *Echinacea purpurea*, popularmente conhecida como flor-de-cone roxa, é uma representante da família *Asteraceae* utilizada na medicina tradicional para prevenção e

tratamento de resfriados, infecções no trato respiratório e trato urinário [17,18]. Sua composição química apresenta polissacarídeos e glicosídeos de ácido chicórico que podem atuar sobre diversas células [19,20].

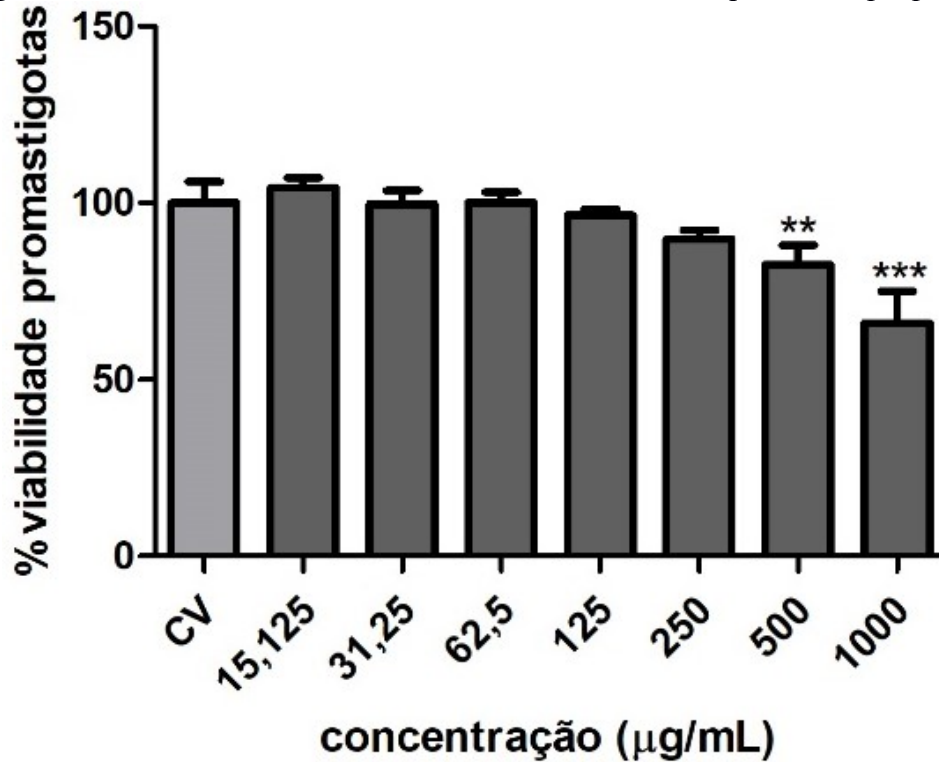
Estudos prévios mostram que o extrato aquoso de *E. purpurea* (EaEp) possui inúmeros constituintes responsáveis por suas atividades biológicas, dentre eles, os derivados de ácido cafeico, alquilamidas, flavonoides, polissacarídeos e poliacetilenos [21,22]. Segundo Dosoky et al. [23], o cariofileno e o α -pineno são prováveis constituintes responsáveis pela ação antimicrobiana ocasionada pelo EaEp. Ademais, estudos mostram que o EaEp possui atividade sobre o crescimento de *Trypanosoma brucei*, entretanto, este efeito é dose-dependente e o potencial é relativo, de acordo com o tipo de preparação [24].

Dadas as evidências, observa-se que o extrato de *E. purpurea* possui um amplo espectro de atuação frente a microrganismos, o qual depende da composição química do extrato e da forma de preparação, fatores que tornam esta planta promissora na triagem de compostos anti-*Leishmania*.

RESULTADOS

A atividade anti-*Leishmania amazonensis* exercida pelo EaEp surte melhor efeito à medida que as concentrações aumentam, como evidenciado na Fig. 1, onde observa-se que o EaEp apresentou inibição de 41,87% no crescimento das promastigotas de *Leishmania amazonensis* nas maiores concentrações. As concentrações de 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram efeito significativo na morte do parasito.

