

ARTÍCULOS ORIGINALES

Avaliação da atividade anti-Leishmania e anti-Trypanosoma do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L.

Evaluation of the anti-leishmania and anti-trypanosoma activity of ethanolic extract from the leaves of *Annona squamosa* L.

Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo, Francisco Rodolpho¹; de Araújo Delmondes, Gyllyandeson¹; Paulo da Cruz, Luízia¹; Amaro do Nascimento, Érika¹; Relison Tintino Saulo²; Santiago Lemos, Izabel Cristina¹; Bezerra da Cunha, Francisco Assis²; Vega Gomez, Maria Celeste³; Coronel, Cathia³; Martins da Costa, José Galberto⁴; Melo Coutinho, Henrique Douglas²; Bezerra Felipe, Cícero Francisco¹; Alencar de Menezes, Irwin Rose¹; Kerntopf, Marta Regina^{1*}

¹Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. Rua Cel. Antônio Luís, 1161, Pimenta, CEP: 63105-00. Fone:+55 (88) 3102 1212; Fax: +55(88)31021291. ²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. ³Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni/Laboratorios Díaz Gill, Asunción-Paraguay. ⁴Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato-CE. *martareginakerntopfm@outlook.com

Recibido: 1 de diciembre de 2014

Aceptado: 14 de septiembre de 2016

Resumo. As doenças parasitárias, também chamadas de “doenças negligenciadas”, continuam sendo uma grande dificuldade para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres. Podemos citar como exemplo dessas doenças, a leishmaniose e a doença de Chagas. A leishmaniose é causada por parasitas do gênero *Leishmania* e afeta cerca de 12 milhões de pessoas. A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, causa aproximadamente 50.000 mortes por ano. Os fármacos disponíveis para o tratamento dessas doenças são altamente tóxicos, sendo este um dos motivos que leva à busca por drogas eficazes e seguras para seus tratamentos. As folhas da *Annona squamosa*, espécie da família Annonaceae, já foram descritas na literatura por suas atividades hepatoprotetora, antiparasitária, pesticida e antimicrobiana. Nesse estudo avaliamos a atividade anti-leishmania e tripanocida do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L. (EEAS) em formas promastigota do parasita *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, além de avaliar a atividade citotóxica em fibroblasto. Os resultados demonstram que o extrato apresentou uma melhor atividade contra *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* quando comparados com *Trypanosoma cruzi*; e que apresentou uma maior toxicidade nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml, com mortalidade dos fibroblastos de aproximadamente 85% e 100%, respectivamente. Esse estudo aponta para uma perspectiva terapêutica alternativa que se mostrou eficaz frente aos parasitas aqui estudados, exceto a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. Com relação aos testes de citotoxicidade fazem-se necessários novos testes, uma vez que apresentou um alto nível de toxicidade, viabilizando assim futuros ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: *Annona squamosa*; Annonaceae; *Leishmania*; *Trypanosoma cruzi*

Abstract. The parasitic diseases, also calls by “neglected diseases”, continue being a major difficulty for the social and economic development of the poorest countries. We can cite as an example of these diseases, the leishmaniasis and the Chagas disease. Leishmaniasis is caused by parasites of the genus *Leishmania* and affects about 12 million people. The Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, causes approximately 50,000 deaths per year. The drugs available for the treatment of these diseases are highly toxic, being this one of the reasons that leads to the search for effective and safe drugs for their treatments. The leaves of the *Annona squamosa*, species of the family Annonaceae, have already been described in the literature by their hepatoprotective activities, antiparasitic, pesticide and antimicrobial. In this study we assessed the activity tripanocidal and anti-leishmania of ethanolic extract from the leaves of *Annona squamosa* L. (EEAS) in promastigota forms of the parasite *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* and epimastigota of *Trypanosoma cruzi*, in addition to evaluating the cytotoxic activity in fibroblasts. The results demonstrate that the extract presented a better activity against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* when compared with *Trypanosoma cruzi*; and which presented a greater toxicity at concentrations of 500 and 1000 µg/ml, with mortality of fibroblasts of approximately 85% and 100%, respectively. This study points to an alternative therapeutic perspective that showed effective against the parasites here studied, except the epimastigota form of *Trypanosoma cruzi*. With relation to cytotoxicity tests are required new tests, once presented a high level of toxicity, thus enabling future *in vivo* assays.

