



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE DAS
FOLHAS DE *Krameria tomentosa*

Waléria Cristina Cardoso de Sousa Moraes

São Luís
2024

WALÉRIA CRISTINA CARDOSO DE SOUSA MORAES

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE DAS
FOLHAS DE *Krameria tomentosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Processos biológicos em saúde

Linha de Pesquisa: DOENÇAS INFECCIOSAS E ENDEMIAS NO MARANHÃO

Orientadora: Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva

Co-orientadora: Dra. Cláudia Quintino Rocha

São Luís
2024

Moraes, Waléria Cristina Cardoso de Sousa.

ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE
Krameria tomentosa./ Waléria Cristina Cardoso de Sousa Moraes – 2024.

94f. il.

Orientadora: Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva.

Co-orientadora: Dra. Cláudia Quintino Rocha.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde do
Adulto, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

1. Krameria tomentosa. 2. Atividade leishmanicida. 3. Atividade
antioxidante. I. Silva, Mayara Cristina Pinto da. II. Rocha, Cláudia Quintino.
III. Título.

CDU 582.738:615.283

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Erivânia Menezes Dutra - CRB 13-765

WALÉRIA CRISTINA CARDOSO DE SOUSA MORAES

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE DAS
FOLHAS DE *Krameria tomentosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Claudia Quintino Rocha (Co-orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Thiare Silva Fortes da Cunha (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore e nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. (Josué 1:9)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha profunda gratidão a Deus, cujo apoio constante tem sido o alicerce que sustenta minha jornada e me fortalece nos momentos mais desafiadores.

Agradeço especialmente à minha mãe, onde o apoio incondicional e dedicação foram essenciais para que eu alcançasse mais esta conquista. Sua presença constante e seu amor inabalável foram meu refúgio em todos os momentos.

A meu pai, que sempre foi um exemplo de confiança em meu potencial. Sua crença em mim e seu investimento em meu futuro foram fundamentais para minha trajetória.

Ao meu irmão e cunhada, pelo amor e orações foram uma fonte de inspiração e força para mim. Sua confiança em minha capacidade de alcançar meus objetivos foi um estímulo constante.

Às minhas tias, meu tio e primas, e sobrinhas que sempre estiveram ao meu lado, vibrando e torcendo por mim a cada conquista. Sua presença e incentivo foram verdadeiros tesouros ao longo desta jornada.

Agradeço de coração as minhas orientadoras, Mayara Cristina e Claudia Quintino, por sua dedicação, orientação e apoio inestimáveis ao longo deste trabalho. Sua sabedoria e mentoramento foram cruciais para meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos parceiros dos laboratórios LIF (Laboratório de Imunofisiologia), LPI (Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia), LAFIT (Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica) e LQPN (Laboratório de Química de Produtos Naturais), em especial aos amigos Luis Douglas, Louriane Nunes, Aldilene, Caroline Martins, Aline Santana, Josivan Regis, Arthur André e dona Sônia, agradeço por sua colaboração, apoio e contribuições indispensáveis para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores Marcelo Andrade, Socorro Cartagenes sou imensamente grata pelas valiosas orientações, sugestões e contribuições ao longo deste trabalho. A professora, Lucilene Amorim Silva pela parceria no LIF (Laboratório de Imunofisiologia).

Às minhas amigas Margarethe Penha, Camila, Fernanda Teixeira, Ribamar Junior, Luis Fernando, Caio, Hellen Nara, Lindinalva e Seu José do departamento de

pós-graduação, agradeço pelos momentos de descontração, conversas enriquecedoras, palavras de apoio, fé e incentivo. Sua amizade e companheirismo foram fontes de alegria e inspiração durante toda a jornada.

Por fim, expresso minha gratidão à Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto – UFMA, bem como às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMA, pelo apoio e oportunidades concedidas para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Introdução: As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmicas em muitos países. Os tratamentos atuais têm alta toxicidade e resistência parasitária crescente, exigindo novas soluções terapêuticas menos tóxicas. O objetivo deste estudo foi identificar os constituintes químicos do extrato e frações das folhas de *Krameria tomentosa* A. St.-Hil, bem como avaliar o efeito citotóxico do extrato e frações sobre as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis* (L.). **Métodos:** O extrato bruto (EB) e a fração acetato de etila (FAE) foram obtidos e caracterizados quimicamente. Foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos de carneiro e células imortalizadas da linhagem RAW, além de ensaios de toxicidade *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*. Também foram avaliadas a atividade leishmanicida (promastigotas e amastigotas), a morte celular (apoptose e necrose), a produção de óxido nítrico e a atividade antioxidante. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.). **Resultados:** Na análise do extrato bruto (EB) das folhas de *Krameria tomentosa* A.St.-Hil, foram identificadas 18 moléculas, a maioria das quais flavonoides. Resultado semelhante foi observado na caracterização da fração acetato de etila (FAE), na qual foram identificados 8 compostos, todos flavonoides. Quanto à atividade anti-Leishmania *in vitro* do extrato bruto e frações de *Krameria tomentosa*, observou-se citotoxicidade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. O índice de seletividade (IS) foi de 7.17 para a fração acetato de etila em promastigotas, e de 4.5, em amastigotas. O extrato e as frações não apresentaram toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Em relação à produção de óxido nítrico (NO), observou-se indução significativa tanto pelo extrato bruto quanto pela fração acetato de etila (FAE) em comparação ao grupo controle. **Conclusão:** Os resultados deste estudo indicam que o extrato hidroetanólico das folhas de *Krameria tomentosa* possui atividade leishmanicida efetiva contra *L. amazonensis*, especialmente nas frações acetato de etila e hexânica, que são ricas em flavonoides. Além disso, tanto o extrato bruto quanto a fração acetato de etila demonstraram atividade antioxidante significativa. Observou-se também que a morte celular induzida por apoptose foi mais prevalente do que por necrose em comparação ao grupo controle.

