

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

JANDERSON WEYDSON LOPES MENEZES DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR DA
Ximenia americana L. (Olacaceae) SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

RECIFE

2020

JANDERSON WEYDSON LOPES MENEZES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR DA
Ximenia americana L. (Olacaceae) SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof^o. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Coorientador: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Alves

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

S586a Silva, Janderson Weydson Lopes Menezes da.
Avaliação do potencial leishmanicida e imunomodulador da *Ximenia americana* L. (Olacaceae) sobre células mononucleares de sangue periférico humano. 2020. / Janderson Weydson Lopes Menezes da Silva. – Recife: [s.n.], 2020.
57 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos;
coorientador: Luiz Carlos Alves.

1. *Ximenia*. 2. *Leishmania infantum*. 3. Fatores imunológicos. 4. Citotoxicidade. 5. Hepatócitos. 6. Antiprotzoários. 6. Preparações farmacêuticas. 7. Descobertas de drogas. I. Santos, Fábio André Brayner dos. II. Alves, Luiz Carlos. III. Título.

JANDERSON WEYDSON LOPES MENEZES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADOR DA
Ximения americana L. (Ollacaceae) SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 2/3/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.^o. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Orientador)

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a. Dr.^a. Sheilla Andrade de Oliveira (Titular interno)

Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Sant'Anna da Silva (Titular externo)

Departamento de Bioquímica/Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, a mim, a minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que apesar de todas as provações, conquistas e perdas, ele me deu forças para tornar possível a finalização de mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, agradeço por toda a luta, esforço, investimento, confiança e o mais profundo amor que dedicam a mim durante toda a minha vida. Sem vocês nada disso seria possível e espero que saibam que os amo do fundo do meu coração e lhes serei eternamente grato. A minha irmã e sobrinhos agradeço por ter vocês na minha vida e deixo aqui registrado que saibam o quanto que os amo.

Aos meus queridos orientadores, Dr. Fábio André Brayner e ao Dr. Luiz Carlos Alves pela confiança depositada durante esta jornada, assim também pela oportunidade, assistência, tempo e apoio que dedicaram na realização deste trabalho e em minha formação, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos alunos, pesquisadores e colaboradores do Departamento de Parasitologia e Imunologia, em especial aos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Mutagênese/Leishmaniose e ao Laboratório de Imunoparasitologia que me acolheram durante a realização de grande parte dos experimentos, muito obrigado.

Aos amigos que fiz durante a minha passagem pelo mestrado, obrigada por todos conselhos, atenção, companheirismo e amizade, em especial a Igor Gouveia, Thaynan Sama, Catarina Cataldi, Thais Melquiades, Júlia Assis, Stephanny Sousa, Filipe Zimmer, Rivaldete Soares, Ada Lúcia, Gustavo Barbosa, Cleonilde Nascimento, Alex Melo, Jessica de Paula, Kamila Sales, Kamila Kássia, Leyllane Moreira, Rafaela Lira, Thiago Soares, Flávia Machulis, Mariana Alves, Victor Vaitekvcios, Allana Gouveia, Lucas Isaque, Jorge Belém, Walter Ebbbers, Victor Petricio, Paula Silva, Ana Paula Sampaio, Jana Sandes, Gabriel Gazzoni, Wêndeo Costa, Daivyane Rocha e a todos do LBCM, LIMP. Muito obrigado por sempre me apoiarem e me socorrerem, muito obrigado.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de pós-graduação. A todos do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE que sempre foram solícitos e dispostos a ajudar.

SILVA, Janderson Weydson Lopes Menezes da. **Avaliação do potencial leishmanicida e imunomodulador da *Ximenia americana* L. (Olacaceae) sobre células mononucleares de sangue periférico humano.** 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

No Brasil a leishmaniose visceral trata-se de uma doença negligenciada causada pela *Leishmania infantum*. Para o tratamento da leishmaniose visceral o medicamento mais recomendado são os antimoniais pentavalentes, porém devido aos efeitos colaterais e alta citotoxicidade outras opções também estão sendo considerados na clínica, por isso necessidade de fármacos de origem vegetal é primordial, levando em consideração a sua aplicação na medicina tradicional, como é o exemplo da *Ximenia americana*. O objetivo deste estudo foi utilizar o extrato aquoso da casca de *Ximenia americana*. para verificar a ação leishmanicida e imunomoduladora. Para tanto, o extrato aquoso da casca de *X. americana* L. foi avaliado através da Cromatografia de Camada Delgada (CCD), atividade antioxidante, capacidade leishmanicida em formas promastigotas de *L. infantum*, capacidade imunomoduladora e citotóxica. Além disso, foi realizada uma análise ultraestrutural das formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com *X. americana* através da microscopia eletrônica de transmissão e varredura. O perfil fitoquímico realizado mostrou-se positivo para taninos hidrolisáveis e condensados, xantinas, compostos fenólicos, ligninas e terpenos. A avaliação da atividade biológica em formas promastigotas de *L. infantum* apresentou IC₅₀ de 223.2 µg/mL e CC₅₀ em células hepáticas 305.50 µg/mL apresentando Índice de Seletividade igual a 1.37. As células mononucleares de sangue periférico influenciaram no aumento da produção de óxido nítrico, assim como na produção de citocinas da resposta pro-inflamatória. A análise ultraestrutural mostrou danos que podem ser compatíveis com morte celular programada. Os resultados apresentados, confirmaram que o extrato aquoso da casca da *X. americana* exibiu uma atividade leishmanicida, imunomoduladora em células mononucleares de sangue periférico e com o perfil fitoquímico foi possível identificar as diferentes classes de metabólitos que podem justificar a sua atividade leishmanicida.

Palavras-chave: *Ximenia*. *Leishmania infantum*. Fatores imunológicos. Citotoxicidade. Hepatócitos.

SILVA, Janderson Weydson Lopes Menezes da. **Evaluation of the leishmanicidal and immunomodulatory potential of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) on human peripheral blood mononuclear cells.** 2020. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

ABSTRACT

In Brazil, visceral leishmaniasis is a neglected disease caused by *Leishmania infantum*. For the treatment of visceral leishmaniasis, the most recommended medication is pentavalent antimonials, however, due to side effects and high cytotoxicity, other options are also being considered in the clinic, so the need for drugs of plant origin is necessary, taking into account their application in traditional medicine, as is the example of *Ximenia americana*. The purpose of this study was to use the aqueous extract of the bark of *Ximenia americana*. to verify the leishmanicidal and immunomodulatory action. For this purpose, the aqueous extract of the bark of *X. americana* L. was evaluated using Thin Layer Chromatography (CCD), antioxidant activity, leishmanicidal capacity in promastigote forms of *L. infantum*, immunomodulatory and cytotoxic capacity. In addition, an ultrastructural analysis of the promastigote forms of *L. infantum* treated with *X. americana* was performed using transmission and scanning electron microscopy. The phytochemical profile performed was positive for hydrolyzable and condensed tannins, xanthines, phenolic compounds, lignins and terpenes. The evaluation of biological activity in promastigote forms of *L. infantum* showed an IC₅₀ of 223.2 µg/mL and CC₅₀ in liver cells 305.50 µg/mL with a Selectivity Index of 1.37. Peripheral blood mononuclear cells influenced the increase in the production of nitric oxide, as well as the production of cytokines in the proinflammatory response. The ultrastructural analysis showed damage that may be compatible with programmed cell death. The results presented, confirmed that the aqueous extract of the bark of *X. americana* exhibited a leishmanicidal, immunomodulatory activity in peripheral blood mononuclear cells, and with the phytochemical profile it was possible to identify the different classes of metabolites that may justify its leishmanicidal activity.

Keywords: *Ximenia*. *Leishmania infantum*. Immunological factors. Cytotoxicity. Hepatocytes.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 – | Mapa mostrando o status de endemicidade da leishmaniose visceral, em todo o mundo em 2016 | 08 |
| Figura 2 – | Micrografias de leishmanias, formas amastigotas | 10 |
| Figura 3 – | Micrografia representando o ciclo de vida da <i>Leishmania spp</i> | 11 |
| Figura 4 – | Micrografia representando as citocinas que regulam o tipo de resposta imune à infecção por <i>Leishmania spp</i> | 12 |
| Figura 5 – | Micrografia representando os fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários em plantas | 14 |
| Figura 6 – | Eletromicrografias de promastigotas de <i>L. infantum</i> não tratada e tratadas com o extrato aquoso da casca de <i>Ximenia americana</i> e Anfotericina B | 29 |
| Figura 7 – | Eletromicrografias de promastigotas de <i>L. infantum</i> não tratada e tratadas com e Anfotericina B e extrato aquoso da casca de <i>Ximenia americana</i> | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| CCD | Cromatografia de Camada Delgada |
| CD4+ | Cluster Differentiation 4 |
| CD8+ | Cluster Differentiation 8 |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil |
| ELISA | Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, Enzyme-linked Immunosorbent Assay) |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>) |
| IFN- γ | Interferon Gama |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-5 | Interleucina 5 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-13 | Interleucina 13 |
| IL-17a | Interleucina 17 |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| NO | Óxido Nítrico (do inglês, <i>Nitric Oxide</i>) |

| | |
|---------------|---|
| PBMC | Células Mononucleares de Sangue Periférico (do inglês, Peripheral Blood Mononuclear Cell) |
| PBS | Salina tamponada com Fosfato (do inglês, Phosphate Buffered Saline) |
| RPMI | Meio de cultivo Roswell Park Memorial Institute |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 6 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 8 |
| 2.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da Leishmaniose Visceral | 8 |
| 2.2 Ciclo biológico do parasita, imunologia e tratamento da Leishmaniose visceral ... | 10 |
| 2.3 Plantas medicinais..... | 13 |
| 2.4 Família Olacaceae | 15 |
| 2.4.1 <i>Ximenia americana L</i> | 15 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 17 |
| 4 PERGUNTA CONDUTORA..... | 18 |
| 6 OBJETIVO GERAL | 20 |
| 6.1 Objetivos específicos | 20 |
| 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS..... | 21 |
| 7.1 Aspectos éticos..... | 21 |
| 7.2 Coleta e processamento do material vegetal e medicamento usado como controle | 21 |
| 7.3 Obtenção do extrato aquoso da casca de <i>Ximenia americana</i>..... | 22 |
| 7.4 Cromatografia de camada delgada analítica..... | 22 |
| 7.5 Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) | 22 |
| 7.6 Atividade biológica em promastigotas de <i>L. Infantum</i> | 23 |
| 7.7 Análise da citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico e em células hepáticas | 23 |
| 7.8 Coleta sanguínea e isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) | 23 |
| 7.9 Análise Ultraestrutural de <i>L. Infantum</i> | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 7.10 Cultivo de PBMC e adição de tratamento com extratos aquoso da casca de <i>Ximenia americana</i> para dosagem de citocinas da resposta imune celular Th1, Th2 e Th17..... | 24 |
| 7.11 Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO)..... | 25 |
| 7.12 Análises estatísticas..... | 25 |
| 8. RESULTADOS | 26 |
| 8.1 Atividade antioxidante do extrato aquoso da casca de <i>X. Americana</i> | 26 |
| 8.2 Triagem Fitoquímica do extrato aquoso da casca de <i>X. Americana</i> | 26 |
| 8.3 Avaliação do extrato aquoso da casca de <i>Ximenia americana</i> L. sobre promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> , células mononucleares de sangue periférico e células hepáticas | 27 |
| 8.4 Análise ultraestrutural de promastigotas de <i>L. Infantum</i> | 28 |
| 8.5 Dosagem de citocinas da resposta imune celular Th1, Th2 e Th17..... | 32 |
| 9 DISCUSSÃO | 33 |
| 10 CONCLUSÃO..... | 38 |
| REFERÊNCIAS..... | 39 |
| ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA..... | 47 |
| ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 48 |

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada e considerada um grande problema de saúde pública, essa patologia é causada por duas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*: *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*. Sua transmissão ocorre através da picada do inseto infectado, conhecido como flebotomíneo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). A *Leishmania infantum* é uma das principais causadoras da leishmaniose visceral em mamíferos (AOUN; BOURATBINE, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017) cerca de 1 milhão de novos casos surgem anualmente, com mortalidade de até 30 mil óbitos por ano. Foram reportados diversos casos ao redor do mundo, e essa doença tem uma prevalência significativa em países subdesenvolvidos por afetar indivíduos em condição de pobreza que por conta disso acabam aumentando a sua susceptibilidade a contrair a doença, além de condições precárias de moradia e esses indivíduos serem imunodeprimidos (DEBROY *et al.*, 2017).