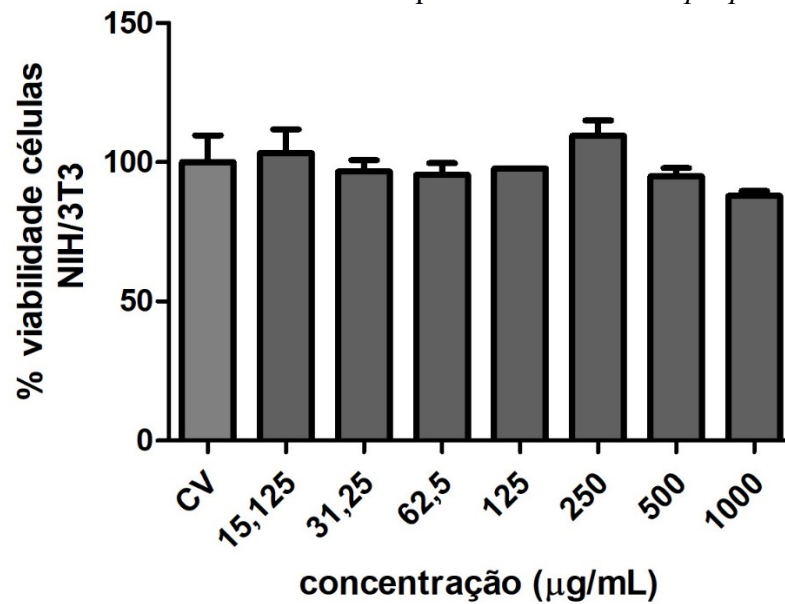
Fig 1. Atividade anti-*Leishmania amazonensis* do extrato aquoso de *E.purpurea*



Legenda: ** e *** correspondem a $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA e pós-teste de Tukey).

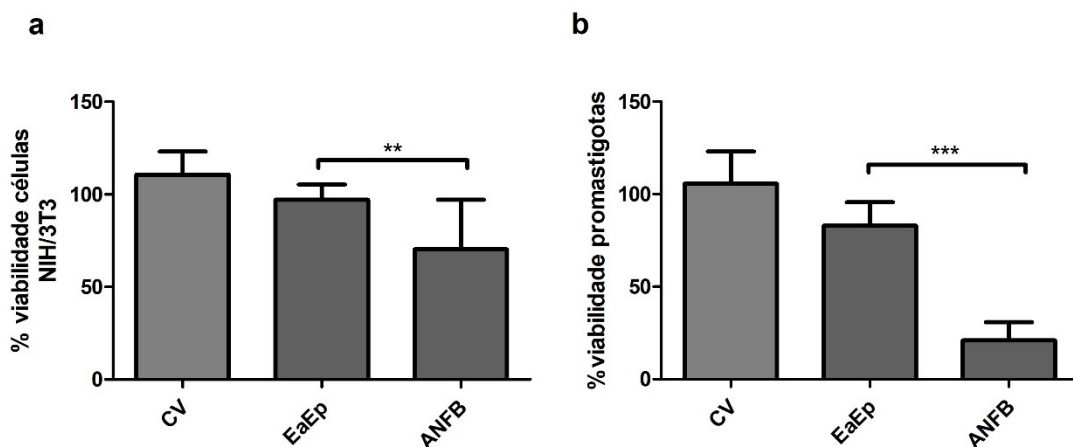
Na avaliação de toxicidade do EaEp sobre os fibroblastos NIH/3T3 de camundongos, observou-se que as concentrações testadas não apresentaram efeitos de morte para a células ($CC_{50} > 1.000\mu M$), evidenciando a segurança do extrato (Fig. 2). Tais evidencias permitem que a exploração do extrato de *E. purpurea* é segura à medida que se aumentam as concentrações, em razão da sua baixa toxicidade.

Fig. 2 Atividade citotóxica do extrato aquoso de *Echinaceae purpurea*



Quando realizada a comparação entre EaEp e ANFB, observa-se que há diferença de efeito entre ambos, mas que os dois grupos exercem a mesma função sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 3b). Em relação a toxicidade, evidencia-se que aos grupos são diferentes entre si, ou seja, a ANFB apresenta maior perfil tóxico em relação ao EaEp (Figura 3a).

Fig. 3 Comparação da atividade anti-*Leishmania* e citotóxica entre o extrato aquoso de *Echinaceae purpurea* e Anfotericina B



Legenda: a) Comparação da atividade anti-*Leishmania amazonensis* do EaEp e ANFB; b) Comparação da atividade citotóxica do EaEp e ANFB. ** e *** correspondem a $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA e pós-teste de Tukey).

DISCUSSÃO

O efeito do extrato aquoso de *E. purpurea* sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* demonstra ser maior à medida que as concentrações aumentam. A atividade inibitória do extrato de *E. purpurea* é variável, sendo dependente da concentração de exposição, tempo e preparação do extrato.

Segundo Canlas et al. [24], o EaEp apresentou diferentes resultados em relação às concentrações e tempo de exposição, sendo a menor concentração testada (1 mg/mL) apresentando menor efeito de morte e sua maior concentração (10 mg/ml) com maior efeito sobre as promastigotas de *Leishmania donovani*. O efeito relatado por Canlas e seu grupo de estudos variou em relação ao tempo, evidenciando que, após 72 h, há maior inibição de crescimento, 21% das formas promastigotas de *L. donovani*.