Palavras-chave: *Krameria tomentosa*. Atividade leishmanicida. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a neglected disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, endemic in many countries. Current treatments have high toxicity and increasing parasite resistance, requiring new, less toxic therapeutic solutions. The objective of this study was to identify the chemical constituents of the extract and fractions of the leaves of *Krameria tomentosa* A. St.-Hil, as well as to evaluate the cytotoxic effect of the extract and fractions on the promastigotes and amastigotes forms of *Krameria tomentosa* A. St.-Hil, as well as to evaluate the cytotoxic effect of the extract and fractions of the promastigotes and amastigotes of *Krameria tomentosa* A. St.-Hil. Leishmanicidal activity (promastigotes and amastigotes), cell death (apoptosis and necrosis), nitric oxide production and antioxidant activity were also evaluated. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.). Results: In the analysis of the crude extract (EB) of *Krameria tomentosa* A.St.-Hil leaves, 18 molecules were identified, most of which were flavonoids. A similar result was observed in the characterization of the ethyl acetate fraction (EAF), in which 8 compounds were identified, all flavonoids. Cytotoxicity against the promastigote forms of *L. amazonensis* was observed for the *in vitro* anti-Leishmania activity of the crude extract and fractions of *Krameria tomentosa*. The selectivity index (SI) was 7.17 for the ethyl acetate fraction in promastigotes and 4.5 for amastigotes. The extract and fractions did not show toxicity *in vitro* and. Regarding nitric oxide (NO) production, significant induction was observed both by the crude extract and by the ethyl acetate fraction (FAE) compared to the control group. Conclusion: The results of this study indicate that the hydroethanolic extract of *Krameria tomentosa* leaves has effective leishmanicidal activity against *L. amazonensis*, especially in the ethyl acetate and hexane fractions, which are rich in flavonoids. In addition, both the crude extract and the ethyl acetate fraction.

Keywords: *Krameria tomentosa*. Leishmanicidal activity. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Krameria tomentosa</i>	17
Figura 2 –	Mapa de registros de ocorrência de <i>Krameria tomentosa</i> A.St.-Hil em 2020 no Brasil.....	18
Figura 3 –	Esquema das rotas metabólicas que dão origem aos compostos fenólicos.....	21
Figura 4 –	Mapa geográfico de distribuição mundial da Leishmaniose Visceral Americana (a) e Leishmaniose Cutânea (b).....	23
Figura 5 –	Ciclo de vida dos parasitas <i>Leishmania</i>	25
Figura 6 –	Leishmaniose cutânea (lesão nodular).....	26
Figura 7 –	Estrutura química da Pentamidina.....	28
Figura 8 –	Cromatograma de íons totais obtidos no modo negativo para o extrato bruto (EB) hidroetanólico (70%) das folhas de <i>Krameria tomentosa</i>	41
Figura 9 –	Estruturas moleculares dos compostos encontrados no extrato bruto de <i>Krameria tomentosa</i>	44
Figura 10 –	Avaliação da caracterização química da Fração acetato de etila (FAE) das folhas de <i>Krameria tomentosa</i>	47
Figura 11 –	Atividade antioxidante pelos métodos ABTS E DPPH em cinco diluições do Extrato Bruto (EB) e Fração Acetato de Etila (FAE) das das folhas de <i>Krameria tomentosa</i>	49
Figura 12 –	Gráficos de viabilidade do extrato das folhas de <i>Krameria tomentosa</i> do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE) em 48 h em sete diluições.....	50
Figura 13 –	Percentual de hemólise do extrato bruto (EB) das frações acetato de etila (FAE) e (FH) do extrato das folhas de <i>K. tomentosa</i> em eritrócitos de carneiro.....	51
Figura 14 –	Taxa de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após injeção com o extrato bruto da folha de <i>Krameria tomentosa</i>	52
Figura 15 –	Taxa de sobrevivência de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> após injeção da fração acetato (FAE) de etila das folhas de <i>Krameria tomentosa</i>	53

Figura 16 – Porcentagem de células promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B) de <i>Leishmania amazonensis</i> necróticas, apoptóticas e viáveis após incorporação de brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA).....	55
Figura 17 – Porcentagem de células promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B).....	55
Figura 18 – Controle negativo (CN), celulaas viaveiais Controle positivo (CP) <i>Leishmania amazonensis</i> necróticas, apoptóticas e viáveis após incorporação de brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA)	56
Figura 19 – Marcação de células necróticas/apoptóticas com brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA). O experimento foi conduzido em quatro horas, após tratamento das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	57
Figura 20 – Determinação da produção de Óxido Nítrico no sobrenadante da cultura de células RAW tratadas com a concentração de 100µg/mL de (EB), Fração Acetato de Etila (FAE), Lipopolissacarídeo (LPS), Anfotericina B em 24 horas de cultivo	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Espécies que pertencem ao gênero <i>Krameria</i>	16
Quadro 2 –	Classificação taxonômica de <i>Krameria tomentosa</i> segundo (Simpson, 1989)	17
Quadro 3 –	Caracterização química do extrato bruto das folhas de <i>Krameria tomentosa</i> por Coromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS).....	42
Quadro 4 –	Caracterização química da fração acetato de etila (FAE) das folhas de <i>krameria tomentosa</i> por Coromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS).....	48
Quadro 5 –	Atividade antioxidante pelos métodos ABTS E DPPH concentração efetiva para reduzir em 50 % a concentração inicial do Radical ABT ou DPPH(EC50) do Extrato Bruto (EB) e Fração Acetato de Etila das das folhas de <i>Krameria tomentosa</i>	49
Quadro 6 –	Efeito do extrato de <i>Krameria tomentosa</i> nas frações do extrato bruto, hexânica, acetato de etila, e aquosa em 48 horas, nas formas amastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> e macrófagos RAW 264.7, expressos pela IC50 e CC50, respectivamente, seguido do I.S.....	53
Quadro 7 –	Efeito do extrato de <i>Krameria tomentosa</i> no extrato bruto e na fração acetato de etila, e aquosa em 48 horas, nas formas amastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> e macrófagos RAW 264.7, expressos pela IC50 e CC50, respectivamente, seguido do I.S.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anf B	– Anfotericina B
BE/LA	– Brometo de Etídio / Laranja de Acridina
CC50	– Concentração Citotóxica de 50% para as células
CO ₂	– Dióxido de carbono
DMSO	– Dimetil sulfóxido
EB	– Extrato Bruto
FAE	– Fração acetato de etila
FDA	– Federal Drug Administration
FH	– Fração hexânica
IC50	– Concentração Inibitória
IC50	– Concentração inibitoria de 50 %
LC	– Leishmaniose Mucocutânea
LCD	– Leishmaniose Cutânea Difusa
LT	– Leishmaniose Tegumentar
LV	– Leishmaniose Visceral
MTT	– (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)
OMS	– Organização Mundial da Saúde
OPAS	– Organização Pan-Americana da Saúde
PAHO	– PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION
PBS	– Tampão fosfato-salino
SFB	– Soro Fetal Bovino
UFMA	– Universidade Federal do Maranhão
WHO	– World Health Organization
µg/mL	– micrograma por mililitro
µL	– microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Plantas medicinais.....	15
2.2	O gênero <i>Krameria</i>	16
2.3	Espécie: tomentosa.....	17
2.4	Antioxidantes.....	19
2.5	Compostos fenólicos.....	20
2.6	Leishmanioses.....	21
2.7	Ciclo biológico.....	24
2.8	Leishmaniose Cutânea (LC).....	26
2.9	Tratamento.....	27
2.9.1	Anfotericina B.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Geral.....	29
3.2	Específicos.....	29
4	ARTIGO.....	30
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ANAIS	
	DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