Os indivíduos acometidos pela leishmaniose são tratados com os quimioterápicos da classe dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B, mas devido ao alto custo, longos períodos de administração, efeitos colaterais indesejados como náusea, vômitos e diarreia, aparecimento de cepas apresentando mecanismo de resistência ao tratamento e pela grande toxicidade desses fármacos, por conta disso novos fármacos provenientes de fontes naturais e sintéticas estão sendo estudados para que possa ser sugerida uma nova abordagem terapêutica para o tratamento das leishmanioses (REZVAN *et al.*, 2015).

A resposta imunológica do hospedeiro vertebrado frente a infecção por *Leishmania spp.* envolve a formação da resposta Th1 e Th2 do qual pode levar ao processo inflamatório. O processo inflamatório tem várias finalidades, dentre elas estão as seguintes: dominar, minimizar, enclausurar, neutralizar, destruir e eliminar o agente agressor (VOLLMER *et al.*, 2012). O perfil da resposta imune Th1 caracteriza o mecanismo de resistência a infecção por *Leishmania* que está associada a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-12 que são produzidas por macrófagos após o reconhecimento do patógeno facilitando sua adesão ao endotélio, enquanto que a resposta Th2 tem sido associada a suscetibilidade a infecção parasitária e caracterizado pela expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13 que acaba suprimindo a produção de óxido nítrico (RODRIGUES *et al.*, 2015).

A *Ximenia americana* L. faz parte da família Olacaceae e encontra-se bem distribuída na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (BRASILEIRO *et al.*, 2008). Apesar de ser utilizada como um anti-inflamatório na medicina popular, a *Ximenia americana* é uma espécie amplamente estudada cientificamente. As plantas assim como as do gênero *Ximenia* possuem a capacidade metabólica de produzir diversos compostos químicos, estes compostos são divididos em dois grupos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários diferentes dos secundários são essenciais para a planta porque são responsáveis pela função plástica, estrutural e energética da planta. Os metabólitos secundários, não são essenciais, porém essas biomoléculas apresentam propriedades que corroboram para a chance de sobrevivência contra os ataques de predadores. Esses metabólitos secundários podem ser benéficos, pois muitos já foram utilizados na medicina popular para tratar algumas doenças que acometem seres humanos (REZENDE *et al.*, 2016).

A *Ximenia americana* também é aplicada nos tratamentos de doenças, na medicina tradicional, sendo utilizada para cura de feridas. Seus frutos são utilizados como laxantes e suas raízes são utilizadas para tratar inflamações, por conta disso ela vêm sendo utilizada por comunidades indígenas e quilombolas do Nordeste brasileiro. Apresentando ações biológicas como: ação anticonvulsivante (QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2002), atividade antineoplásica (VOSS *et al.*, 2006), atividade anti-moluscicida (UCHOA *et al.*, 2006), atividade pesticida (FATOPE; ADOUM; TAKEDA, 2000) e tripanocida (MAIKAI, 2008). Desta forma o presente estudo visa avaliar a atividade leishmanicida e imunomodulatória da *X. americana* frente a células mononucleares de sangue periférico desafiadas por *Leishmania infantum*.

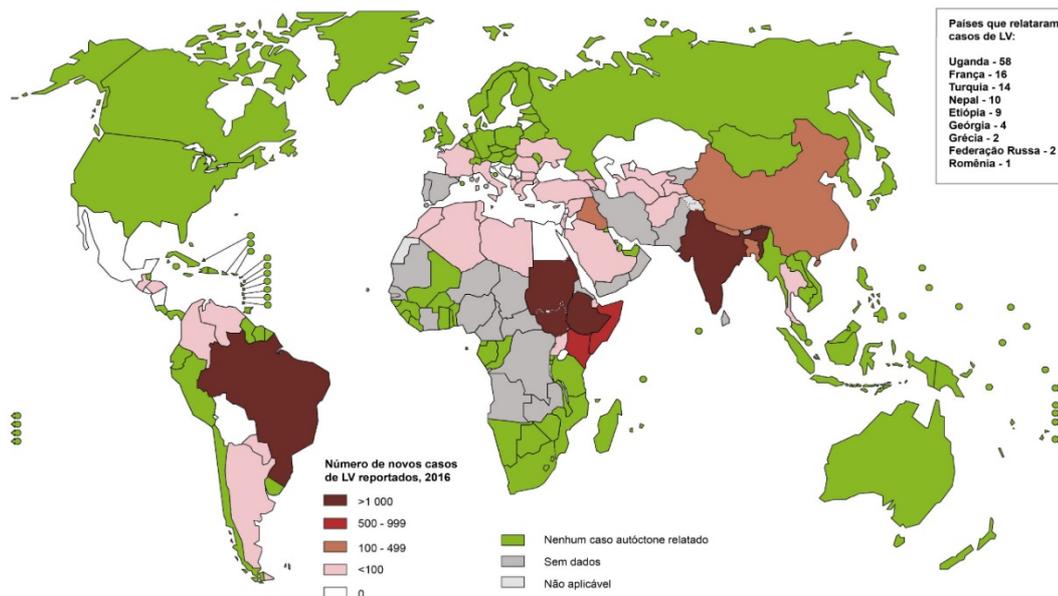
2 REFERENCIAL TEÓRICO

Este tópico apresenta o levantamento teórico sobre os temas abordados no decorrer do trabalho: Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da Leishmaniose Visceral, ciclo biológico do parasita, imunologia e tratamento da Leishmaniose visceral, plantas medicinais e família Olacaceae.

2.1 Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada por duas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*: *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*. Esses protozoários são responsáveis pelo aumento no número de casos de leishmaniose ao redor do mundo, no período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017, 2019). De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (2017), cerca de 20.792 dos 22.145 (94%) novos casos ocorreram em países subdesenvolvidos: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

Figura 1 - Mapa mostrando o status de endemicidade da leishmaniose visceral, em todo o mundo em 2016.



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde (2018)

Dentre os casos de Leishmaniose Visceral reportados mundialmente na América Latina cerca 90% ocorrem no Brasil em razão da ineficiência na prevenção e no controle do ciclo biológico, o que leva a doença a se distribuir facilmente pelo país, aumentando o número de casos (MENDES *et al.*, 2016). Dentre os fatores que justificam esses índices estão os fatores socioambientais, demográficos, presença de animais como reservatórios domésticos e adaptação do vetor a centros urbanos (MENDES *et al.*, 2016; URSINE *et al.*, 2016).

Os sinais clínicos apresentados pelos hospedeiros junto com os testes parasitológicos e sorológicos contribuem para compreensão do diagnóstico. Dentre os fatores de risco que corroboram para a doença estão: medicamentos imunossupressores, desnutrição e co-infecção por HIV (GUERIN *et al.*, 2002). Porém, suas manifestações clínicas irão depender diretamente das interações entre as características da virulência e a resposta imune do hospedeiro, e na maioria dos casos a infecção é assintomática, ou indivíduo infectado pode apresentar sintomas moderados, tais como: tosse seca, diarreia, adinamia, febrícula, sudorese (QUEIROZ, 2004). O quadro clínico mais grave consiste na hepatoesplenomegalia, febre, esplenomegalia volumosa, perda de peso severa, dor e distensão abdominal, em alguns casos a icterícia podem ocorrer, assim como envolvimento renal. Na fase mais tardia da doença o hospedeiro pode desenvolver ascite e edema (CASTRO *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2017).

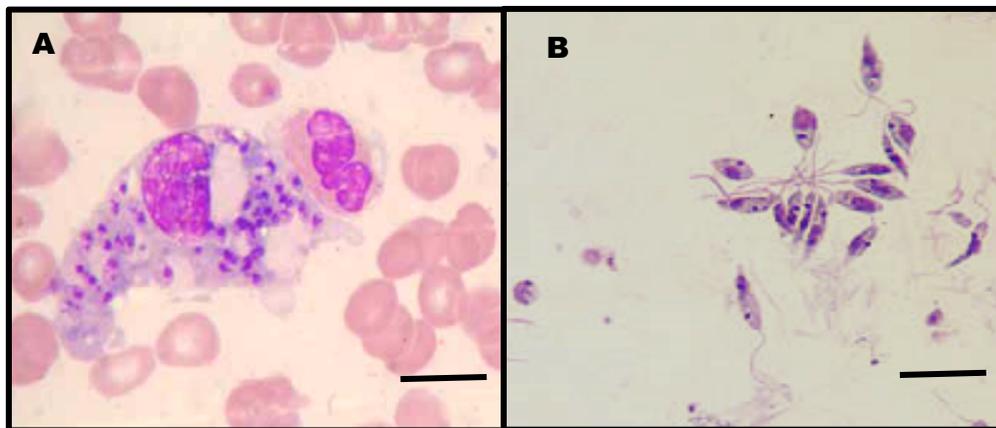
O método padrão ouro para o diagnóstico da leishmaniose visceral é através da identificação de parasitas em macrófagos de linfonodos e medula óssea, e outras amostras de tecido como baço e fígado coletados através de biópsia. A presença de um profissional especializado e qualificado para realizar o procedimento de coleta e identificação das amostras provenientes das biópsias são de extrema importância, tendo em vista que o procedimento de coleta é considerado invasivo, doloroso e desagradáveis para o paciente (GUERIN *et al.*, 2002).

O aparecimento dos testes sorológicos como fixação do complemento, imunofluorescência indireta, teste de aglutinação direta, ELISA, DOt-ELISA, e das técnicas de biologia molecular como a reação da cadeia da polimerase (PCR) trouxeram perspectivas com diagnósticos mais rápidos, porém alguns problemas como especificidade, sensibilidade, disponibilidade e custo fazem com que esses testes não sejam aplicados com frequência na clínica. Quando não existe uma possibilidade de diagnóstico laboratorial eficiente, o tratamento é iniciado de acordo com os achados baseados no diagnóstico clínico e epidemiológico (QUEIROZ, *et al.*, 2004; SOUSA, *et al.*, 2018).

2.2 Ciclo biológico do parasita, imunologia e tratamento da Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral pode ser transmitida apenas pelo vetor fêmea dos flebotomíneos infectados com um dos protozoários do complexo *Leishmania donovani* que possui duas espécies: *L. donovani* e *L. infantum* (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, 2018). Durante o seu ciclo de vida, a *Leishmania* pode ser encontrada em duas principais formas: Amastigotas (Figura 2A) e Promastigotas (Figura 2B) (SILVA, 2017).

Figura 2 - Micrografias de leishmanias.



Fonte: Silva (2017)

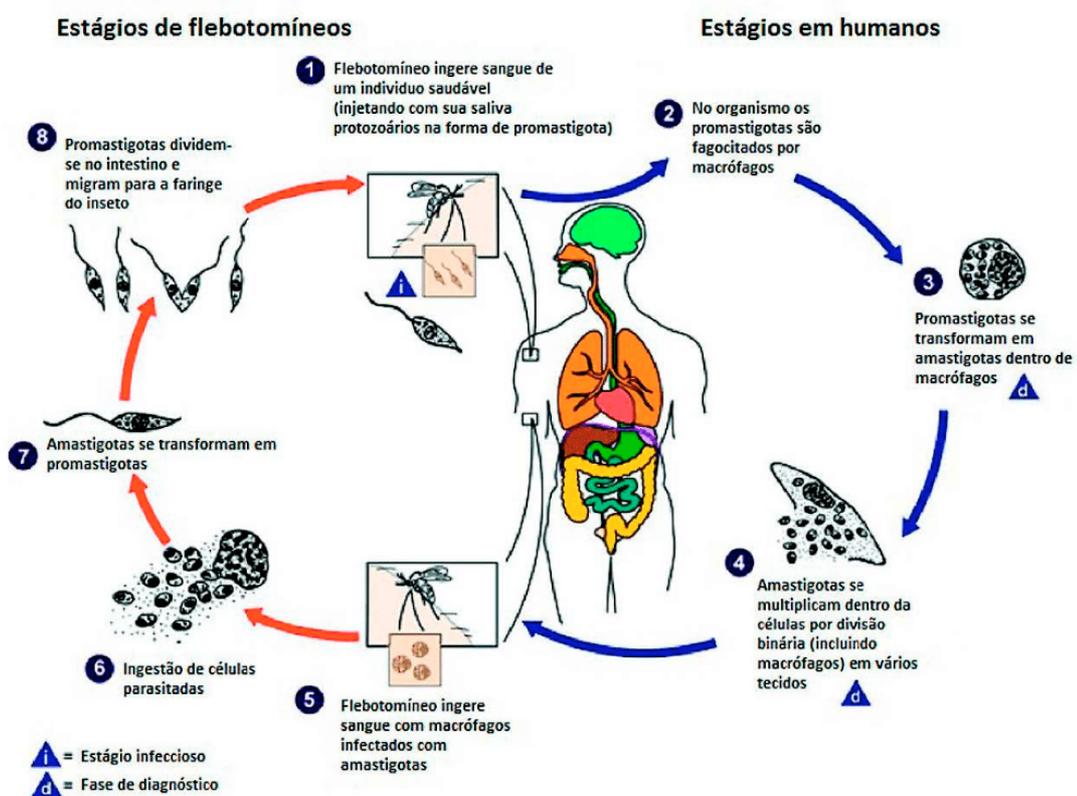
Legenda: Durante o seu ciclo de vida, a *Leishmania* pode ser encontrada em duas principais formas: Amastigotas (Figura 2A) e Promastigotas (Figura 2B).