Keywords: *Annona squamosa*; Annonaceae; *Leishmania*; *Trypanosoma cruzi*

Introdução

As doenças parasitárias continuam sendo uma grande dificuldade para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres e costumam serem chamadas de “doenças negligenciadas”, “doenças órfãs” e/ou “doenças tropicais” (Nwaka e Ridley 2003). As doenças negligenciadas continuam a existir por conta das deficiências do conhecimento científico; como também dificuldades enfrentadas pelo mercado, os altos custos de medicamentos ou vacinas e devido às dificuldades de planejamento enfrentadas na saúde pública, medicamentos baratos ou mesmo gratuitos que não são utilizados (Morel 2006). Tem-se como exemplos de doenças negligenciadas, a doença de Chagas e a leishmaniose (Ministério da Saúde 2010).

A leishmaniose é uma doença que pode acometer homens, mulheres e crianças em muitos países por todo o mundo e que afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas. Essa parasitose pode ter vários sintomas clínicos e se apresentar nas formas: cutânea, mucocutânea ou visceral. A Leishmaniose cutânea é a manifestação clínica mais comum e a forma visceral é mais grave, em que os órgãos vitais do corpo são atingidos (WHO 2013). É causada por parasitas do gênero *Leishmania*, possui ciclo de vida heteroxênico, e têm duas formas morfológicas, promastigota e amastigota (Michalick 2003).

Outra doença parasitária, bastante difundida, é a doença de Chagas. Foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é um dos grandes problemas sociais e econômicos enfrentados na América Latina. É causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia. Chega a causar aproximadamente 50.000 mortes por ano, sendo que outros 100 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de contágio (Gelb e Hol 2002; Engels e Savioli 2006).

A história da terapêutica experimental destas doenças tem sido caracterizada por sucessos e fracassos. No tocante a doença de Chagas duas drogas tem relevante destaque, o nifurtimox e o benznidazol, entretanto estes fármacos sofrem influências diretas de algumas condições, como a duração do tratamento, a idade e a distribuição geográfica dos pacientes, dentre outros (Dias *et al.* 2009). No caso das leishmanioses cutânea e visceral, mes-

mo com sua alta toxicidade, os antimoniais pentavalentes têm sido usados como drogas de primeira escolha para tratamento. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosine são drogas de interesse por representarem novas alternativas terapêuticas, porém apresentam significativos problemas como efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação (Pereira *et al.* 2011).

A *Annonaceae* é uma família com distribuição predominantemente tropical, que inclui 130 gêneros e 2200 espécies. No Brasil ocorrem 33 gêneros e cerca de 250 espécies. As *Annonaceae* ocorrem em praticamente todas as formações naturais do Brasil, com destaque para *Xylopia aromatica* (pimenta-de-macaco) e *Annona crassiflora* (marolo) nos cerrados, que servem como fonte de renda para populações locais. A pinha-ata ou fruta do conde (*Annona squamosa*) e a graviola (*Annona muricata*) são espécies originárias da América Central, frequentemente cultivadas no Brasil, em especial no Nordeste, com frutos que são consumidos in natura ou na forma de sucos e sorvetes (Souza e Lorenzi 2008).

O gênero *Annona* inclui aproximadamente 140 espécies tropicais com várias espécies nativas sendo conhecidas popularmente por fruta-do-conde, pinha, graviola, beribá e cabeça de negro. As espécies mais comuns no Brasil são *Annona muricata*, *Annona cherimola*, *Annona coriacea*, *Annona reticulata*, *Annona tenuiflora* e *Annona squamosa* (Hiruma-Lima e Di Stasi 2003). As folhas da *Annona squamosa* foram descritas na literatura tendo como propriedades as atividades: hepatoprotetora (Raj *et al.* 2009); antiparasitária (Fernandes *et al.* 2009); pesticida e antimicrobiana, sendo que sua atividade antimicrobiana está relacionada a presença de flavonóides (Kotkar *et al.* 2001; Patel e Kumar 2008). Este trabalho tem como objetivo avaliar atividade anti-*Leishmania* e tripanocida do extrato etanólico das folhas de *Annona squamosa* L. em formas promastigota do parasita *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, além de avaliar a atividade citotóxica em fibroblasto.