Os achados no presente trabalho corroboram com os relatos de Canlas et al. [24], visto que o efeito inibitório sobre *L. amazonensis* iniciou-se a partir de 500µg/ml, sendo este o limite mínimo no experimento citado, após 24 h de exposição. Ademais, o extrato etanólico de *E. purpurea* demonstra capacidade inibitória sobre a proliferação de *L. major*, sendo capaz de inibir 59% das formas promastigotas.

Considerando os resultados aqui obtidos, é possível prever que as promastigotas de *Leishmania* spp. possuem respostas diferentes ao extrato de *E. purpurea*, e que sua ação depende do tempo de exposição [24].

Uma vez que o limite máximo de concentração não foi suficiente para alcançar os resultados esperados e determinar o índice de concentração inibitória 50% (IC₅₀), o presente estudo abre questionamentos para eventuais trabalhos utilizando novas concentrações, as quais são asseguradas pelo ensaio de citotoxicidade realizado, onde observa-se que o EaEp não apresenta toxicidade à medida que as concentrações aumentam.

Em um trabalho prévio, foi avaliado o potencial quimioterápico do extrato hidroalcoólico de *E. purpurea* associado ao antiamoniato de meglumina no tratamento de leishmaniose cutânea induzida por infecção por *L. major*, o qual não surtiu efeito esperado devido às doses testadas, sendo esta uma consideração apontada pelos autores para estudos futuros [27]. Neste sentido, a continuidade deste experimento torna-se importante para predizer a dose eficiente a ser testada em estudo *in vivo*, visto que a eficiência do extrato de *E. purpurea* depende de tempo de exposição, concentração e espécie infectante.

O *EaEp*, assim como outras preparações deste extrato, mostra efeitos sobre as promastigotas de *L. major*, *L. donovani* e, com os resultados aqui obtidos, *L. amazonensis*, sendo estas espécies envolvidas na manifestação de leishmaniose cutânea. Os preparados de *E. purpurea* tornam-se promissores para o tratamento, visto seu amplo espectro de atuação e capacidade curativa eficiente associada a um perfil menos tóxico em relação à anfotericina B.

CONCLUSÃO

Diante o exposto, conclui-se que o presente trabalho fomenta para eventuais pesquisas avaliando a dose-competência dos preparos de *E. purpurea* no tratamento de leishmaniose cutânea, seja seu uso isolado ou combinado com outras drogas ou as tradicionalmente utilizadas na quimioterapia anti-*Leishmania*.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Extrato aquoso de *Echinacea purpurea*

O extrato aquoso de *Echinacea purpurea* utilizado no presente trabalho foi preparado e cedido pelo Laboratório de Neurogastroenterologia Experimental, no Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. Foi realizada a transferência de tecnologia para a Universidade Federal de Rondonópolis, Faculdade de Ciências da Saúde, para execução de estudos de sua atividade anti-*Leishmania*.

- Ensaio anti-promastigota

Foram realizados testes de susceptibilidade *in vitro* sobre as formas promastigotas da *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) na fase log de crescimento em meio Schneider (Sigma-Aldrich®) apropriadamente suplementado. A inibição do crescimento foi avaliada pela viabilidade celular após adição de resazurina e leitura em dois comprimentos de onda, 570nm para células vivas e 600nm para leitura de células mortas.

Em placas de 96 poços, foram adicionados 100µL de cultura contendo promastigotas de *L. amazonensis* e 100µL do extrato aquoso de *E. purpurea* diluído em DMSO, seguido de diluição seriada iniciada em 1.000µg/ml para avaliação de diferentes concentrações. Para avaliação de morte, foi utilizada a anfotericina B como droga de referência [25,26].

- Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade do *EaEp*, foram utilizadas células NIH/3T3 (ATCC CRL-1658 linhagem de fibroblastos de camundongo) cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico durante 12 horas a 37°C e 5% de CO₂ [25].

Passadas as 12 h, o meio foi substituído por meio RPMI fresco contendo diferentes concentrações do *EaEp* em quadruplicatas e incubado por 24 h. Para controle de morte celular foram utilizados fibroblastos tratados com anfotericina B. O controle de viabilidade/vida foi dado pelos fibroblastos cultivados somente em meio de cultura [25].

Posteriormente, adicionou-se 10µL de solução de resazurina em cada poço, seguido de incubação por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. Após incubação, a absorbância foi estimada em espectrofotômetro, com comprimento de onda a 570nm para células vivas e 600nm para leitura de células mortas [25].