As *leishmanioses* são doenças negligenciadas de grande importância para a saúde pública. Podem se apresentar como lesões cutâneas (Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA) ou como alterações orgânicas mais graves (Leishmaniose Visceral Americana – LVA) (Von Stebut, 2015; Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, no Brasil as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* são os principais agentes causadores da LTA (Carvalho *et al.*, 2019; Farias *et al.*, 2021).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização PanAmericana de Saúde (OPAS), no âmbito global, as leishmanioses situam-se como umas das dez principais doenças tropicais que sofrem descaso, sendo consideradas doenças negligenciadas. Elas são um grupo de doenças endêmicas que atingem 99 países, onde, 89 são endêmicos para leishmaniose cutânea (LC), 80 para leishmaniose visceral (LV) e 71 para ambas as formas clínicas (LC e LV) (PAHO, 2024).

Na Região das Américas, casos de LV foram notificados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, excluindo o Chile e as Ilhas do Caribe (OPAS, 2024). A LC e a LV estão presentes em um total de 21 países, sendo 19 endêmicos para LC e 13 países para LV. No período de 20 anos entre 2001 e 2021, a OPAS recebeu notificação de um total de 1.105.545 casos de LV e LC, com uma média anual de 52.645 casos. A LV, por sua vez, registrou 69.665 novos casos no mesmo período, com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade em torno de 8%, a mais elevada quando comparada a outros continentes (OPAS, 2023).

Em relação à leishmaniose visceral (LV), é conhecida popularmente como calazar que significa febre negra, também apresentando ampla distribuição mundial sendo caracterizada primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose. Os pacientes apresentam ainda hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Os principais fatores de risco para o óbito por LV envolvem complicações infecciosas e hemorragias, que pode ser evitado com a identificação precoce dos pacientes (Duarte; Badaró, 2009; Brasil, 2006).

Os parasitas responsáveis pela *leishmaniose visceral* são *Leishmania* (L.) *chagasi*, *Leishmania* (L.) *donovani* e *Leishmania* (L.) *infantum* (Almeida *et al.*, 2005).

As poucas opções terapêuticas disponíveis para essas doenças apresentam toxicidade e efeitos colaterais elevados, além de evidências de resistência (Roatt *et al.*, 2020). Com isso, a descoberta e desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos tornam-se de grande importância.

Neste contexto, espécies vegetais, a exemplo de espécie *Krameria tomentosa*, conhecida popularmente como carrapicho-de-cavalo, carrapicho, carrapicho-de-boi, ratainha-da-terra, ratânia do-Brasil, ratânia-da-terra, ratania, ratania-de-nova-granada, têm sido utilizada na medicina popular no combate de disenterias, estomatites, corrimentos vaginais, hemorroidas, hemorragias e afecções na boca. É nativa do continente sul americano e ocorrem no Brasil, Venezuela e Colômbia, sendo encontrada principalmente em solos arenosos (Agra *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2019). É amplamente distribuído no território brasileiro, podendo ser encontrada nas regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e no Nordeste, onde ocorre em todos estados (Simpson, 2015).

Silva *et al.* (2001) isolaram uma trinorneolignana inédita e outras quatro neolignanas já descritas para outras espécies. Madeiro (2012) a partir das técnicas de Espectroscopia no infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C unie bidimensionais, conseguiu identificar duas neolignanas inéditas, ottomentosa e sobralina, também foram isoladas as neolignanas eupomateoide 6, 2-(2',4'-diidroxifenil-5-(E)-propenilbenzofurano e diidrocarinatidina, relatadas pela primeira vez na família.

A espécie *Krameria tomentosa* vem sendo estudada por alguns pesquisadores o que a torna uma potencial fonte de novas drogas para o tratamento de doenças. Estudos demonstraram que o extrato de *Krameria tomentosa* (carrapicho-de-cavalo) possui vários constituintes químicos, principalmente da classe dos lignoides (Silva *et al.*, 2001; Madeiro *et al.*, 2012). Com base nisto, o presente trabalho se justifica pelo interesse estudar, em modelos *in vitro*, o efeito do extrato e frações das folhas da espécie vegetal *Krameria tomentosa* na infecção por *Leishmania amazonensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

O uso de produtos naturais tem sido um recurso ao alcance do ser humano desde a antiguidade (Pereira, 2022). Durante muito tempo, o homem empiricamente desfrutou da flora local para atender as necessidades primordiais, assim como na prevenção, tratamento e cura de enfermidades (Ferreira Neto; Santos; Tellis, 2022). No século XIX com o progresso científico na área da química, a fitoterapia teve o seu maior avanço, o que permitiu analisar, identificar e separar os princípios ativos das plantas (Rodrigues; Sobreira, 2020).

Com o progresso da tecnologia e da indústria farmacêutica, os fitoterápicos foram associados à crença popular e desprovidos de conhecimento científico (Silva; Siochetta; Berlezi, 2020). Entretanto, devido ao surgimento de efeitos colaterais e resistência por parte dos microrganismos, os fitoterápicos voltaram a ser alvo de interesse na área farmacológica e investigação científica, por apresentarem baixo valor econômico, boa aceitação pela população, menores índices de efeitos colaterais e melhor tolerância do paciente (Rogério *et al.*, 2021) (Torres, 2021).

Os fitoterápicos, atualmente, representam uma parcela significativa no mercado de medicamentos. Dados apontam uma taxa de crescimento anual de 15% no mercado nacional e estrangeiro (Kirchner *et al.*, 2022). Um dos fatores que contribuíram para este aumento foram os avanços na área científica permitindo o desenvolvimento de fitoterápicos seguros e eficazes (Silva; Pamponet, 2022). No Brasil foram implantadas várias políticas e programas relacionados a plantas medicinais e fitoterápicos, com o objetivo de associar o conhecimento popular com o científico. Dentre elas podemos citar a Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico, Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, entre outras (Barreto; Oliveira, 2022).