Metodologia

Material botânico

As folhas da espécie *Annona squamosa* utilizadas em nossos experimentos foram coletadas no Distrito Ponta da Serra situado no

município de Crato-CE. Uma amostra representativa da espécie, contendo flor e fruto, foi depositada e identificada no Herbário Cariense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri-URCA, sob o registro #5539.

Preparação do extrato

O extrato etanólico foi obtido pelo método de extração exaustiva à frio (Matos 1997). Foram utilizadas folhas frescas de *Annona squamosa* (275 g), que foram previamente trituradas e submetidas à extração com etanol P.A. por 72 h. Em seguida o solvente foi destilado em evaporador rotativo a 80° C sob pressão reduzida, sendo o extrato bruto obtido pesado (10,2g) e armazenado a temperatura ambiente.

Linhagens celulares utilizadas

Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 (Buckner *et al.* 1996). Os parasitos, transfectados de forma estável com o gene para a β -galactosidase de *Escherichia coli* (*lacZ*), foram fornecidos pelo Dr. F. Buckner através do Instituto Conmemorativo Gorgas (Panamá). As formas epimastigotas foram cultivadas a 28° C em Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose Broth* (Difco, Detroit, MI), suplementado com Soro Fetal Bovino 10% (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA), penicilina (Ern, S.A., Barcelona, Spain) e estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain), conforme descrito por Le Senne *et al.* (2002). As células foram coletadas para os testes na fase exponencial de seu crescimento.

Culturas de *Leishmania* spp. foram obtidas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Asunción, Paraguay - IICS e identificadas por análise isoenzimática. A manutenção das linhagens, forma de cultivo e isolamento das formas promastigotas de *Leishmania* spp. seguiram os procedimentos descritos por Roldos *et al.* (2008). Os ensaios de inibição das formas promastigotas foram realizados utilizando as linhagens de *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) e *L. infantum* (MHOM/ES/92/BCN83), cultivadas a 22 °C em meio Schneider's *Drosophila*, suplementado com SFB 20%.

Os ensaios de citotoxicidade utilizaram a linhagem de fibroblastos NCTC929, cultivada em Minimal Essential Medium (Sigma). O meio de cultura foi suplementado com SFB inativada por calor (10%), penicilina G (100

U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A viabilidade destas linhagens foi avaliada através do uso da resazurina como método colorimétrico (Rolón *et al.* 2006).

Reagentes

Resazurina sódica foi obtida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO) e estocada a 4 °C ao abrigo da luz. A solução de resazurina foi preparada com tampão fosfato 1%, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. O Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) foi dissolvido em uma solução de Triton X-100 0,9% (pH 7.4). Penicilina G (Ern, S.A., Barcelona, Spain), estreptomicina (Reig Jofré S.A., Barcelona, Spain) e Dimetilsulfóxido (DMSO) também foram utilizados.

Teste de atividade antiepipimastigota

O teste foi realizado em microplacas com 96 cavidades, com culturas na fase exponencial, conforme descrito por Vega *et al.* (2005). Epimastigotas foram inoculados em uma concentração de 1×10^5 mL⁻¹ em 200 μ L de caldo de fígado triptose. As placas foram então incubadas com as drogas nas concentrações de 100 e 500 μ g/mL a 28 °C por 72 h. Após este tempo, foram adicionados 50 μ L da solução de CPRG, de forma a atingir uma concentração final de 200 μ M. As placas foram incubadas por um tempo adicional de 6 h a 37 °C e foram submetidas a visualização sob 595nm. Cada experimento foi realizado duas vezes e de forma independente, tendo sido cada concentração testada em triplicata em cada experimento. A eficiência de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de atividade antiepipimastigota (AE%).

Teste de atividade antipromastigota

Culturas de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram cultivadas até uma concentração de 106 células/mL e então transferidas para o teste. Os compostos foram dissolvidos em DMSO até as concentrações a serem testadas e foram transferidos para as microplacas. Cada ensaio foi realizado em triplicata. A atividade dos compostos foi avaliada após 72 h por contagem direta das células após diluições seriadas e comparadas com um controle não tratado.