REFERÊNCIAS

1. Volpedo G, Manickam R, Stager S, et al. (2021) Mechanism of immunopathogenesis in cutaneous leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL). *Front Cell Infect Microbiol* 11:685296.
2. Carvalho-Silva R, Santos EM, Vasconcelos dos Santos T, et al. (2022) Predominance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* DNA in *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an endemic area for leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 64:e58.
3. OMS – Organização Mundial da Saúde. Leishmaniose: Leishmaniose cutânea e mucosa. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-cutanea-e-mucosa>.
4. Kato H (2025) Epidemiology of leishmaniasis: risk factors for its pathology and infection. *Parasitol Int* 105.
5. Garcia MSA, Lima ACM, Pereira IR, et al. (2025) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Trends Parasitol* 41(1).
6. Burza S, Croft SL, Boelaert M (2018) Leishmaniasis. *Lancet* 392:951-970.
7. Gonçalves LP, da Costa-Rego TA, Bentes-Alves T, et al. (2020) Further insights into the eco-epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in the Belem metropolitan region, Pará State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 53:e20190352.
8. Silva TF, Carvalho LP, Rocha OG, et al. (2021) Phenotypical and genotypical differences among *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: A systematic review. *Acta Trop* 221:105627.
9. Machín L, Nápolis R, Gille L, Monzote L (2021) *Leishmania amazonensis* response to artemisinin and derivatives. *Parasitol Int* 80:102171.

10. Lemos ASO, Oliveira FM, Martins RL, et al. (2025) Lantana camara L. induces a multi-targeted cell death process in *Leishmania amazonensis*. J Ethnopharmacol 331:115450.
11. Minori K, Hirata K, Fujimori H, et al. (2025) An organogold compound impairs *Leishmania amazonensis* amastigotes survival and delays lesion progression in murine cutaneous leishmaniasis: Mechanistic insights. Biochem Pharmacol 232:115093.
12. Velásquez AMA, Ramirez JL, Cardona NI, et al. (2025) The binuclear cyclopalladated complex CP2 is targeting ubiquinol-cytochrome c reductase (complex III) of *Leishmania amazonensis*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 27:100712.
13. Cohen A, Azas N (2021) Challenges and tools for in vitro Leishmania exploratory screening in the drug development process: An updated review. Pathogens 10(4):421.
14. Santi AMM, Murta SMF (2022) Impact of genetic diversity and genome plasticity of *Leishmania* spp. in treatment and the search for novel chemotherapeutic targets. Front Cell Infect Microbiol 12:892345.
15. Salem MM, Werbovetz KA (2006) Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. Curr Med Chem 13:2571-2598.
16. Afonso RC, Almeida-Souza F, Lima LM, et al. (2023) Promising natural products for the treatment of cutaneous leishmaniasis: A review of in vitro and in vivo studies. Exp Parasitol 251.
17. Wolkart K, Bauer R, Knaus HG, et al. (2006) Bioavailability and pharmacokinetics of *Echinacea purpurea* preparations and their interaction with the immune system. Int J Clin Pharmacol Ther 44(9):401–408.
18. Cheng ZY, Wang Y, Liu C, et al. (2020) Sesquiterpenes from *Echinacea purpurea* and their anti-inflammatory activities. Phytochemistry 179:112518.
19. Kumar KM, Ramaiah S (2011) Pharmacological importance of *Echinacea purpurea*. Int J Pharma Bio Sci 2(4):304–314.

20. Barrett B (2003) Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review. *Phytomedicine* 10(1):66–86.
21. Harborne J, Williams C (2004) Phytochemistry of the Genus *Echinacea*. In: Miller SC, Yu H (eds) *Echinacea: The Genus Echinacea (Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles)*. CRC Press, Boca Raton, pp 55–71
22. Cozzolino R, Pinto G, Morganti R, et al. (2006) Structural analysis of the polysaccharides from *Echinacea angustifolia* Radix. *Carbohydr Polym* 65:263-268.
23. Dosoky NS, Satyal P, Vass Z, et al. (2023) Volatile composition, antimicrobial activity, and in vitro innate immunomodulatory activity of *Echinacea purpurea* (L.) Moench essential oils. *Molecules* 28(1):354.
24. Canlas J, Hudson JB, Sharma M, Nandan D (2010) *Echinacea* and trypanosomatid parasite interactions: growth-inhibitory and anti-inflammatory effects of *Echinacea*. *Pharma Biol* 48(9):974–980.
25. Oliveira FM (2021) Evaluation of cytotoxicity and antileishmanial activity of *Echinacea purpurea*. *J Trop Med* 2021:5553210.
26. Bosquiroli LM, Pacheco FF, Almeida EB, et al. (2015) Anfotericina B como referência em testes de susceptibilidade contra *Leishmania* spp. *Rev Bras Farmacogn* 25(3):312–318.
27. Sarkari B, Hatam G, Adinehbeigi K, et al. (2016) Effect of hydroalcoholic extract of *Echinacea purpurea* in combination with meglumine antimoniate on treatment of *Leishmania major*-induced cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Int J Appl Basic Med Res* 6(4):246–250.