O ciclo da *Leishmania* spp. (Figura 3) inicia-se quando o vetor ao realizar o repasto sanguíneo é infectado pela ingestão das formas amastigotas do parasito que ficam no interior dos macrófagos do hospedeiro infectado. Após esse repasto sanguíneo, os macrófagos começam a se romper no trato digestivo anterior do flebotomíneo com isso liberando as formas amastigotas. Essas formas amastigotas começam a se diferenciar em formas promastigotas reproduzindo-se por divisão binária, o ciclo dentro do inseto se completa em torno de 72 horas após o flebotomíneo realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro suscetível. As promastigotas são inoculadas através da saliva onde, contém moléculas que apresentam propriedades anti-inflamatórias e vasodilatadoras (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Após infectar o indivíduo suscetível, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário como os macrófagos e dentro deles se diferenciam

em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária até que os mesmos são rompidos ocorrendo a liberação destas formas que são fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo colaborando para a sua disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, disseminando o parasita no hospedeiro vertebrado (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2018).

Figura 3 – Micrografia representando o ciclo de vida da *Leishmania* spp.



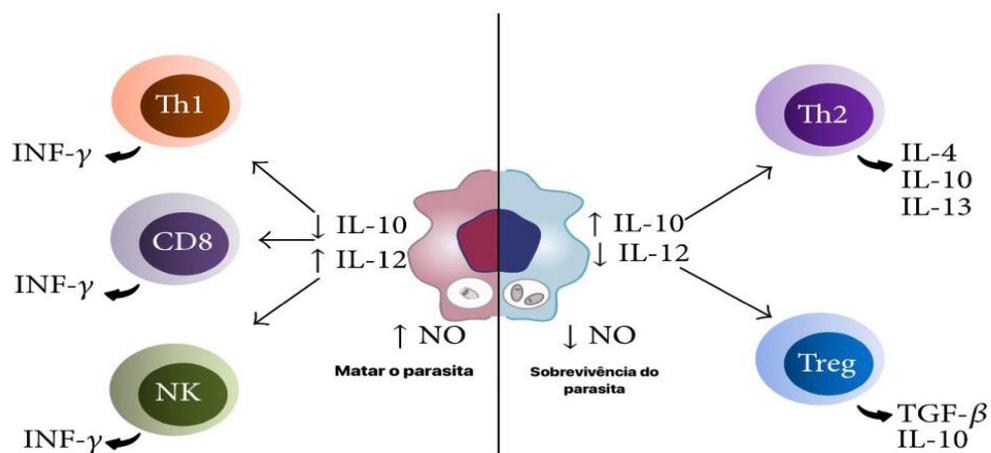
Fonte: Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2018)

A eficiência da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro irá determinar como a forma clínica irá se apresentar no hospedeiro. A resposta imune desempenha um papel central garantindo a resistência do hospedeiro no controle do crescimento do parasita durante os estágios iniciais da infecção.

O perfil da resposta imune Th1 caracteriza o mecanismo de resistência a infecção por *Leishmania* que está associada a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (Interferon-gama), TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) e IL-12 (Interleucina-12) que são

produzidas por macrófagos após o reconhecimento do patógeno facilitando sua adesão ao endotélio, enquanto que a resposta Th2 tem sido associada a suscetibilidade a infecção parasitária e caracterizado pela expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Interleucina-10) e IL-4 (Interleucina-4) (RODRIGUES *et al.*, 2015). As citocinas IL-12 e IL-4 definem o perfil de polarização das células T CD4+ e modulam a resposta de outras células induzindo ao perfil Th1. A IL-12 ativa células NK e T CD8+ que leva a produção de IFN- γ que induz a produção de óxido nítrico em macrófagos. Em contraparte, a IL-4 induz a diferenciação de células T CD4+ a um perfil Th2 que produz IL-4, IL-10 e IL-13 que acaba suprimindo a produção de óxido nítrico e levando a um aumento na produção de eosinófilos, com a diminuição da IL-12 ocorre um aumento na regulação das células T-regulatórias (Tregs) que é responsável pela diminuição do desenvolvimento da doença (Fig. 4) (RODRIGUES *et al.*, 2015; SUN 2011). Uma opção para que se possa avaliar como se comporta a resposta imune é através de experimentos de desafio *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) ou clones de células T com antígenos de *Leishmania*, para observar as citocinas associadas a cada perfil (MICHEL *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Figura 4 – Micrografia representando as citocinas que regulam o tipo de resposta imune à infecção por *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2015).

Para o tratamento da leishmaniose visceral o medicamento mais recomendado são os antimoniais pentavalentes como: Glucantime (Sanofi-Aventis), Pentostan (GlaxoSmithKline). A escolha do medicamento deve levar diversos pontos em consideração como administração, custo, biodisponibilidade e toxicidade para que o paciente não abandone o tratamento

(ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). Os medicamentos são administrados de maneira injetável por via intravenosa ou intramuscular, porém devido aos efeitos colaterais, alta citotoxicidade e desconforto na administração outras opções também estão sendo considerados na clínica (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). A anfotericina B passou a ser considerada um medicamento alternativo devido a resistência do parasita aos antimoniais, mesmo sendo altamente tóxico, como uma alternativa de mudar essa realidade, formulações lipídicas de anfotericina B foram criadas e aprovadas para tratamento devido a sua alta eficácia, porém o seu custo inviabiliza essa opção para a população mais pobre (ROBERTS *et al.* 2003). Por conta dos desafios encontrados no tratamento da doença a necessidade na busca de novos fármacos provenientes de fontes naturais e sintéticas estão sendo estudados para que possa ser sugerida uma nova abordagem terapêutica para o tratamento das leishmanioses (ALIANÇA *et al.*, 2017; REZVAN *et al.*, 2015).

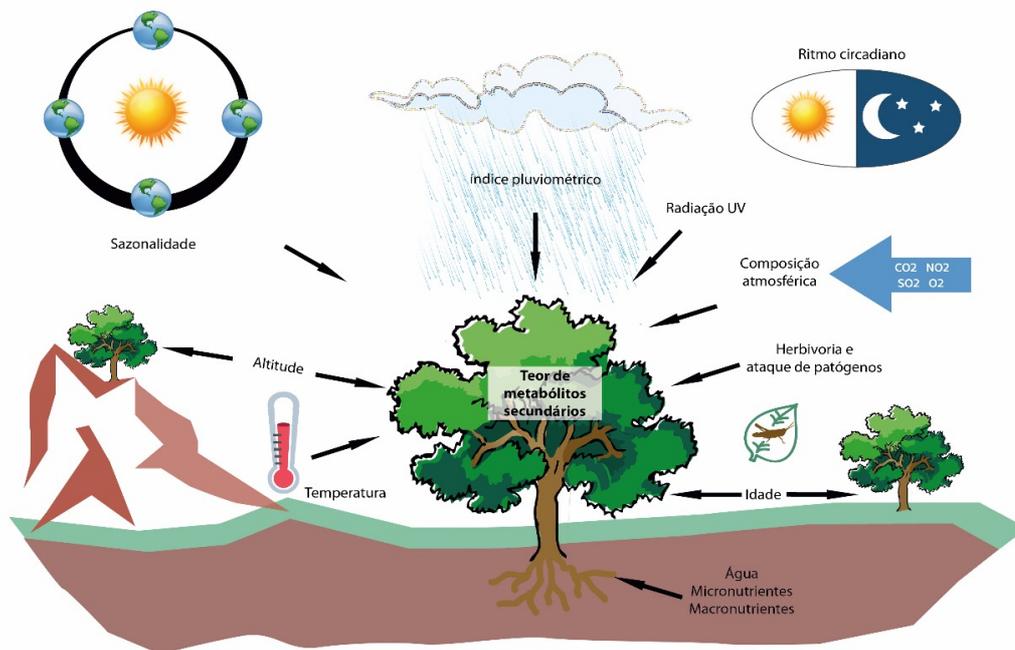
2.3 Plantas medicinais

As plantas medicinais são conhecidas por conterem substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou por serem precursoras para sínteses de novos fármacos (SOFOWORA *et al.*, 2013). Os estudos para verificar a eficácia de plantas medicinais também são motivados através de questionários etnobotânicos incentivados pelo “Saber Local” para que posteriormente possa ser pesquisado e verificado sua eficácia. No entanto, pesquisas tem mostrado que o uso das plantas medicinais ou seus constituintes na prevenção de diversas doenças como infecções bacterianas, doenças parasitárias e inflamações (AGYARE *et al.*, 2018; HOSSEINZADEH *et al.*, 2015; MENEZES, *et al.*, 2019).

As plantas possuem metabólitos que são produtos de compostos intermediários de reações enzimáticas do seu metabolismo. Normalmente o vegetal possui metabólitos primários que estão diretamente envolvidos com sua função estrutural, plástica e do seu armazenamento de energia, esses metabólitos podem ser carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos e clorofila (SANTOS *et al.*, 2016). Derivados desses metabólitos primários, as plantas também possuem os secundários que estão presentes em menores quantidades e aparentemente não apresentam função estrutural ou de desenvolvimento da planta (KUMAR *et al.*, 2015). Esses metabólitos são normalmente produzidos sob efeito de estresse vegetal, porém existem situações bióticas e abióticas na qual a quantidade dos metabólitos secundários pode ser alterada (figura 5) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). As plantas sintetizam uma quantidade diversificada

de metabólitos secundários, responsáveis pela defesa do vegetal contra uma grande variedade de microrganismos, como bactérias, fungos e vírus, garantindo sua sobrevivência diante de tais dificuldades (DIXON, 2001; REZENDE *et al.*, 2016).

Figura 5 – Micrografia representando os fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.



Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto e Lopes (2007).

As diretrizes do Ministério da Saúde enfatizam como prioridade na investigação das plantas medicinais, assim como sua implementação a fitoterapia como uma prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem e incluam as plantas medicinais no Sistema Único de Saúde. Essa inclusão é essencial para que os profissionais da área da saúde possam compreender e conhecer a respeito das atividades farmacológicas, assim como a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, levando em consideração os costumes, tradições, condição socioeconômica da população local (LEAL; TELLIS, 2016). Essas possibilidades alternativas de tratamento levam a uma melhora no atendimento da população pelo Sistema Único de Saúde, em razão de proporcionar outra forma de tratamento e de prevenção de doenças (BRUNING *et al.*, 2012).

O mercado dos fitoterápicos tem crescimento estimado de 10 a 20% ao ano, fatores como: a valorização de uma vida com hábitos saudáveis; consumo de produtos naturais; os

efeitos negativos dos medicamentos sintéticos; descoberta de novos princípios ativos presentes nas plantas além de sua comprovação científica e preço acessível a população de baixa renda, tem impulsionado um maior uso e procura de fitoterápicos. (SOUSA *et al.*, 2018). Existe uma enorme preocupação com relação ao conhecimento tradicional a respeito da utilização desses fitoterápicos, porque se extintos, não mais se encontrarão disponíveis às futuras gerações. Por conta disso, existe uma maior atenção de pesquisadores de distintas áreas a respeito do “Saber Local” proveniente da etnobotânica (SILVA *et al.*, 2015).