As propriedades terapêuticas dos produtos fitoterápicos ganham cada vez mais espaço devido às descobertas de novos compostos bioativos, presentes em espécies vegetais, que são eficientes no tratamento de diversas doenças. Esses compostos são divididos em diferentes classes de metabólitos secundários como

taninos, saponinas, alcaloides, compostos fenólicos flavonoides, dentre outros, que podem ser aplicadas na produção de fármacos. (Macuácuá, 2022).

2.2 O gênero *Krameria*

O gênero *Krameria* é formado por 18 espécies (quadro 1) herbáceas ou arbustivas que são predominantemente encontradas em regiões neotropicais e ecologicamente restritas a zonas áridas ou sazonalmente secas das Américas (Simpson *et al.*, 2004; Gimenes; Lobão, 2006; Giannini *et al.*, 2011). O centro primário de diversidade específica está localizado no México, onde ocorre o aparecimento de onze espécies, e o secundário no Brasil, com cinco espécies (Giannini *et al.*, 2009, 2011), podendo ser encontradas nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Simpson, 2015).

Quadro 1 – Espécies que pertencem ao gênero *Krameria*

<i>K. argentea</i>	<i>K. paucifolia</i>
<i>K. bahiana</i>	<i>K. revoluta</i>
<i>K. cistoidea</i>	<i>K. sonora</i>
<i>K. cytisoides</i>	<i>K. secundiflora</i>
<i>K. erecta</i>	<i>K. ramosíssima</i>
<i>K. grandiflora</i>	<i>K. spartioides</i>
<i>K. grayi</i>	<i>K. ixine</i>
<i>K. lanceolata</i>	<i>K. pauciflora</i>
<i>K. lappacea</i>	<i>K. tomentosa</i>

Fonte: Adaptado de Giannini *et al.* (2011)

Após ser registrado pela primeira vez por Loeffling em 1758, o gênero *Krameria* apresentou um problema para os taxonomistas. No início, foi colocado na família *Polygalaceae* por Jussieu (1789) e depois transferido para a família *Leguminosae* por Taubert (1892).

Quadro 2 – Classificação taxonômica de *Krameria tomentosa* segundo (Simpson, 1989)

Classificação taxônômica	
Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Orfem:	Polygalales
Família:	Kramereiaceae
Genero:	<i>Krameria</i>
Espécie:	<i>Tomentosa</i>

Fonte: Simpson (1989)

2.3 Espécie: tomentosa

Esta espécie apresenta-se como um arbusto de caule liso, estriado, glabro na parte inferior e pubescente na superior; folhas longa pecioladas (pecíolos com 3- 6 espinhos na base), elípticas, epinescentes no ápice, pubescentes; flores curto-pediceladas, grandes, de quatro sépalas e cinco pétalas, as duas superiores elípticas e as três inferiores espátulo-rombóides, dentadas no ápice, dispostas em racimos bracteados; brácteas e bracteolas tomentosas; ovário viloso; fruto de vagem globosa, unisperma, com numerosos espinhos e sedas rígidas (Simpson, 1989) conforme pode-se observa na figura 1.

Figura 1 – *krameria tomentosa*



Fonte: Costa-Lima (2020)

Do ponto de vista fitoquímico, já foram isoladas diversas substâncias neste gênero onde se destacam os lignoides (neo-lignoides e nor-neo lignoides) e taninos condensados (Simpson, 2007).

Alguns estudos fitoquímicos desta espécie foram realizados apenas como o descrito Por Silva *et al.* (2001) no qual foi possível isolar e elucidar uma trinorlignana inédita na literatura, além da identificação de outras quatro neolignanas. O outro estudo, realizado por Madeiro *et al.* (2012) Resultou no isolamento e elucidação de cinco neolignanas.

2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos, inibindo os efeitos negativos dos processos e reações que levam à oxidação de moléculas ou estruturas celulares (Prevedello *et al.*, 2021). Para um antioxidante ser considerado eficaz são necessárias algumas características, como por exemplo, ter a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical que seja de fácil absorção, caso seja adquirido de forma exógena (Lima, 2018).

As plantas constituem uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, que se difere em diversidade química e características biológicas (Lima *et al.*, 2021). Uma série de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, Alzheimer e Parkinson podem ter seu risco reduzido pela ingestão destes produtos. Esses benefícios são atribuídos aos metabólitos secundários presentes em diferentes partes das plantas, que apresentem atividade antioxidante (Pereira, 2022).

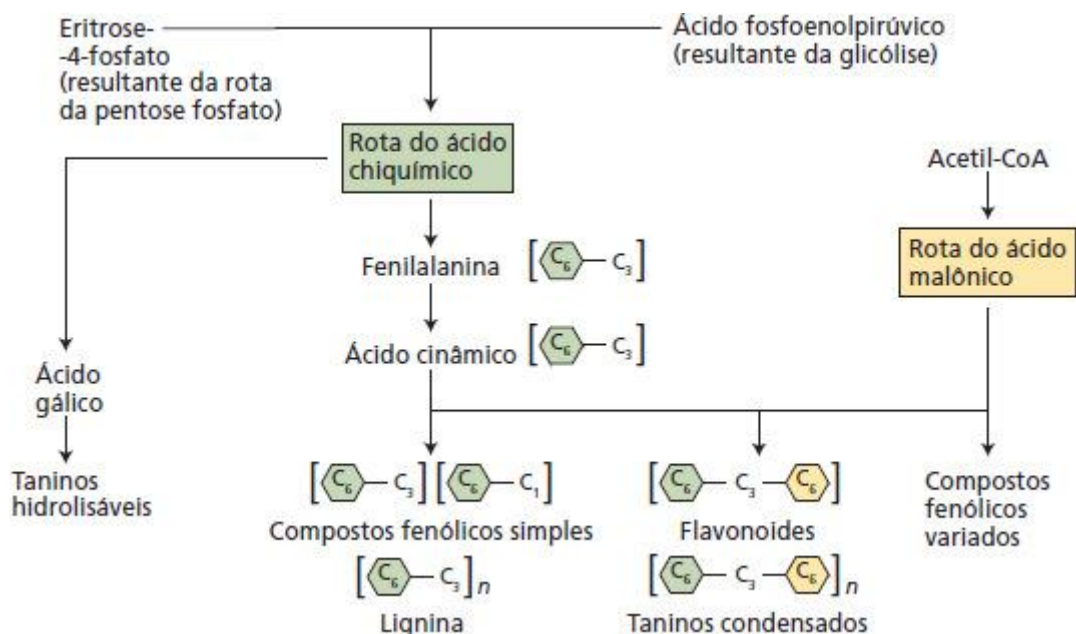
Compostos fenólicos, como flavonóides, quinonas, cumarinas, liganos e taninos são exemplos de metabólitos secundários, que atuam como antioxidantes, pois conseguem captar radicais livres, tais como hidroxila, peróxila e radicais superóxidos. Esse mecanismo ocorre através da transferência de átomos de hidrogênio e de elétrons, podendo interagir sinergicamente com outros antioxidantes. (Bzzo; Rezende, 2022); (Ebert *et al.*, 2021)