Tabela 1. Atividade antipromastigota *L. infantum* e *L. brasiliensis*, atividade antiepimastigota *T. cruzi* e citotoxicidade.

Extrato	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	%AP (<i>L. infantum</i>)	$\pm\text{DS}$	%AP (<i>L. brasiliensis</i>)	$\pm\text{DS}$	%AE (<i>T. cruzi</i>)	$\pm\text{DS}$	%AF	$\pm\text{DS}$
EEAS	1000	95,07	2,12	98,06	0,00	27,88	2,14	100	1,42
	500	83,30	0,40	58,97	0,00	19,21	1,96	84,88	0,69
	250	66,59	1,15	55,40	1,11	17,29	1,42	48,66	0,90
	125	39,44	2,16	43,72	1,26	8,81	2,12	36,02	1,18

EEAS – Extrato Etanólico de *Annona squamosa*; AP – Atividade Antipromastigota; DS – Desvio Padrão; AE – Atividade Antiepimastigota; AF – Atividade Antifibroblastos.

Teste de citotoxicidade

Fibroblastos NCTC929 foram plaqueados em placas de microdiluição de 96 cavidades a uma concentração final de 3×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Após isso, o meio de cultura foi removido e os compostos foram adicionados a 200 μL , sendo realizado um novo cultivo por 24 h. Após esta incubação, 20 μL de uma solução de Resazurina 2 mM foi adicionada em cada cavidade. As placas foram incubadas por 3h e a redução da resazurina foi determinada através de dupla absorbância nos comprimentos de onda de 490 e 595 nm. O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

Análise estatística

A concentração efetiva (CE_{50}) e concentração letal (CL_{50}) foram calculadas pelo software Probitos Tsk version 1.5.

Resultados

A atividade citotóxica, anti*Leishmania* e tripanocida do EEAS são exibidas na Tabela 1. O extrato apresentou uma maior toxicidade nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$, com mortalidade dos fibroblastos de aproximadamente 85% e 100%, respectivamente. No tocante à avaliação da atividade antiparasitária, o EEAS foi testado nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$. Obtivemos uma melhor atividade contra as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. brasilienses*

nas concentrações de 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$, com uma taxa de mortalidade de 83,30 e 95,07% de *L. infantum*, respectivamente, e de 58,97 e 98,06% de *L. brasiliensis*, respectivamente. Já frente a *T. cruzi*, obtivemos um maior percentual de mortalidade na concentração de 1000 $\mu\text{g/ml}$, o qual matou 27,88% dos parasitas. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

Na análise estatística, calculamos os valores da CE_{50} do EEAS frente aos parasitas *L. infantum* e *L. brasilienses* e obtivemos os seguintes valores: 186,61 $\mu\text{g/ml}$ e 284,73 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Já referente à *T. cruzi*, não foi possível calcular a CE_{50} devido os baixos percentuais de mortalidade nas concentrações testadas. Outro valor calculado foi o da CL_{50} frente aos fibroblastos, onde observamos que a CL_{50} do EEAS é de 260,14 $\mu\text{g/ml}$.

Discussão

Os produtos naturais oferecem novas fontes e perspectivas na busca de novos compostos com potencial clínico-terapêutico. Pesquisas com fitoterápicos tem revelado o grande potencial na busca de novas substâncias para combater as doenças negligenciadas (Rondon *et al.* 2012) dentre elas, a doença de Chagas e a leishmaniose (ministério da Saúde 2010). Entretanto, para que novos fármacos sejam disponíveis para o tratamento dessas doenças em humanos é necessário que se faça uma avaliação prévia desses compostos *in vitro* e *in vivo* (Soares-Bezerra

et al. 2004), os quais são executados em diferentes etapas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), para que um candidato seja testado *in vivo*, inicialmente devemos submetê-los a ensaios *in vitro* de citotoxicidade e atividade antiparasitária, após realizar essa primeira triagem os resultados devem ser analisados para definir essa possibilidade (Dias et al. 2009).