2.4 Família Olacaceae

De acordo com o The Plant List (2017) a família Olacaceae possui uma distribuição pantropical que abrange cerca de 27 gêneros com cerca de 149 espécies no total. Dentre as características dessa família encontram-se plantas lenhosas, árvores e arbustos. No Brasil são encontrados cerca de 13 gêneros com cerca de 53 espécies, dentre as mais numerosas encontram-se as espécies do gênero *Dulacia* com 10, *Heisteria* com 21 (XIMENIA, 2020).

Ainda segundo os dados fornecido pela Ximania (2020), no Brasil os gêneros e espécies da família Olacaceae são bem distribuídas pelo país inteiro, entretanto a sua maior ocorrência é na Região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) e na Região Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe). Dentre os gêneros apresentados na família Olacaceae, o gênero *Ximania*, especificamente a espécie *Ximania americana* é a que apresenta uma ampla distribuição em diversos ecossistemas florestais por apresentar diversas atividades biológicas descritas na literatura.

2.4.1 *Ximania americana* L

A *Ximania americana* pode ser caracterizada como um arbusto de 3-4 metros de altura ou uma árvore pequena espinhosa, da casca fina de cor avermelhada ou cinza, lisa ou pouco rugosa. Possui folhas pequenas, simples, inteiras, alternas, pecioladas, oblongas, glabras e flores branco-amarelas aromáticas, com as pétalas recurvadas, dispostas em racemos curtos, axilares ou terminas (FEYSSA *et al.*, 2012). As sinonímias dos nomes vulgares mais utilizadas são: ameixa-do-mato, ababuí, ameixeira-do-brasil, ambuí, ameixa-da-bahia, ameixa-da-terra,

ameixa-de-espinho, ameixa-do-pará, limão-bravo-do-brejo, sândalo do Brasil, umbú ou simplesmente ximenia (PLANTMED, 2017).

A planta já é utilizada para tratar diversos tipos de doenças como hepatite e malária sob a forma de chá, e sua casca e folha são utilizadas para fins de tratamento de: inflamações da boca e da garganta; adstringentes; hemorroidas; menstruação excessiva e prolongada; cicatrização de ferimentos e úlceras, e no tratamento dos efeitos de picadas de cobras. (FEYSSA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2014).

O óleo essencial e fixo extraído das sementes é amplamente utilizado para formulação de novos cosméticos, e como antisséptico sobre cortes, existem relatos da utilização de maneira contraceptiva, no tratamento de hepatites, dores renais e abdominais. (FEYSSA *et al.*, 2012). Segundo Antwi *et al.* (2017) a respeito das plantas medicinais de Gana, incluindo a *X. americana* apresenta-se como alternativa para o tratamento de doenças causadas por bactérias. Existem relatos do uso da planta com função hepatoprotetora e hipoglicêmica (SOBEH *et al.*, 2017).

De acordo com Silva (2015) que através de testes *in vitro* verificou a capacidade do extrato de *X. americana* modular a resistência microbiana de cepas resistentes de *S. aureus* à eritromicina, o que reitera um importante papel na associação com antibióticos sintéticos na terapêutica. O avanço tecnológico tem permitido a investigação das atividades biológicas provenientes da *X. americana*, no qual tem trazido diversos benefícios para população que já faz o uso dessa planta, além de validar o saber popular (SOBEH, 2017) e também existem estudos científicos publicados a respeito de suas atividades biológicas utilizando a *X. americana* como: ação anticonvulsivante (QUINTANS-JUNIOR *et al.*, 2002), atividade antineoplásica (VOSS *et al.*, 2006), atividade moluscicida (UCHOA *et al.*, 2006), atividade pesticida (FATOPE; ADOUM; TAKEDA, 2000) e tripanocida (MAIKAI, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral é considerada um grave problema de saúde pública no mundo. Estima-se a ocorrência de 30 mil óbitos por ano e o tratamento com antimonial pentavalentes apresentam algumas desvantagens como: cuidados em sua administração, efeitos colaterais como desconforto gastrointestinal, mal-estar e o surgimento de cepas apresentando mecanismo de resistências à esses medicamentos, tendo em vista esse cenário, faz-se necessário a busca de novos fármacos que apresentem mais eficácia e provoquem menos efeitos colaterais.

Uma das possíveis alternativas na busca de ferramentas para o enfrentamento do cenário atual, é estudo de novos fitoterápicos, que possuem um grande potencial clínico-terapêutico. Segundo dados não publicados de questionários etnobotânicos que foram aplicados em comunidades residentes do semiárido nordestino como Lagoa Grande, Buíque, Santa Maria da Boa Vista, a população faz o uso tradicional da casca de *X. americana* para tratamento de inflamações e também como cicatrizante.

Relatos na literatura científica, apresentam dados relevantes a respeito da atividade anti-inflamatória *in vivo*, toxicidade aguda em modelo animal e atividade tripanocida *in vitro* do extrato dessa planta, o que revela um potencial campo de estudo para o entendimento da natureza dos componentes nesses extratos, bem como seu uso, em virtude disso faz-se necessário uma avaliação *in vitro* da sua atividade leishmanicida e imunomodulador em células mononucleares de sangue periférico humanas.

4 PERGUNTA CONDUTORA

O extrato aquoso da casca da *Ximenia americana* L. apresenta potencial leishmanicida e imunomodulador em células mononucleares de sangue periférico obtidos de seres humanos?

5 HIPÓTESE

A *Ximenia americana* L. apresenta potencial leishmanicida e imunomodulador em células mononucleares de sangue periférico obtidos de seres humanos.

6 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* e avaliar o seu potencial leishmanicida e imunomodulador frente a células de mamíferos.

6.1 Objetivos específicos

- a) Preparar e caracterizar o extrato aquoso da casca de *X. americana*;
- b) Avaliar a atividade antioxidante do extrato;
- c) Avaliar a citotoxicidade do extrato sobre células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas e células hepáticas humanas;
- d) Avaliar o efeito leishmanicida do extrato sobre as formas promastigotas de *L. infantum*;
- e) Determinar a concentração inibitória e o índice de seletividade do extrato sobre promastigotas de *L. infantum*;
- f) Analisar a ultraestrutura das formas promastigotas de *L. infantum* tratadas com o extrato.
- g) Quantificar a produção de IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 e IL-17a e Óxido Nítrico em sobrenadante de PBMCs humanos tratadas com o extrato.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente tópico descreve todos os métodos utilizados no decorrer do trabalho. Neste espaço é descrito os aspectos éticos, coleta e processamento do material vegetal e medicamento usado como controle, obtenção do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* L., atividade antioxidante utilizando o DPPH, cromatografia de camada delgada analítica, atividade Biológica em Promastigotas de *L. infantum*, coleta sanguínea, isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), análise da citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico e em células hepáticas, análise ultraestrutural de *L. infantum*, cultivo de PBMC e adição de tratamento com extratos aquoso da casca de *Ximenia americana*, Dosagem de citocinas da resposta imune celular Th1, Th2 e Th17, dosagem de óxido nítrico e análise estatística.

7.1 Aspectos éticos

Os seis indivíduos incluídos na pesquisa tiveram participação voluntária onde assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos foram oriundos de área não endêmica para leishmaniose, aparentemente saudáveis e não reagente para leishmaniose através do teste de Imunofluorescência Indireta. Um hemograma foi realizado afim de avaliar sua saúde de maneira geral e identificar possíveis alterações celulares indicativos de anemia, infecções e leucemia. O presente projeto foi aprovado no Comitê Ética e Pesquisas em Humanos do IAM/FIOCRUZ com CAAE: 59093316.0.000.5190.

7.2 Coleta e processamento do material vegetal e medicamento usado como controle

O material vegetal da casca de *X. americana* foi coletado no Parque Nacional do Catimbau (SISBIO 26743-1), no mês de março de 2017. Os espécimes foram identificados pelo Dr. Alexandre Gomes da Silva (Departamento de Antibióticos/UFPE) e depositadas no Herbário do Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA-PE) sob o número de identificação 91787. Para efeito de comparação da ação do extrato foi utilizado como controle em todas os testes a Anfotericina B por ser preconizada pela OMS em um grupo de indivíduos acometidos pela leishmaniose com outras comorbidades.

7.3 Obtenção do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana*.

Para obtenção do extrato aquoso, a casca foi armazenada na câmara fria, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e colocada em estufa a 40 °C até secar completamente. Em seguida, o material foi levado para o Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE) e processado em um moinho industrial. Posteriormente, foi pesado 10 g do pó obtido que foi colocado num balão de fundo redondo com 100 mL de água destilada previamente aquecida em banho-maria a 100 °C. Após 30 minutos o balão foi retirado do banho-maria para resfriamento com água corrente. Em seguida, o extrato foi filtrado em um kitassato sob vácuo acoplado a um funil de buchner com algodão. O filtrado foi colocado numa placa de Petri e levado ao freezer (-80 °C ou -20 °C) até que congelasse completamente. O extrato foi liofilizado por 48 horas. Com auxílio de um grau e pistilo, macerado até virar pó, e por fim, acondicionado no dessecador até a aplicação nas atividades biológicas.

7.4 Cromatografia de camada delgada analítica

Na cromatografia em camada delgada analítica foi utilizada a metodologia de Blatt 1996. Os spots do extrato e fases solubilizados em solventes adequados foram aplicados com o auxílio de um capilar de vidro em placas de camada delgada com suporte de alumínio e com sílica gel como fase estacionária. Misturas de solventes em proporções adequadas para cada classe investigada foram usadas como fases móveis. Após a eluição, as placas foram reveladas com reagentes específicos e/ou analisadas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

7.5 Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade eliminatória de radical livre de DPPH dos extratos foi realizada de acordo com Brand-Williams *et al.* (1995) com algumas modificações. Uma solução de estoque de DPPH em metanol (200 mM) foi adicionalmente diluída em metanol para se obter a UV-VIS absorvância entre 0.6-0.7 a 517 nm, obtendo-se a solução de trabalho de DPPH. Concentrações diferentes dos extratos (40 µL) foram misturados com solução de DPPH (250 µL) e após 30

minutos de incubação no escuro, as absorvâncias foram lidas ao mesmo comprimento de onda acima mencionado. As medições foram realizadas em triplicatas e suas atividades de eliminação foram calculados com base no percentual de redução do DPPH. Como padrões foram utilizados o ácido gálico, ácido ascórbico e quercetina. O resultado é expresso em porcentagem de inibição pela fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\text{Absorbância do Controle} - \text{Absorbância da Amostra})}{\text{Absorbância do Controle}} \times 100$$

Onde: A absorvância do controle é o radical com metanol e absorvância das amostras é o radical com o extrato

7.6 Atividade biológica em promastigotas de *L. Infantum*

As formas promastigotas de *L. infantum* foram coletadas e ajustadas para concentração de 1×10^6 parasitas/mL. As formas promastigotas foram incubadas na presença de concentrações de teste (25; 50; 100; 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) do extrato. O Crescimento da cultura celular foi acompanhado por contagens diárias em câmara Neubauer. O IC_{50} (uma concentração que inibe 50% do crescimento do parasita) foi determinado após 72 h de cultura. O ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Aliança *et al.*, (2017).

7.7 Análise da citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico e em células hepáticas

Para análise da citotoxicidade utilizado o reagente MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em células mononucleares de sangue periférico humanas e em células hepáticas da linhagem HepG2 (gentilmente cedidas pela Dra. Sheilla Andrade, IAM-FIOCRUZ/PE). As células foram incubadas na presença das seguintes concentrações 50, 100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$ do extrato, por 72 horas. Após o tempo de incubação necessária, foi realizada a leitura da absorvância através da densidade óptica em 570nm utilizando o leitor de ELISA, Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

7.8 Coleta sanguínea e isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Foram coletados de cada indivíduo (6), 10 mL de sangue, sendo 5 mL com heparina (Vacuette) para obtenção das PBMCs que foram utilizadas nos ensaios de cultura celular e 5 mL com EDTA (Vacuette). Ao sangue heparinizado foi adicionado PBS (pH 7.2) na proporção de 1:2. A esta mistura foi então adicionada ao Ficoll-hypaque (proporção de 1:1) para obtenção do anel de PBMCs após centrifugação. As células foram então lavadas duas vezes em meio RPMI 1640 (1:2), sendo posteriormente contadas em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Trypan. O valor obtido foi por sua vez ajustado para a concentração desejada através da adição de meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal 10% (SBF). Foi utilizado a metodologia de Lorena *et al.* (2008).