2.5 Compostos fenólicos

Ao longo dos anos, o interesse pelos compostos fenólicos vem aumentando bastante devido à propriedade antioxidante que essas substâncias apresentam em sequestrar radicais livres, os quais são extremamente prejudiciais à saúde humana (Alves; Neves; Costa, Neves *et al.*, 2008). Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que estruturalmente possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, incluindo seus grupos funcionais (Lee; Hong, 2005). Apresentam estrutura variável e por isso, são multifuncionais (Shahidi; Naczki, 1995). Esses compostos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, contribuindo para promover sabor, odor e coloração aos diversos vegetais, além de serem essenciais para o crescimento e reprodução destes (Simões *et al.*, 2007; Soares, 2002). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Bravo, 1998).

Já são conhecidos mais de 8000 compostos pertencentes a este grupo de moléculas, os quais podem ser encontrados em diversas partes das plantas, como nas sementes, frutos, folhas, casca, caule e também na raiz (Dreosti, 2000). Os compostos fenólicos apresentam grande diversidade de efeitos biológicos e podem ser divididos em duas categorias. A primeira está relacionada a sua estrutura-atividade, devido à presença do anel fenólico e hidroxilas, atuando como antioxidantes eficazes no sequestro de radicais livres e na inibição da oxidação em cascata, inibindo assim as reações oxidativas desses radicais com moléculas biológicas, como: lipídios, carboidratos, proteínas e DNA (Vattem; Shetty, 2005). A segunda está relacionada ao seu mecanismo de ação, que apresenta a capacidade de modular a fisiologia celular, tanto em níveis moleculares quanto bioquímicos/fisiológicos.

Figura 3 – Esquema das rotas metabólicas que dão origem aos compostos fenólicos



Fonte: Taiz; Zeiger (2004)

Os flavonoides representam um dos metabólitos secundários mais presente nas espécies vegetais, representando assim uma importante classe dos polifenóis. Possuem atividades terapêuticas com propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e antiviral. Para a identificação de flavonoides uma das técnicas utilizadas é a cromatografia por camada delgada que pode ser revelado com auxílio de reagentes específicos seguidos da observação da luz ultravioleta (Simões *et al.*, 2017).

Os taninos são polifenóis hidrossolúveis e de acordo com a estrutura química podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Plantas medicinais que apresentam taninos em sua composição química possuem propriedades terapêuticas utilizadas para tratamento de diarreia, queimaduras, feridas, problemas gástricos, renais e processos inflamatórios, além de possuir atividade farmacológicas bactericida, antivirais e fungicidas (Simões *et al.*, 2017).

2.6 Leishmanioses

As leishmanioses são caracterizadas como uma doença tropical e subtropical causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. A forma de transmissão aos humanos ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea do

flebotomíneo, em especial os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* sendo *Lutzomyia longipalpis* o vetor prevalente no Brasil (Torres-Guerreiro *et al.*, 2017; Campolina *et al.*, 2020). Durante esse processo, a forma infectante (promastigota) é fagocitada pelos macrófagos e no interior da célula se transformam na forma intracelular obrigatória (amastigotas), que conseguem se adaptar e sobreviver no fagolisossomo e consequentemente, se multiplicar e quando externalizados são capazes de infectar outras células (Von Stebut, 2015).

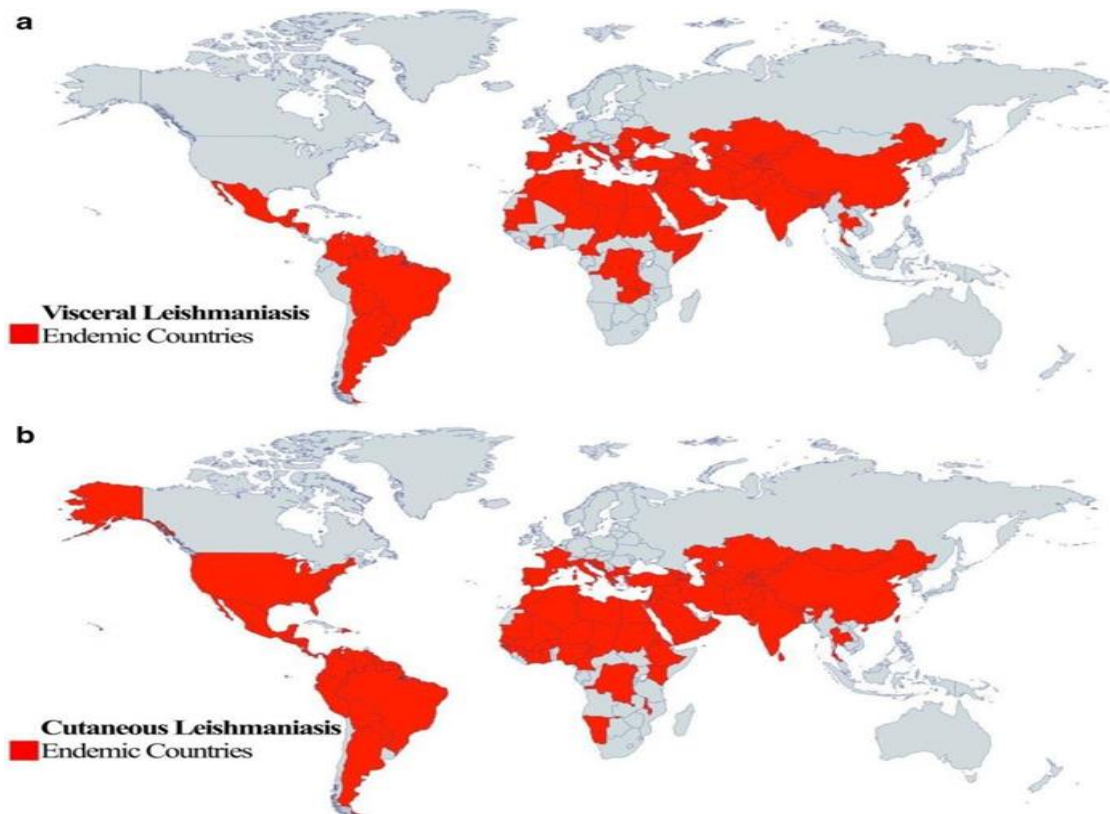
As manifestações clínicas estão relacionadas a alguns fatores como, a espécie causadora da doença e o aspecto imunológico do indivíduo, classificando-se de acordo com as duas formas clínicas apresentadas: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas na pele e nas mucosas, e Leishmaniose Visceral (LV), forma clínica mais grave e capaz de atingir órgãos como o baço e o fígado (Von Stebut, 2015; Rodrigues, 2022). A Leishmaniose Tegumentar Americana pode ainda apresentar-se nas formas de Leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e cutânea difusa (LCD).