Os resultados demonstram que o extrato etanólico de *Annona squamosa* apresentou uma melhor atividade contra *L. infantum* e *L. brasiliensis* quando comparados com *T. cruzi*. O extrato, numa concentração de 250 µg/ml, apresentou um percentual de mortalidade de *L. infantum* e *L. brasiliensis* de 66,59 e 55,40%, respectivamente, dado importante visto que uma inibição neste nível com uma concentração de 250 µg/mL é considerado clinicamente relevante (Rosas et al. 2007). Outras espécies do gênero *Annona* já foram descritas na literatura por possuir atividade leishmanicida, podemos citar como exemplo, *Annona muricata* (Vila-Nova et al. 2011), *Annona mucosa* (De-Lima et al. 2012) e *Annona cornifolia* (Lima et al. 2014).

Levando a expressividade dos resultados tripanocidas, vale ressaltar que embora o extrato em questão não tenha apresentado resultado favorável, tal qual apresentou sobre as espécies de *Leishmania*, já foram evidenciados vários metabólitos secundários de diferentes padrões estruturais que têm se mostrado ativo contra *T. cruzi* (Saúde-Guimarães e Faria 2007); a triagem de extratos de plantas é uma estratégia válida, sendo explorados para descobrir agentes tripanocidas (Luize et al. 2006; Pizzolatti et al. 2008).

Um importante critério na procura por compostos ativos com atividade tripanocida e leishmanicida é a avaliação da citotoxicidade em células do hospedeiro. A atividade citotóxica de outras plantas foram avaliadas em diferentes modelos de células humanas, tais como: linfócitos humanos (Reyes-Chilpa et al. 2008), células MRC-5 (Cabral et al. 2010) e macrófagos peritoneais (Houghton et al. 2007). Os resultados obtidos apontam para uma perspectiva terapêutica alternativa que se mostrou eficaz frente aos parasitas aqui estudados, exceto a forma epimastigota de *T. cruzi*. Com relação aos testes de citotoxicidade fazem-se necessários novos testes, uma vez que apresentou alto nível de toxicidade, viabilizando assim futuros ensaios *in vivo*.

Referências

Buckner F.S., Verlinde C.L., La Flamme A.C., Van Voorhis W.C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2592–2597.

Cabral M.M.O., Barbosa-Filho J.M., Maia G.L.A., Chaves M.C.O., Braga M.V., De-Souza W., SOARES, R. O. Neoglicans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2010;124:319-324.

De-Lima J.P.S., Pinheiro M.L.B., Santos A.M.G., Pereira J.L.S., Santos D.M.F., Barison A., Silva-Jardim I., Costa E.V. *In vitro* Anti-Leishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Rev. Virtual Quim.* 2012;4(6):692-702.

Dias L.C., Dessoy M.A., Silva J.J.N., Thiemann O.H., Oliva G., Andricopulo A.D. Chemotherapy of Chagas Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quimica Nova.* 2009;32:2444 – 2457.
Engels D., Savioli L. *Trends Parasitol.* 2006;22:363.

Fernandes M.Z.L.C.M., Fernandes R.M., Brito D.R.B., Borba H.R. Efeito anti-helmíntico dos extratos aquosos e etanólicos da *Annona squamosa* L. (Fruta-do-conde) sobre o nematóide *Ascaridia galli*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 2009;11(2):124-129.
Gelb M.H., Hol W.G. *Sciencel.* 2002.

Hiruma-Lima C.A., Di Stasi L.C. Magnoliales medicinais. In: Guimarães M.E., Santos M.N., Di Stasi L.C., Hiruma-Lima C.A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.* 2ªed., São Paulo: UNESP; 2003. p. 89-109.

Houghton P.J., Howes M.J., Lee C.C., Steventon G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:391-400.

Kotkar H.M., Mendki P.S., Sadan S.V.G.S., Jha S.R., Upasani S.M., Maheshwari V.L. Antimicrobial and Pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. *Pest Management Science.* 2001;58.