7.9 Análise Ultraestrutural de *L. Infantum*

Formas promastigotas de *L. infantum* controles e tratados com concentrações da IC₅₀ e 2x IC₅₀ por 72h do extrato de *X. americana*, foram lavadas, fixadas (glutaraldeído a 2.5%, formaldeído a 4 % em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,4) e pós-fixadas (tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2 por 2 h). Após esta etapa, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina EPON. Cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados através do microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI).

Para a microscopia eletrônica de varredura, as formas promastigotas de *L. infantum* foram fixadas. Em seguida, as leishmanias foram colocadas para aderir em lamínulas previamente revestidas com poly-lysina, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem no Critical Point dryer HCP-2 (Hitachi), metalizadas com 20nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol) e visualizadas através do microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

7.10 Cultivo de PBMC e adição de tratamento com extratos aquoso da casca de *Ximenia americana* para dosagem de citocinas da resposta imune celular Th1, Th2 e Th17

As células PBMC foram cultivadas em placas de 96 poços de poliestireno contendo meio RPMI suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal). As células foram incubadas

na presença das seguintes concentrações 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL do extrato, por 72 horas. Após o tempo de incubação necessária. Após o término no tempo de cultivo, os 100 µL do sobrenadante das culturas foram coletados e estocados imediatamente a -20 °C para posterior utilização em ensaios de CBA (Cytometric Bead Array-BD Biosciences, EUA). No CBA foi utilizado uma mistura de 6 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para dosagem das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 e IL-17a e leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson), conforme recomendado pelo fabricante.

7.11 Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO)

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo método de Griess, no sobrenadante de 72h de cultura. Para realização do teste 100 µL de sobrenadante de cada poço da cultura estimulada foram transferidos para placas de 96 poços, acrescentando igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0.1% de N-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 5% H₃PO₄, Sigma, St. Louis, MO, USA). A concentração de NO foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. A absorbância medida a 540nm (EZ Read 200, Biochrom).

7.12 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism® versão 8.2.1 considerando como significante valores com $p < 0.05$ e intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA). A concentração necessária para a inibição de 50% (IC₅₀) foi estimada graficamente através de análise de regressão linear e os índices de correlação foram calculados utilizando o coeficiente de Pearson (r).

8. RESULTADOS

O presente tópico descreve todos os resultados obtidos no decorrer do trabalho.

8.1 Atividade antioxidante do extrato aquoso da casca de *X. Americana*

A Tabela 1 apresenta os resultados do extrato aquoso da casca de *X. americana* referentes ao ensaio de sequestro de radicais DPPH do qual a apresentou a atividade antioxidante de 92,93 % \pm 1,0 após 30 minutos, o extrato obteve atividade de sequestro máximo do DPPH na concentração de 1000 μ g/mL. O Ácido ascórbico, Quercetina e Ácido gálico apresentaram respectivamente 76,25 %, 75,45 % e 72,45% de inibição.

Tabela 1 – Atividade antioxidante do extrato aquoso da casaca de *X. americana* através do sequestro de radicais DPPH

| ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|------------|--------------|
| μ g/mL | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,5 | Ácido ascórbico | Quercetina | Ácido gálico |
| % Inibição | 92,93 | 92,55 | 92,63 | 85,90 | 56,93 | 31,40 | 76,25 | 75,45 | 72,45 |

Fonte: Autor, 2020.

8.2 Triagem Fitoquímica do extrato aquoso da casca de *X. Americana*

Na triagem do extrato aquoso da casca de *X. americana*, foi possível observar a presença de Taninos condensados, Xantinas, Compostos Fenólicos, Lignanas, Monoterpenos, Sesquiterpenos e Diterpenos (Tabela 2). Não foi observado a presença de Antraquininas, Cumarinas, alcalóides, Antocianinas e Taninos hidrolizados.

Quadro 1 – Triagem fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) do extrato aquoso da casca de *X. americana*.

| AMOSTRA | <i>Ximenina americana</i> |
|--------------------------|---------------------------|
| Taninos condensados | + |
| Antraquininas | - |
| Cumarinas | - |
| Xantinas | + |
| Alcalóides | - |
| Antocianinas | - |
| Compostos fenólicos | + |
| Lignananas | + |
| Taninos hidrolizados | - |
| Mono, sesqui, diterpenos | + |

Fonte: Autor, 2020

Nota: A amostra foi solubilizada de acordo com sua polaridade. Os sinais positivos estão relacionados com a intensidade da coloração correspondente aos compostos observados, nas amostras com sinal negativo não foram observadas coloração correspondente a presença dos compostos.

Legenda: + = (presente); - = (ausente)

8.3 Avaliação do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* L. sobre promastigotas de *Leishmania infantum*, células mononucleares de sangue periférico e células hepáticas

Os dados referentes a atividade de *X. americana* sobre o parasito e células humanas estão representados na Tabela 3. Foi observado que o IC₅₀ da *X. americana* sobre *L. infantum* foi de 222.3 µg/mL enquanto o IC₅₀ da anfotericina B foi de 0.04 µg/mL. A citotoxicidade do extrato também foi avaliado utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e hepatócitos humanos (HepG2), a anfotericina B apresentou-se como sendo mais tóxica quando comparada ao extrato tendo CC₅₀ de 67.41 µg/mL para as células hepáticas, enquanto que a *X. americana* na concentração de 800 µg/mL para células mononucleares de sangue periférico apresentou-se mantendo mais de 90% de viabilidade, enquanto que em células hepáticas apresentou CC₅₀ de 305.40. A Anfotericina B apresentou um índice de seletividade maior que o extrato mesmo sendo mais citotóxica que a mesma. A anfotericina B apresentou IS_{PBMC} de 1580.5 e IS_{HepG2} de 1685.2 enquanto o extrato apresentou o índice de seletividade IS_{HepG2}>1. Os resultados podem ser observados na tabela abaixo:

Tabela 3 – Ação do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* sobre promastigotas de *L. infantum*, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células hepáticas.

| | μg/mL | | IS _{HepG2} | NO _{PBMC} |
|----------------------------|------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|
| | IC ₅₀ | CC ₅₀ (HepG2) | | |
| <i>X. americana</i> | 222.3 | 305.40 | 1.37 | S* |
| Anfotericina B | 0.04 | 67.41 | 1685.2 | N |

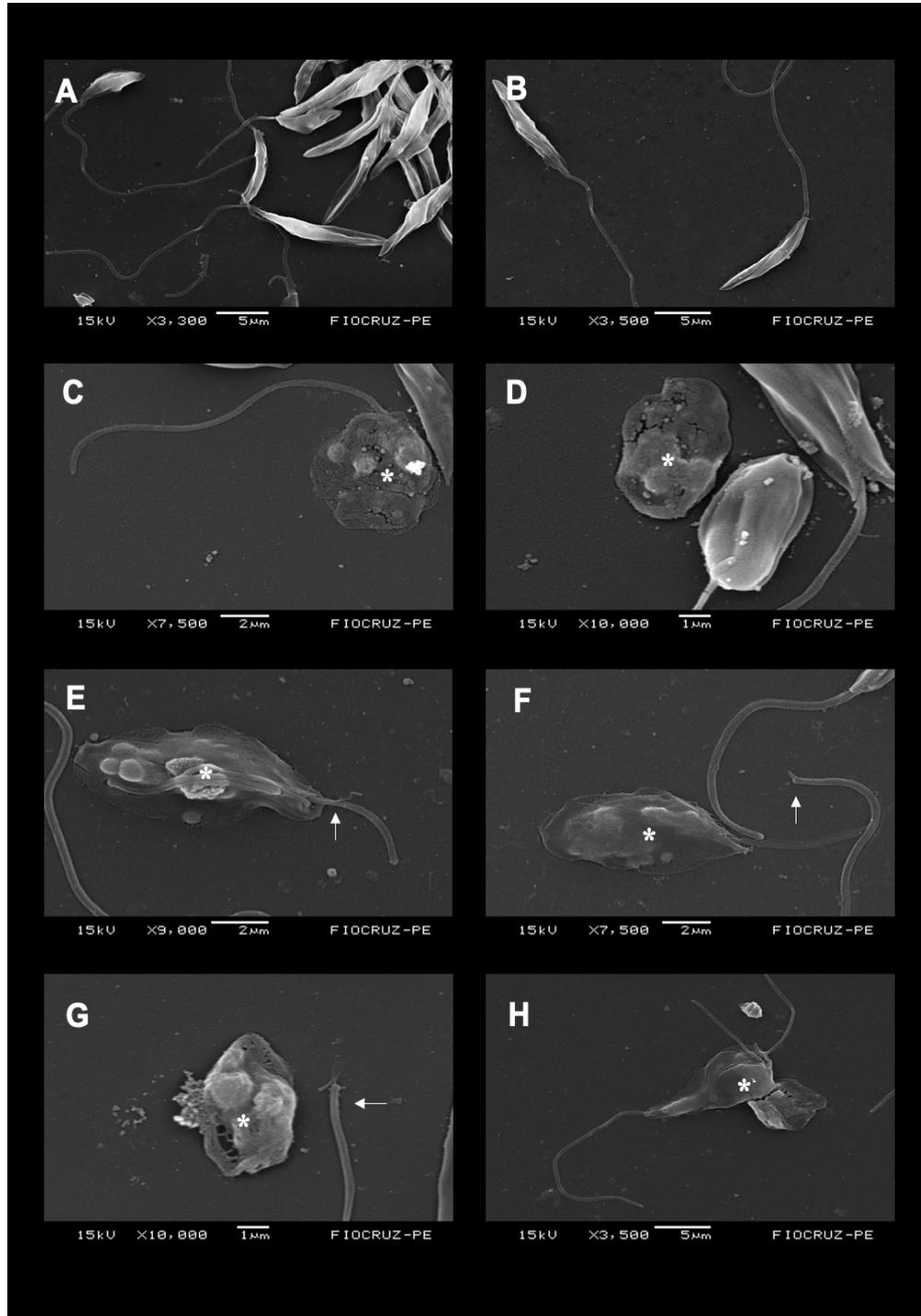
Fonte: Autor, 2019

Legenda: IC₅₀ (Concentração Inibitória a 50%), CC₅₀ (Concentração Citotóxica a 50%), IS (Índice de Seletividade), PBMC (Células Mononucleares de Sangue Periférico) e HepG2 (Linhagem de Células Hepáticas), NO (Dosagem de Óxido Nítrico), * (Diferença significativa em relação a anfotericina B (p<0.05), S (Produção significativa (p<0.05) e N (Produção não significativa (p<0.05).

8.4 Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. Infantum*

Nas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura, as promastigotas de *L. infantum* que não foram tratadas apresentaram tamanho padrão com morfologia do corpo e flagelo preservados (Figuras 6A-B). As promastigotas que foram tratadas nas concentrações 0.04 μg/mL de Anfotericina B apresentaram alterações morfológicas no corpo celular com ruptura da membrana e consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figuras 6C-D). As promastigotas tratadas com 1x a IC₅₀ (222.3 μg/mL) e 2x IC₅₀ (444.6μg/mL) apresentaram alterações muito similares ao controle anfotericina B, com mudança na morfologia do corpo com ruptura de membrana e extravasamento celular, porém ainda foram encontradas células com encurtamento flagelar ou perda total do flagelo (Figuras 6E-H).

Figura 6 – Eletromicrografias de promastigotas de *Leishmania infantum* não tratada e tratadas com o extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* e Anfotericina B.