Brasil está entre os países com mais de 90% dos novos casos de leishmaniose visceral e cutânea registrados pela OMS em 2020 (WHO, 2022). No período de 2001 a 2021, um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram notificados à OPAS, correspondendo a uma média de 52.645 casos por ano. No mesmo período, foram registrados 69.665 novos casos de leishmaniose visceral (LV), com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade de cerca de 8% – considerada a mais alta quando comparada a outros continentes (OPAS, 2023).

Os primeiros relatos de leishmaniose visceral no Brasil ocorreram em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu um caso ao encontrar o parasita em material obtido por necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. Penne em 1934, em lâminas de cortes histológicos de fígado, para o diagnóstico de febre amarela, de indivíduos das Regiões Norte e Nordeste. Posteriormente entre os anos 1936 e 1939, Evandro Chagas e colaboradores diagnosticaram o primeiro caso humano in vivo, demonstraram a doença em cães, sugeriram como provável vetor o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e nomearam o parasito *Leishmania chagasi*. A partir de 1953 a doença foi estudada em algumas regiões do País, principalmente Nordeste, ficando demonstrado seu carácter endêmico (Tortora; Funke; Case, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2018 94% do total de novos casos de *Leishmania* ocorreram em sete países: Brasil, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Etiópia e Sudão. É endêmica em 88 países, dos quais 72 são classificados como países em desenvolvimento. A LVA ocorre com maior prevalência na Índia, Nepal, Sudão, Brasil e Bangladesh, enquanto 91% da LC estão concentradas no Afeganistão, Irã, Síria, Brasil, Arábia Saudita e Peru conforme Figura 4: (Sasidharan; Saudagar, 2021).

Figura 4 – Mapa geográfico de distribuição mundial da Leishmaniose Visceral Americana (a) e Leishmaniose Cutânea (b)



Fonte: Adaptado de Sasidharan; Saudagar (2021)

Alguns fatores estão associados quanto aos números elevados de casos da doença, sendo observado a este fato que às populações humanas que possuem nível socioeconômico abaixo da média e vivendo em áreas periurbanas próximas a áreas florestadas. Esses ambientes não oferecem condições de saneamento adequadas, propiciando assim o aumento quanto a exposição humana aos vetores, aumentando os potenciais reservatórios e reduzindo a qualidade dos programas de controle epidemiológico (Valero; Uriarte, 2020).

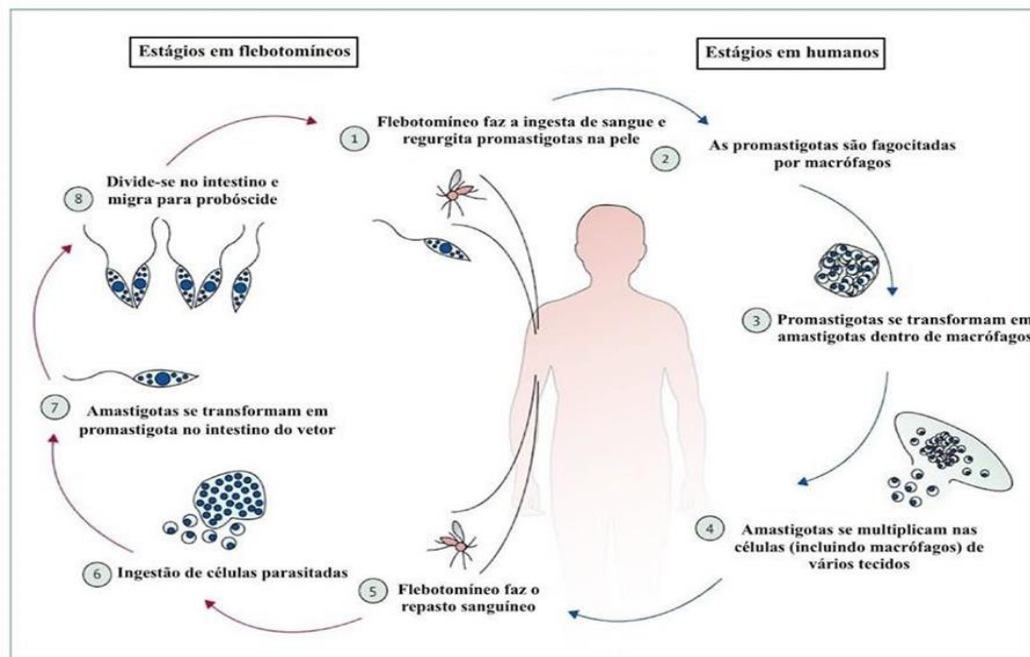
Mundialmente, a Leishmaniose está entre as 10 principais doenças tropicais negligenciadas, e atualmente tem afetado mais de 12 milhões de pessoas, sendo endêmica em 99 países, principalmente em regiões afetadas pela pobreza e problemas sociais ligados à saúde. Até o momento, o tratamento da Leishmaniose é prioritariamente medicamentoso e segue o esquema de tratamento estabelecido por cada país de acordo com as orientações da OMS e o contexto socioeconômico de cada localidade (OPAS 2023).

2.7 Ciclo biológico

O ciclo biológico destes parasitas é heteroxeno, desta maneira, divide-se em duas etapas: a primeira ocorre dentro do flebotomíneo fêmea (hospedeiro intermediário), que durante a picada ingere macrófagos infectados com a forma intracelular do protozoário, chamada de amastigota. Essas formas amastigotas fazem seu processo de reprodução por divisão binária, e no intestino do mosquito transformam-se em promastigotas (formas alongadas e flageladas), posteriormente em promastigotas metacíclicas, que é a forma infectante do protozoário. Seguido desses processos, ocorre a migração dos parasitos para a probóscide do mosquito transformam-se em promastigotas (formas alongadas e flageladas), posteriormente em promastigotas metacíclicas, que é a forma infectante do protozoário. Seguido desses processos, ocorre à migração dos parasitos para a probóscide do flebotomíneo, que serão inoculados durante o repasto sanguíneo (Logrado Júnior *et al.*, 2022).