- Le Senne A., Muelas-Serrano S., Fernandez-Portillo C., Escario J.A., Gómez-Barrio A. Biological characterization of a beta-galactosidase expressing clone of *Trypanosoma cruzi* CL strain. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:1101-1105.
- Lima L.A.R.S., Alves T.M.A., Zani C.L., Sales-Júnior P.A., Romanha A.J., Johann S., Cisalpino P.S., Pimenta L.P.S., Boaventura M.A.D. *In vitro* cytotoxic, antifungal, trypanocidal and leishmanicidal activities of acetogenins isolated from *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (Annonaceae). An. Acad. Bras. Ciênc. 2014;6(2).
- Luize P.S., Ueda-Nakamura T., Dias-Filho B.P., Cortez D.A.G., Nakamura C.V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. Biol Pharm Bull. 2006;29:2126-2130.
- Matos F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. 2ª ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.
- Michalick M.S.M. GÊNERO *Leishmania*. En: Neves D.P., Melo A.L., Genaro O., Linardi P.M. Parasitologia humana. 10ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 31-35.
- Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Revista de Saúde Pública. 2010;44(1):200-202.
- Morel C.M. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. Cadernos de Saúde Pública. 2006;22(8).
- Nwaka S., Ridley R.G. Nature Rev. Drug Discov. 2003;2:919.
- Patel J.D., Kumar V. *Annona squamosa* L.: Phytochemical analysis and Antimicrobial Screening. Journal of Pharmacy Research. 2008;1:34-38.
- Pereira I.O., Sacramento L.V.S., Marques M.J. Leishmanioses: o estado da arte. Revista da Universidade Vale do Rio Verde. 201;9(1):220-238.
- Pizzolatti M.G., Mendes B.G., Cunha-Júnior A., Soldi C., Koga A.H., Eger I., Grisard E.C., Steindel M. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennet (Polygalaceae). Rev Bras Farmacogn. 2008;18:177-182.
- Raj D.S., Vennila J.J., Aiyavu C., Panneersekvam K. The hepatoprotective effect of alcoholic extract of *Annona squamosa* leaves on experimentally induced liver injury in swiss albino mice. International Journal of Integrative biology. 2009;5:182-186.
- Reyes-Chilpa R., Estrada-Muñoz E., Veja-Avila E., Abe F.: Kinjo J., Hernández-Ortega S. Trypanocidal constituents in plants. 7. Mamea-type coumarins. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:431-436.
- Rodon F.C.M., Bevilaqua C.M.L., Accioly M.P., Morais S.M., Andrade Júnior H.F., Carvalho C.A., Lima J.C., Magalhães H.C.R. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2012;21(3):185-191.
- Roldos V., Nakayama H., Rolón M., Montero-Torres A., Trucco F., Torres S., Veja C., Marrero-Ponce Y., Hagueburu V., Yaluff G., Gómez-Barrio A., Sanabria L., Ferreira M.E., Rojas de Arias A., Pandolfi E. Activity of a hydroxybenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi*: *In silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. Eur J Med Chem. 2008;43:1797-1807.
- Rolón M., Seco E., Vega C., Nogal J.J., Escario J.A., Gómez-Barrio A., Malpartida F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. Int J Antimicrob Agents. 2006; 28: 104-109.
- Rosas L.V., Cordeiro M.S.C., Campos F.R., Nascimento S.K.R., Januário A.H., França S.C., Nomizo A., Toldo M.P., Albuquerque S., Pereira P.S. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Braz J Med Biol Res. 2007;40:663-670.
- Saúde-Guimarães D.A., Faria A.R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:455-465.

Soares Bezerra R.J., Leon L., Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2004;40(2).

Souza V.C., Lorenzi H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª Ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. p. 640.

Vega C., Rolón M., Martínez-Fernández A.R., Escario J.A., Gómez-Barrio A.A. New pharmacological screening assay with *Trypanoso-*

ma cruzi epimastigotas expressing beta-galactosidase. Parasitol Res. 2005;95:296-298.

Vila-Nova N.S., Morais S.M., Falcão M.J.C., Machado L.K.A., Beviláqua C.M.L., Costa I.R.S., Brasil N.V.G.O.S., Andrade-Júnior H.F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2011;44(5).

World Health Organization (WHO). 2013. Leishmaniasis. [em linea] [Acessada em 10 dezembro 2013]. Disponível em: <<http://www.who.int/Leishmaniasis>>.