Fonte: Autor, 2020

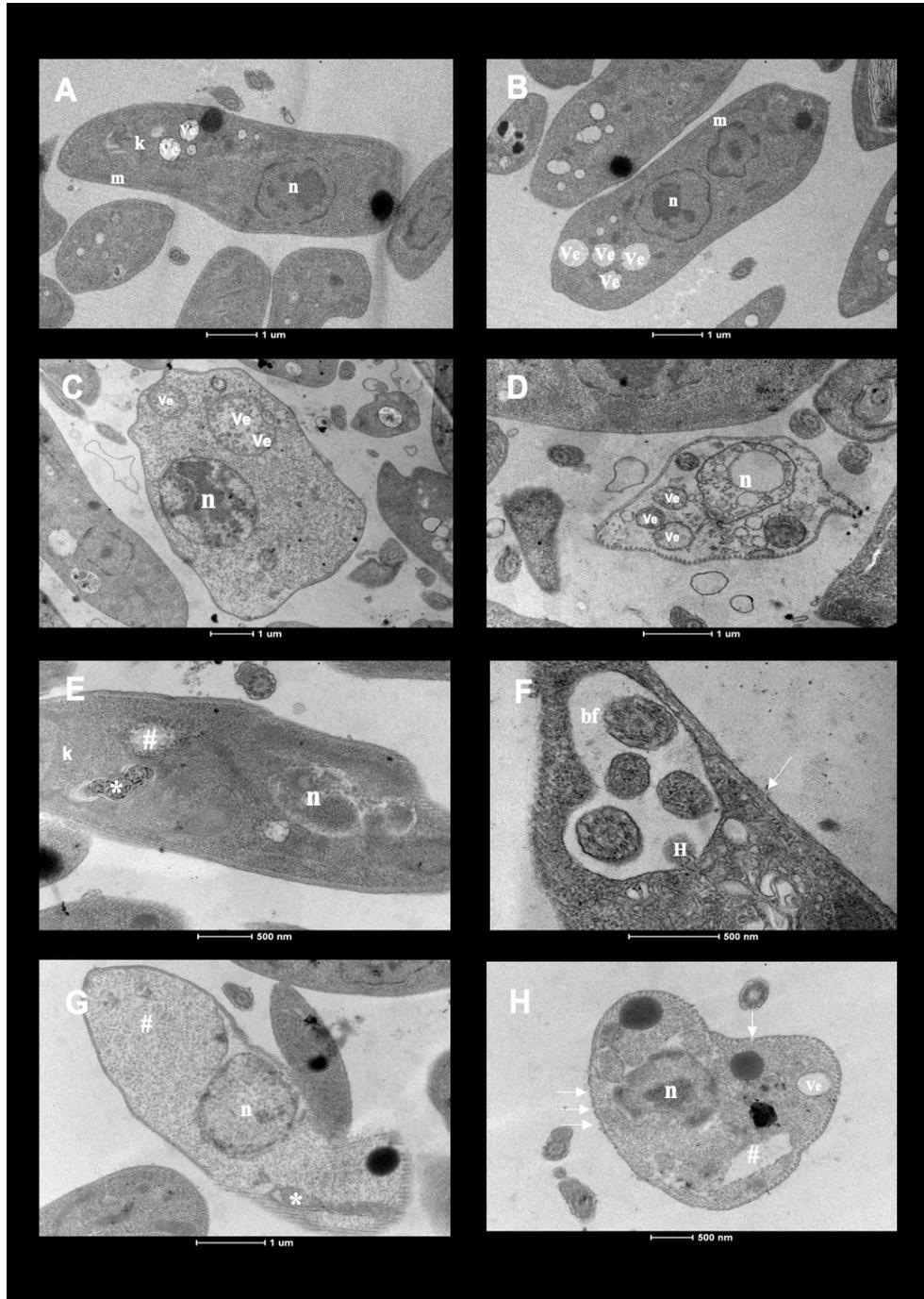
Legenda: (A-B) promastigotas controle (meio Schneider) apresentando forma fusiforme e comprimento do flagelo normal. (C-D) Promastigotas tratadas com a Anfotericina B $1 \times IC_{50}$ ($0.04 \mu\text{g/mL}$), apresentando perda da integridade celular (*) (D), (E-F) Promastigotas tratadas com $1 \times IC_{50}$ ($222.3 \mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso da casca de *X. americana* exibindo perda de conteúdo celular (*) e encurtamento (E) e perda do flagelo (F) indicados pela seta branca, (G-H) promastigotas tratadas com $2 \times IC_{50}$ ($444.6 \mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso da casca de *X. americana* apresentando perda do flagelo indicado pela seta branca e perda do conteúdo celular (*).

Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão foi possível observar que no grupo que não foi tratado, as promastigotas de *L. infantum* apresentaram núcleo e organelas com a forma e morfologia celular bem preservadas (Figuras 7A-B).

O tratamento com Anfotericina B na concentração de 0.04 μ g/mL (IC₅₀) causou uma intensa degradação dos componentes celulares da *L. infantum* como condensação da cromatina, rupturas de membranas, presença de vesículas e extravasamento de conteúdo citoplasmático (Figuras 7C-D).

Já o tratamento com o extrato aquoso da casca *X. americana* na concentração de 222.3 μ g/mL (1x IC₅₀) causou degradação dos componentes celulares como núcleo e mitocôndria (Figura 7E), e ruptura da membrana e inclusão eletrondensas na bolsa flagelar (Figura 7F).

Figura 7 – Eletromicrografias de promastigotas de *Leishmania infantum* não tratada e tratadas com Anfotericina B e extrato aquoso da casca de *Ximenia americana*.



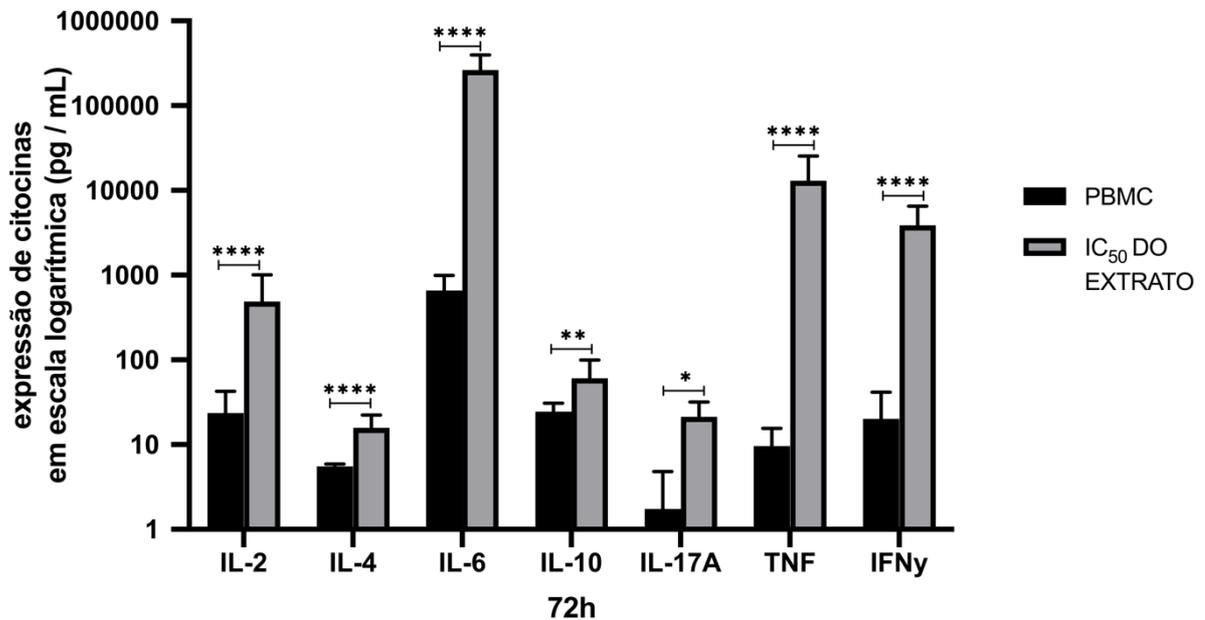
Fonte: Autor, 2020

Legenda: (A-B) promastigotas não tratada apresentando as estruturas como núcleo (n), organelas como cinetoplasto (k), mitocôndria (m) e vacúolo (Ve). (C-D) Promastigotas tratadas com a Anfotericina B com o IC_{50} (0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$), apresentando (*) inchaço mitocondrial. (E-F) Promastigotas tratadas com $1xIC_{50}$ (222.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato aquoso da casca de *X. americana* indicando degradação do citoplasma da célula (#) (E) e presença inclusões eletrondensas (H) que se acumularam no interior da bolsa flagelar (bf) e ruptura da membrana plasmática (#) (F). (G-H) Promastigotas tratadas com $2xIC_{50}$ (444.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato aquoso da casca de *X. americana* apresentando aumento da degradação do citoplasma da célula (#) (G) e ruptura da membrana plasmática (seta) (H).

8.5 Dosagem de citocinas da resposta imune celular Th1, Th2 e Th17

A Figura 8 apresenta os resultados referentes a dosagem de citocinas da resposta imune celular Th1, Th2 e Th17. Dentre as citocinas analisadas pode ser observado elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17A. Assim como houve uma discreta produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IFN- γ . As citocinas que apresentaram maior produção quando comparadas ao controle foram IL-6, TNF- α e IFN- γ .

Gráfico 1 – Citocinas produzidas em culturas de células mononucleares de sangue periférico humanos tratados *in vitro* com o e extrato aquoso da casca de *Ximenia americana*



Fonte: O autor, 2020

Legenda: * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.0001$

9 DISCUSSÃO

A necessidade de novas alternativas terapêuticas seguras e eficazes para o tratamento das leishmanioses tem se intensificado após o aparecimento de cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes o que conseqüentemente acabaram restringindo o seu uso (KHODABANDEH *et al.*, 2019). Apesar de fármacos como anfotericina B, miltefosina e pentamidina apresentarem novas formulações para auxiliar no tratamento dessa parasitose, esses medicamentos apresentam alto custo, alta toxicidade e efeitos colaterais fazendo com que seja necessário que os pacientes sejam hospitalizados durante a sua administração, por isso é fundamental que sejam descobertas novas alternativas terapêuticas para tratar a doença (GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

O reino vegetal tornou-se um importante aliado na busca de novos quimioterápicos, as plantas que por muitas vezes são utilizadas por comunidades tradicionais e que através desse conhecimento popular foi possível que diversos estudos pudessem ser realizados utilizando extratos de plantas de diferentes famílias para que seus metabólitos possam ser analisados e isolados (TELES *et al.*, 2011). Por apresentar relatos na literatura da eficiência de seus compostos bioativos, a *X. americana* que é conhecida popularmente como ameixa do sertão é amplamente utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatória, bactericida e tripanocida (MAIKAI, 2008).

No presente trabalho nós realizamos um *screening* da atividade biológica do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana*, coletada no Parque Nacional do Catimbau sobre as formas promastigotas de *L. infantum*. De acordo com a análise primária dos metabólitos secundários presentes no extrato aquoso da casca de *X. americana* através do método de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) indicam a presença de compostos fenólicos, taninos condensados, xantinas, lignanas, mono, sesqui e diterpenos que são importantes para que o extrato apresente atividade leishmanicida, antioxidante e imunomoduladora (SHETTAR *et al.*, 2015). O método de extração, assim como o solvente e equipamentos utilizados podem influenciar na eficiência e na eficácia da extração dos compostos bioativos provenientes da planta (GUPTA *et al.*, 2012). Outros autores encontraram resultados semelhantes quando fizeram a análise fitoquímica através da Cromatografia de Camada Delgada, como a presença de glicosídeos, taninos, flavonóides, terpenóides que são potentes moléculas antioxidantes (ARAGÃO *et al.*, 2018; MAIKAI *et al.*, 2008; MAIKAI *et al.*, 2009; SHETTAR *et al.*, 2015; UCHÔA *et al.*, 2016).

O extrato foi capaz de inibir o crescimento dos parasitas apresentando IC₅₀ (222.3 µg/mL). O efeito leishmanicida observado pode ser proveniente da presença dos metabólitos secundários presentes na planta, alguns autores já fizeram a correlação entre os metabólitos secundários como compostos fenólicos. De acordo com Bapela *et al.* 2017 que avaliaram o extrato apolar de *Ximenia caffra* proveniente da África do Sul, e observaram uma atividade leishmanicida significativa IC₅₀ (3.45 µg/ml), segundo os autores, os componentes presentes nos fitofármacos como a *X. caffra* são uma excelente fonte leishmanicida e que a importância de sua caracterização é fundamental para estudos futuros. Assim como Machado *et al.*, 2019 que comenta a respeito quando os componentes que estão presentes no extrato provenientes de fitofármacos entram em contato com o parasita podem induzir alterações em seu metabolismo que podem levar a morte celular através do processo de autofagia, degradando assim, as suas estruturas. O mesmo foi encontrado por Rodrigues *et al.* 2015 que testaram o extrato hexano de *Arrabidaea chica* frente a *Leishmania* spp. e também observaram alterações que poderiam estar associadas ao processo de morte celular. De acordo com Menezes *et al.* (2019) que analisaram o efeito leishmanicida do extrato etanólico da casca da *X. americana*, sugeriram que um dos possíveis mecanismos de ação do extrato que conseqüentemente promove a morte do parasita é devido a sua capacidade de ser um quelante de ferro que favorece a diminuição de nutrientes necessários ao parasita.