A segunda fase ocorre dentro do hospedeiro vertebrado (hospedeiro definitivo), que após a picada recebe as promastigotas metacíclicas, elas são rapidamente capturadas pelos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear, e no meio intracelular diferenciam-se em amastigotas, multiplicando-se rapidamente até que a célula estoure. No processo de ruptura, outros macrófagos serão infectados e outros vetores serão contaminados no repasto sanguíneo, dando continuidade ao ciclo do parasita, conforme exposto na Figura 5 (Logrado Júnior *et al.*, 2022; Reithinger *et al.*, 2007).

Figura 5 – Ciclo de vida dos parasitas *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Reithinger *et al.* (2007)

Vários fatores podem influenciar na gravidade clínica da doença, entre eles a resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção e diversos polimorfismos genéticos ligados à imunidade (Rossi; Fasel, 2018). Nesse processo de combate à infecção, tanto a imunidade inata, quanto a adaptativa, desempenham um papel crucial na defesa do organismo, no entanto, esses protozoários desenvolveram mecanismos para burlar essa resposta e garantir sua sobrevivência (Pacheco-Fernandez *et al.*, 2021).

Primeiramente, logo após a entrada do parasito temos a atuação do sistema imune inato, que age concentrando o parasita no local na picada e reconhecendo o agente infeccioso através dos fagócitos e células apresentadoras de antígeno, que vão ativar a produção de citocinas e outros componentes inflamatórios para a destruição do patógeno (Oliveira *et al.*, 2021).

Podem ocorrer também desses parasitas serem capazes de atenuar a função de macrófagos, células dendríticas e outros diversos elementos para contra-atacar o sistema imune (Pacheco-Fernandez *et al.*, 2021).

Podendo assim ocorrer diferentes manifestações clínicas exigindo diferentes mecanismos farmacocinéticos dos fármacos atualmente utilizados (Berman, 2005).

Logo a ausência de vacinas e dificuldades em relação aos tratamentos convencionais, fortalece a necessidade de drogas mais efetivas ou descoberta de produtos naturais para substituir os mesmos ou suplementa-los de forma tratar a doença e seus respectivos sintomas e melhor a qualidade de vida do paciente (Rocha *et al.*, 2005).

2.8 Leishmaniose Cutânea (LC)

A leishmaniose cutânea ou tegumentar é a forma clínica da doença que afeta pele e mucosas, subdivide-se em: leishmaniose cutânea, mucosa, disseminada e difusa (Cincurá *et al.*, 2017). A forma cutânea é a mais comum desta patologia, ocorre quando a espécie do parasita em questão apresenta um tropismo por macrófagos na região da pele (Silva *et al.*, 2021), apresentando lesões circunscritas em áreas expostas da pele do hospedeiro, que surgem inicialmente na região da picada do mosquito, principalmente nos braços, pernas e rosto (Mokni 2019).

Essas lesões podem apresentar diferentes aspectos, dependendo da espécie de *Leishmania spp.* e da resposta imunológica do hospedeiro. Geralmente, apresenta-se inicialmente, com uma pequena pápula de caráter inflamatório, que raramente provoca prurido. Entretanto, com a evolução do quadro, é possível observar o aumento progressivo da lesão, até que alcance seu tamanho definitivo, tornando-se um nódulo ulcerado no centro, com demarcações precisas e de formato arredondado (Mokni 2019). Conforme figura 6.

Figura 6 – Leishmaniose cutânea (lesão nodular)



Fonte: Mokni (2019)

2.9 Tratamento

Até o momento, ainda não existem vacinas ou profilaxia medicamentosas para as Leishmanioses, o que torna o tratamento com fármacos a única opção, posto que, o controle do vetor não é uma ação eficaz.

O tratamento dessa doença varia de acordo com a situação econômica da região afetada e segue as diretrizes da OMS, sendo majoritariamente baseada no uso de fármacos (OPAS, 2023). Atualmente, para o tratamento da leishmaniose são utilizados cinco medicamentos: os Antimoniais Pentavalentes (antimoniato de meglumina, estibogluconato de sódio), Anfotericina B (desoxicolato de sódio, lipossomal), Miltefosina, Pentamidina e Paramomicina (Soni *et al.*, 2019). Vale ressaltar que essa terapia é um processo complexo, uma vez que, todas as opções de fármacos disponíveis no momento mostram limitações importantes, como a baixa eficácia terapêutica, alto custo de aquisição, difícil administração e alta toxicidade, todos esses fatores contribuem para a baixa adesão ao tratamento farmacológico (Santiago; Pita; Guimarães, 2021).

2.9.1 Anfotericina B

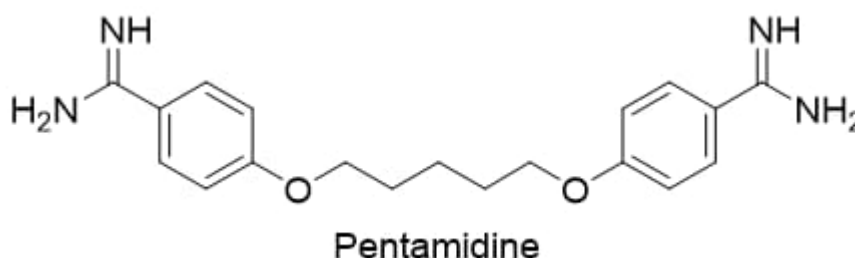
A Anfotericina B é um fármaco bastante utilizado como um agente antifúngico poliênico, apresentando também atividades anti-leishmania nas formas parasitárias, amastigotas e promastigotas. Sua aplicação é intravenosa e é constantemente indicada nos casos de LV, isto por causa do processo de resistência farmacológica e os efeitos adversos dos antimoniais (Soni *et al.*, 2019). Seu mecanismo de ação está ligado à sua afinidade por ergosterol, que está presente nas membranas plasmáticas (MP) da Leishmania, portanto a anfotericina liga-se a MP do parasita, formando poros e aumentando a permeabilidade, consequentemente isso gera uma perda de íons, efusão de líquidos e posterior morte do parasito (Santiago; Pita; Guimarães, 2021; Silva *et al.*, 2021). Porém a anfotericina B da mesma forma como acontece com Leishmania também possui a capacidade de ligar-se às membranas das células humanas, sendo esse fator responsável pela maioria de seus efeitos colaterais (Santiago; Pita; Guimarães, 2021). A toxicidade deste fármaco gera uma gama de efeitos adversos

como: febre, hipotensão, calafrios, miocardite, comprometimento das funções renais e hepáticas, o que limita seu uso no tratamento de alguns pacientes.