O nosso extrato também foi testado frente a células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e nas concentrações testadas que variaram de 25 – 800 µg/mL, do qual foi observado mais de 90% de viabilidade nessas células. Segundo Hiransai *et al.* (2016), o aumento ou diminuição viabilidade das células mononucleares está diretamente associado ao estresse oxidativo sofrido pela célula, do qual pode induzir a sua imunomodulação, com isso substâncias provenientes de fontes vegetais são uma excelente fonte de substâncias antioxidantes que conseqüentemente reduzem a toxicidade causada por radicais livres que são produzidos por essas células. O mesmo foi observado por Amaral *et al.* (2019) onde relataram que 14 espécies do gênero *Passiflora* não apresentavam citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico devido a presença dos metabólitos secundários como compostos fenólicos que auxiliavam na sua imunomodulação. O teste de citotoxicidade também foi realizado em células hepáticas de linhagem (HepG2) do qual apresentaram a CC₅₀ de 305.40 µg/mL e IS de 1.37 no extrato, enquanto a anfotericina apresentou CC₅₀ de 67.41 µg/mL e IS de 1685.2. Apesar do extrato aquoso ser menos citotóxico que a anfotericina em células hepáticas, a anfotericina B apresentou um índice de seletividade melhor que o do extrato.

Os antioxidantes atuam em diversas respostas biológicas, tais como a inflamação e imunidade, funcionando e auxiliando nos mecanismos de sinalização para a regulação redox (FILIPPIN *et al.*, 2008). O sistema de defesa antioxidantes podem ser classificados com substâncias enzimáticas produzidas pelo próprio organismo ou não enzimáticas, fazendo parte deste grupo as vitaminas e outras substâncias, como os compostos fenólicos, flavonoides, licopeno e bilirrubina (ALMEIDA *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2006). Para análise da atividade antioxidante do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* foi utilizado o método captura do radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), do qual apresentou sequestro de 92% do radical na concentração de 250 µg/mL. O resultado da atividade antioxidante da *X. americana* pode ser justificado devido a presença de metabólitos secundários como compostos fenólicos que apresentam atividade antioxidantes. Resultados semelhantes foram encontrados por Maikai *et al.* (2010) que associaram os metabólitos secundários presentes no extrato da planta com sua atividade antioxidante, assim como Almeida *et al.* (2016) que também observaram a presença de antioxidantes no fruto da *Ximenia americana*.

Para a investigação da ação do extrato aquoso da casca de *X. americana* em formas promastigotas de *L. infantum* realizamos uma análise ultraestrutural das células tratadas e não-tratadas. Nas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as promastigotas que não foram tratadas apresentaram morfologia fusiforme, superfície e o flagelo preservados. As promastigotas que foram tratadas com o extrato aquoso da casca e a Anfotericina B apresentaram alterações morfológicas como alteração na sua forma, perda da integridade da membrana celular, assim como encurtamento do flagelo. De acordo com Machado *et al.* (2019) que observaram o processo de estresse oxidativo que ocorre no parasita quando são utilizados fontes vegetais como agentes leishmanicida, foi observado que quando os seus princípios ativos entram em contato com o parasita podem induzir alterações em seu metabolismo que podem levar a morte celular através do processo de autofagia, degradando assim, suas estruturas. As alterações nas formas promastigotas também foi observada por Cardoso *et al.* (2018) que utilizaram o extrato das folhas de *Calophyllum brasiliense*, os autores justificaram que tais alterações são causadas devido ao processo de morte celular que conseqüentemente leva ao processo de morte celular programada.

Nas análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi possível observar que no grupo que não foi tratado, as promastigotas de *L. infantum* apresentaram núcleo e organelas com a forma e morfologia celular bem preservada. Os grupos que foram expostos ao

extrato e a anfotericina B apresentaram alterações ultraestruturais em comparação com as formas promastigotas não tratadas. As células tratadas apresentavam degradação do citoplasma, inchaço da mitocôndria e também foi observado a presença de inclusão eletrondensas na bolsa flagelar em consequência da ação dos metabólitos secundários do extrato, essa exacerbação é indicada pela intensa produção de proteínas pela célula como uma tentativa de sobrevivência, tal fato também foi visualizado por Tiunan *et al.* (2005) e Almeida-Sousa *et al.* (2016). Rodrigues *et al.* (2015) que utilizaram a *Arrabidaea chica* e também observaram através da Microscopia Eletrônica de Transmissão um aumento da vacuolização e inchaço da mitocôndria que podem estar associados ao processo de morte celular.

O desequilíbrio causado entre os radicais livres e o sistema antioxidativo pode causar um aumento na produção de radicais livres que culmina na ativação do sistema imunológico, causando inflamação (HIRANSAI *et al.*, 2016). Foi observado que o extrato induz o aumento na produção de NO quando comparado ao controle, foi observado diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o controle e a célula tratada ($IC_{50} = 222.3 \mu\text{g/mL}$). O aumento observado na produção de NO (óxido nítrico) nas células mononucleares de sangue periférico sugere que essa citocina tem um papel importantíssimo na regulação de respostas imunes (SERRELI *et al.*, 2019).

A análise do perfil de citocinas produzidas pelas células mononucleares de sangue periférico que foram cultivadas e tratadas ($IC_{50} = 222.3 \mu\text{g/mL}$) por 72 horas com o extrato foi associado ao estado pró-inflamatório, porque foi observado um aumento na produção das seguintes citocinas: TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17A quando comparadas ao controle. De acordo com Rodrigues *et al.* (2015) tais citocinas quando produzidas pelas células corroboram com a resposta Th1 que é pró-inflamatória que leva a morte do parasita. A produção elevada das citocinas pró-inflamatórias podem associadas ao efeito causado por algum metabólito secundário presente no extrato que fazem com que as células mononucleares aumentem a produção dessas citocinas, em alguns casos podem levar ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como citocinas anti-inflamatórias (KAPEWANGOLO *et al.*, 2015).

Os achados encontrados indicam que o extrato apresenta baixa citotoxicidade, além de atuar diretamente nas formas promastigotas de *Leishmania infantum*, além de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias sobre células mononucleares de sangue periférico. Porém, faz-se necessário que estudos complementares possam avaliar quais os possíveis mecanismos de ação que levam a morte do parasita, além de avaliar o seu efeito

imunomodulador *in vivo* para que os metabólitos secundários presentes no extrato possam ser utilizados como perspectiva de novas alternativas terapêuticas.

10 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o extrato aquoso da casca de *X. americana* L. apresentou-se como um potente agente antioxidante e leishmanicida. As alterações causadas pelos metabólitos secundários na ultraestrutura das formas promastigotas de *L. infantum* como rompimento da membrana celular e inchaço mitocondrial sugerem que o mecanismo de ação desse composto seja as membranas celulares. O extrato bruto de *Ximenia americana* L. nas concentrações testadas não apresentou citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico, essas células foram estimuladas e produziram citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17A.

Os dados obtidos *in vitro* com *X. americana* sobre *L. infantum* nos encorajaram a realizar estudos complementares para observar os efeitos desses metabólitos secundários *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGYARE, C. *et al.* An ethnopharmacological survey of medicinal plants traditionally used for cancer treatment in the Ashanti region, Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 212, p. 137-152, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.019>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- ALIANÇA, *et al.* *In vitro* evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 105, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.005>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- ALMEIDA, M. L. B. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, Barking, v. 192, p. 1078-1082, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.129>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- AMARAL, R. G. *et al.* Cytotoxic potential of 14 Passiflora species against cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 157-166, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/JMPR2019.6744>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- ANTWI, A. N. *et al.* Anti-microbial Activities of Selected Ghanaian Medicinal Plants and Four Structurally Similar Anti-Protozoan Compounds against Susceptible and Multi-drug Resistant Bacteria. **European Journal of Medical Physics**, New York, v. 20, n. 2, p. 1-14, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedomain.org/review-history/20522>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- AOUN, K.; BOURATBINE, A. Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. **Parasite**, Paris, v. 21, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2014014>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- ARAGÃO, T. *et al.* Contribution of secondary metabolites to the gastroprotective effect of aqueous extract of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) stem bark in rats. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 1, p. 112, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23010112>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- BAPELA, M. J.; KAISER, M.; MEYER, J. J. M. Antileishmanial activity of selected South African plant species. **South African Journal of Botany**, [S. l.], v. 108, p. 342-345, 2017.
- BARBOSA, M. R. *et al.* Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- BLADT, S. Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas. **Springer Science & Business Media**, 2009. Disponível em: <https://www.springer.com/gp/book/9783642005732>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5). Acesso em: 6 jan. 2020.

- BRASILEIRO, M. T *et al.* *Ximenia americana* L.: Botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 164-167, 2008. Disponível em: http://www.rbfarma.org.br/files/pag_164a167_ximenia_americana.pdf. Acesso em: 6 jan. 2020.
- BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 10, p. 2675-85, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232012001000017>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- CARDOSO, B. M. *et al.* Antileishmanial Activity of a *Calophyllum brasiliense* Leaf Extract. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 83, n. 1/2, p. 57-62, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-107673>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- CASTRO, J. M. *et al.* Conhecimento, percepções de indivíduos em relação à leishmaniose visceral humana como novas ferramentas de controle. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Londrina, v. 20, n. 2, p. 93-103, 2016. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26046651006>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Parasites - Leishmaniasis: Life Cycle**. Atlanta, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html#>. Acesso em: 13 jan. 2019.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- MENEZES, I. R. A. *et al.* *Ximenia americana* L. enhances the antibiotic activity and inhibit the development of kinetoplastid parasites. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Exeter, v. 64, p. 40-46, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.007>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- DE REZENDE, F. M. *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, [S. l.], p. 93, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Antonio_Azeredo_Coutinho_Neto/publication/318826409_Especies_reativas_de_oxigenio_em_plantas/links/59807f9fa6fdcc324bbe5ba4/Especies-reativas-de-oxigenio-em-plantas.pdf#page=93. Acesso em: 6 jan. 2020.
- DEBROY, S. *et al.* Challenges in modeling complexity of neglected tropical diseases: a review of dynamics of visceral leishmaniasis in resource limited settings. **Emerging Themes in Epidemiology**, London, v. 14, n. 1, p. 10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12982-017-0065-3>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, Basingstoke, v. 411, n. 6839, p. 843-847, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35081178>. Acesso em: 6 jan. 2020.

- FATOPE, M. O.; ADOUM, O. A.; TAKEDA, Y. C₁₈ acetylenic fatty acids of *Ximenia americana* with potential pesticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1872-1874, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf990550k>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- FEYSSA, D. H. *et al.* Uses and management of *Ximenia americana*, Olacaceae in semi-arido east Shewa, Ethiopia. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 44, n. 4, p. 1177-1184, 2012. Disponível em: [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(4\)/01.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44(4)/01.pdf). Acesso em: 6 jan. 2020.
- FILIPPIN, L. I. *et al.* Redox influence on the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 17-24, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042008000100005>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- FREITAS-JUNIOR, L. H. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Hungria, v. 2, p. 11-19, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Design, Development and Therapy**, Auckland, v. 12, p. 25, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- GUERIN, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00347-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00347-X). Acesso em: 6 jan. 2020.
- GUPTA, A. *et al.* Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. **International Journal of Applied and Natural Sciences**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 8-26, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ankit_Gupta6/publication/236229645_Modern_extraction_methods_for_preparation_of_bioactive_plant_extracts/links/0c9605172629e262c400000/Modern-extraction-methods-for-preparation-of-bioactive-plant-extracts.pdf. Acesso em: 6 jan. 2020.
- HIRANSAI, P. *et al.* Anti-nitric oxide production, anti-proliferation and antioxidant effects of the aqueous extract from *Tithonia diversifolia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 950-956, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.02.002>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- HOSSEINZADEH, S. *et al.* The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, Madison, v. 6, n. 9, p. 635-642, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ijcm.2015.69084>. Acesso em: 6 jan. 2020.

KAPEWANGOLO, P. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Ocimum labiatum* extract and isolated labdane diterpenoid. **Journal of Inflammation**, New York, v. 12, n. 1, p. 4, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0049-4>. Acesso em: 6 jan.

KHODABANDEH, M. *et al.* Treatment of resistant visceral leishmaniasis with interferon gamma in combination with liposomal amphotericin B and allopurinol. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 72, p. 101934, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101934>. Acesso em: 6 jan. 2020.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v. 65, p. 37-42, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/1990651037>. Acesso em: 6 jan. 2020.

KUMAR, A. *et al.* Metabolites in plants and its classification. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 287–305, 2015. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/e6bf/8acabc5a5ddb7ce8a1857e443415faca96e.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2020.

LEAL, L.; TELLIS, C. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. **Revista Fitos Eletrônica**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 261-264, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20150020>. Acesso em: 6 jan. 2020.

LI, H. *et al.* Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT-Food Science and Technology**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.011>. Acesso em: 6 jan. 2020.

LIMA, M.H.F. *et al.* *Leishmania infantum* parasites subvert the host inflammatory response through the adenosine A2A receptor to promote the establishment of infection. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 815, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00815>. Acesso em: 6 jan. 2020.

LORENA *et al.* Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 22, n. 2, p. 91-98, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.20209>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MACHADO *et al.* *Lavandula Luisieri* and *Lavandula Viridis* Essential Oils as Upcoming Anti-Protozoal Agents: A Key Focus on Leishmaniasis. **Applied Sciences**, Zurique, v. 9, n. 15, p. 3056, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9153056>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MACHADO, G. *et al.* Revisiting area risk classification of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 19, n. 1, p. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3564-0>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MAIKAI, V. A. *et al.* In vitro antitrypanosomal activity of aqueous and methanolic crude extracts of stem bark of *Ximenia americana* on *Trypanosoma congolense*. **Journal of Medicinal Plants Research**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 55-58, 2008. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/4793FA515092>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MAIKAI, V. A.; KOBO, P. I.; ADAUDI, A. O. Acute toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Ximenia americana*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 10, 2008. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/D3472917490>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MAIKAI, V. A.; KOBO, P. I.; MAIKAI, B. V. O. Antioxidant properties of *Ximenia americana*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 45, p. 7744-7746, 2010. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/130462>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MAIKAI, V. A.; MAIKAI, B. V.; KOBO, P. I. Antimicrobial properties of stem bark extracts of *Ximenia americana*. **Journal of Agricultural Science**, Richmond Hill, v. 1, n. 2, p. 30, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5539/jas.v1n2p30>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MENDES, C. S. *et al.*, Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 263-272, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232015211.03992015>. Acesso em: 6 jan. 2020.

MICHEL, G. *et al.* Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. **Acta Tropica**, Basel, v. 119, n. 2-3, p. 69-75, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.012>. Acesso em: 6 jan. 2020.

PLANTMED. **Ximenia americana L.**: ameixeira-da-Baia. Disponível em: http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Ximenia_americana.htm. Acesso em: 25 dez. 2017.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 2, p. 141-6, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572004000200012>. Acesso em: 6 jan. 2020.

QUINTANS-JUNIOR, L. J. *et al.* Avaliação da Atividade anticonvulsivante de plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 3, p. 179-184, 2002. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6540>. Acesso em: 6 jan. 2020.

REIS, L. L. *et al.* Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, n. 5, p. 638-645, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0243-2017>. Acesso em: 6 jan. 2020.

REZENDE, F. M. *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, [S. l.], p. 93, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Antonio_Azeredo_Coutinho_Neto/publication/318826409_Especies_reativas_de_oxigenio_em_plantas/links/59807f9fa6fdcc324bbe5ba4/Especies-reativas-de-oxigenio-em-plantas.pdf#page=93. Acesso em: 6 jan. 2020.

REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum**, Urmia, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4405679/>. Acesso em: 6 jan. 2020.

- RIBEIRO, D. A. *et al.* Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 912- 930, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_059. Acesso em: 6 jan. 2020.
- ROBERTS, C. W. *et al.* Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 129-142, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00280-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00280-3). Acesso em: 6 jan. 2020.
- RODRIGUES, I. A. *et al.* *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. **BioMed Research International**, Londres, v. 2014, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/985171>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- RODRIGUES, I. A. *et al.* Natural products: insights into leishmaniasis inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/835910>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- ROMERO, G. A. S; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America—a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. e584, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SANTOS, A. C. V. *et al.* Insecticidal oils from amazon plants in control of fall armyworm. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p. 642-647, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252016v29n314rc>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SERRELI, G. *et al.* Modulation of LPS-induced nitric oxide production in intestinal cells by hydroxytyrosol and tyrosol metabolites: Insight into the mechanism of action. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 125, p. 520-527, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erz242>. Acesso em: 29 jan. 2020
- SHETTAR, A. K. *et al.* Evaluation of in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ximenia americana* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 5, n. 11, p. 918-923, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60957-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60957-4). Acesso em: 6 jan. 2020.
- SILVA, K.M.A. *et al.* Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenia americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, Santiago, v. 14, n. 2, p. 92-98, 2015. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85636183003.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SILVA, P. H. *et al.* A etnobotânica e as plantas medicinais sob a perspectiva da valorização do conhecimento tradicional e da conservação ambiental. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 9, n. 2, p. 67-86, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18316/1981-8858.12>. Acesso em: 6 jan. 2020.

- SILVA, R. V. *et al.* Leishmaniose Visceral Crônica em Paciente com Infecção Avançada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana. **Medicina Interna**, Caracas, v. 24, n. 1, p. 40-41, 2017. Disponível em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0872-671X2017000100011&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SOBEH, M. *et al.* Hepatoprotective and hypoglycemic effects of a tannin rich extract from *Ximenia americana* var. *caffra* root. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 33, p. 36-42, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.07.003>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SOFOWORA, A.; OGUNBODEDE, E.; ONAYADE, A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Ile-Ife, v. 10, p. 210-229, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SOUSA, J. M. S.; RAMALHO, W. M.; MELO, M. A. Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 51, n. 5, p. 622-630. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0047-2018>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SOUSA, V. O. *et al.* Levantamento etnobotânico da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal. **Acta Biológica Catarinense**, Joinville, v. 5, n. 1, p. 46-55, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21726/abc.v5i1.516>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- SUN, J. C.; LANIER, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 11, n. 10, p. 645, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3044>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- TASDEMIR, D. *et al.* Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1352-1364.2006>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- TELES, C. B. G. *et al.* Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 936-942, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000500017>. Acesso em: 6 jan. 2020.
- THE PLANT LIST. **Olacaceae**. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Olacaceae/>. Acesso em: 26 dez. 2019.
- UCHÔA, V. T. *et al.* Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Montes Claros, v. 6, p. 091-096, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2016.60213>. Acesso em: 6 jan. 2020.

UCHOA, V. T. *et al.* Ação Moluscicida da Madeira do Caule da *Ximenia americana* L. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Trabalhos Científicos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2006.

Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/cdrom/29ra/resumos/T1805-2.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2020.

URSINE, R. L. *et al.*, Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: spatial distribution and socio-environmental factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 8, p. 505-511, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160133>. Acesso em: 6 jan. 2020.

VOLLMER, T.R.; STOCKHAUSEN, A.; ZHANG, J.Z. Anti-inflammatory effects of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, is partially mediated by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 287, n. 42, p. 35212-35221, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.400671>. Acesso em: 6 jan. 2020.

VOSS, C.; EYOL, E.; BERGER, M. R. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 211, n. 3, p. 177-187, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.016>. Acesso em: 6 jan. 2020.

XIMENIA. In: FLORA do Brasil 2020: algas, fungos e plantas. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB175>. Acesso em: 14 fev. 2020

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. LEISHMANIOSES: INFORME EPIDEMIOLÓGICO DAS AMÉRICAS. Washington: Opas, n. 6, fev. 2018. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y. Acesso em: 24 ago. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Access to essential antileishmanial medicines and treatment**. Geneva: OMS, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>. Acesso em: 13 jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**: Epidemiological situation. Geneva: OMS, 2019. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 10 out. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva: OMS, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 14 ago. 2017.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Título do Projeto: "Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana nas áreas endêmicas do município de Timbaúba/PE: aspectos clínicos, epidemiológicos, imunológicos, tratamento celular in vitro com novas drogas e dinâmica dos flebotômíneos".

Pesquisador responsável: Luiz Carlos Alves

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 24/08/2016

Registro no CAAE: 59093316.0.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.908.594

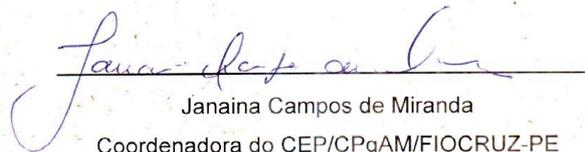
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

O CEP/CPqAM reforça a necessidade de entrega de relatórios parcial e final, em cumprimento a resolução 466/12, capítulo XI, artigo 2d.

Recife, 06 de fevereiro de 2017.


Janaina Campos de Miranda
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP/CPqAM/FIOCRUZ



Centro de Pesquisas
AGGEU
MAGALHÃES



Ministério de Saúde

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Termo de Consentimento Livre Esclarecido do Não portador da LTA

Convido o (a) Prezado (a) Senhor (a)

_____ para participar, como voluntário (a), da pesquisa (Caracterização da Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Timbaúba-PE, quanto os Aspectos Clínicos, Epidemiológicos, Imunológicos, Tratamento *In Vitro* com Novas Drogas e a Dinâmica dos Flebotômíneos Presentes nas Localidades Endêmicas).

Esta pesquisa é sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana, também conhecida por “espúndia”, “úlceras de bauru” e “ferida brava”, sob a coordenação Profs. Dr Luiz Carlos Alves e Dr. Fabio André Brayner dos Santos, ambos do Departamento de Parasitologia FIOCRUZ - PE. Os objetivos do estudo são identificar fatores relacionados a Leishmaniose, diagnosticar os casos suspeitos no Município de Timbaúba-PE e testar novas drogas candidatas a trata esta doença. A finalidade deste trabalho é contribuir para a prevenção/tratamento da doença e para ter certeza da causa (diagnóstico) da ferida de pele que os portadores da doença possuem.

Sua participação é necessária, pois, como não portador da doença Leishmaniose, o seu sangue será utilizado como controle negativo, fazendo uma comparação com o sangue dos pacientes que são portadores da doença. Sua participação é voluntária e realizaremos uma coleta de até 6 (seis) colheres de chá de sangue (30 ml), de mesmo volume de sangue dos voluntários confirmados com doença, através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse sangue será levado ao laboratório para ser analisado. Além disso, solicitamos sua colaboração para colocarmos duas armadilhas de insetos em seu quintal, essas armadilhas não irão prejudicar a ninguém de sua família ou algum outro animal, apenas servirá para coletar insetos. Também pedimos sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica (*se for o caso*). Se o resultado da amostra de sangue for positiva para Leishmaniose Tegumentar Americana, será realizada uma nova coleta de 1 colher de chá (5ml), após a finalização do tratamento da doença. O tratamento da doença consiste de remédios em soro aplicados em ambiente hospitalar por um período de no mínimo 20 dias e no máximo 60 dias, sem internação. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa possui riscos, durante a coleta de sangue, de gerar o incômodo de pequena dor e/ou hematoma (mancha roxa) no local da coleta do sangue. Outro risco poderá ser o constrangimento de responder um questionário socioeconômico, que terá perguntas sobre comportamento, situação social e econômica. Como benefício para o Senhor (a) haverá o diagnóstico (identificação) da leishmaniose se estiver doente, um maior conhecimento sobre a leishmaniose e formas de como se prevenir da doença, além de o Município de Timbaúba ter informações que poderão ser utilizadas para melhoramento das condições que causam a leishmaniose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador (a) e também poderá retirar-se do estudo em qualquer etapa da pesquisa.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2693, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CPqAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser.

Eu autorizo a utilização dessas amostras estocadas:

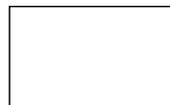
- () com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE;
() dispense a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do participante

ou



Impressão do dedo polegar

Pesquisador Responsável
Luiz Carlos Alves/ CPqAM/Fiocruz

ou

Pesquisador Responsável
Fábio André Brayner/ CPqAM/Fiocruz