No entanto apesar de apresentar tais efeitos adversos citados um melhoramento na sua formulação com suplementação a base de lipídios levou a criação da Anfotericina B, única aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e que devido a sua formulação lipossômica, proporcionou a diminuição dos efeitos adversos com melhor biodisponibilidade e aumento da sua eficácia (Roatt *et al.*, 2020; Sasidharan; Saudagar, 2021).

Por conta das limitações dos tratamentos padronizados para leishmanioses atualmente presentes no mercado farmacêutico, tem havido um crescente interesse em e desenvolver estudar novas substâncias obtidas a partir de extratos vegetais que, são amplamente encontrados facilitando o acesso à população. Alguns produtos naturais são considerados uma importante fonte alternativa de novos agentes leishmanicidas (Bahmani *et al.*, 2015; Odonne *et al.*, 2017). Abaixo e possível observa a estrutura química da molécula do fármaco pentamidina figura 7.

Figura 7 – Estrutura química da Pentamidina



Fonte: Monzote (2011)

O Ministério da Saúde incentiva e compreende que a fitoterapia é um recurso terapêutico, pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas que compreende a abordagem denominada de Práticas Integrativas e Complementares (Brasil, 2018).

Com base nisso *Krameria tomentosa* tem sido relatada na literatura por suas recentes propriedades farmacológicas. (Madeiro *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Realizar estudo de atividade leishmanicida e antioxidante do extrato e da fração acetato de etila de *Krameria tomentosa* A. St.-Hil.

3.2 Específicos

- ✓ Realizar a caracterização química dos extratos e fração mais ativos;
- ✓ Investigar o efeito do extrato e da fração no crescimento parasitário e identificar a concentração inibitória (IC50) nas formas promastigotas e amastigotas;
- ✓ Determinar o Índice de Seletividade (SI);
- ✓ Avaliar a ação leishmanicida do extrato e da fração mais ativa sobre as formas amastigotas;
- ✓ Avaliar toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato e fração;
- ✓ Investigar atividade antioxidante dos extratos e fração.

4 ARTIGO

O artigo será submetido na revista **Anais de Academia Brasileira de Ciências** (Normas em anexo)

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTI-LEISHMANIA E IMUNOMODULADORAS FOLHAS DA ESPECIE VEGETAL *Krameria tomentosa* A. St.-Hil

Waléria Cristina Cardoso de Sousa Moraes

Claudia Quintino da Rocha

Mayara Cristina Pinto da Silva

Resumo

Introdução: As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmicas em muitos países. Os tratamentos atuais têm alta toxicidade e resistência parasitária crescente, exigindo novas soluções terapêuticas menos tóxicas. O objetivo deste estudo foi identificar os constituintes químicos do extrato e frações das folhas de *Krameria tomentosa* A. St.-Hil, bem como avaliar o efeito citotóxico do extrato e frações sobre as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania amazonensis* (L.). **Métodos:** O extrato bruto (EB) e a fração acetato de etila (FAE) foram obtidos e caracterizados quimicamente. Foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* utilizando eritrócitos de carneiro e células imortalizadas da linhagem RAW, além de ensaios de toxicidade *in vivo* em larvas de *Tenebrio molitor*. Também foram avaliadas a atividade leishmanicida (promastigotas e amastigotas), a morte celular (apoptose e necrose), a produção de óxido nítrico e a atividade antioxidante. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.). **Resultados:** Na análise do extrato bruto (EB) das folhas de *Krameria tomentosa* A.St.-Hil, foram identificadas 18 moléculas, a maioria das quais flavonoides. Resultado semelhante foi observado na caracterização da fração acetato de etila (FAE), na qual foram identificados 8 compostos, todos flavonoides. Quanto à atividade anti-Leishmania *in vitro* do extrato bruto e frações de *Krameria tomentosa*, observou-se citotoxicidade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. O índice de seletividade (IS) foi de 7.17 para a fração acetato de etila em promastigotas, e de 4.5, em amastigotas. O extrato e as frações não apresentaram toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Em relação à produção de óxido nítrico (NO), observou-se indução significativa tanto pelo extrato bruto quanto pela fração acetato de etila (FAE) em comparação ao grupo controle. **Conclusão:** Os resultados deste estudo indicam que o extrato hidroetanólico das folhas de *Krameria tomentosa* possui atividade leishmanicida efetiva contra *L. amazonensis*, especialmente nas frações acetato de etila e hexânica, que são ricas em flavonoides. Além disso, tanto o extrato bruto quanto a fração acetato de etila demonstraram atividade antioxidante significativa. Observou-se também que a morte celular induzida por apoptose foi mais prevalente do que por necrose em comparação ao grupo controle.

Palavras-chave: *Krameria tomentosa*. Atividade leishmanicida. Atividade antioxidante.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas de grande importância para a saúde pública. Podem se apresentar como lesões cutâneas (Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA) ou como alterações orgânicas mais graves (Leishmaniose Visceral Americana – LVA) (Von Stebut, 2015; Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, no Brasil as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* são os principais agentes causadores da LTA (Carvalho *et al.*, 2019; Farias *et al.*, 2021).

Deste esse último boletim do SINAN, ao último divulgado referente ao ano de 2019, houve um aumento no número de casos, 15.484, sendo predominante em indivíduos do sexo masculino e jovens (Brasil, 2021).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização PanAmericana de Saúde (OPAS), no âmbito global, as leishmanioses situam-se como umas das dez principais doenças tropicais que sofrem descaso, sendo consideradas doenças negligenciadas. Elas são um grupo de doenças endêmicas que atingem 99 países, onde, 89 são endêmicos para leishmaniose cutânea (LC), 80 para leishmaniose visceral (LV) e 71 para ambas as formas clínicas (LC e LV) (PAHO, 2024).

Dentre os 9 países que reportam 85% dos casos de LC, o Brasil, Colômbia e Peru estão incluídos na lista e quatro países, Índia, Sudão, Brasil e Quênia, concentram 68% dos casos de LV em todo o mundo. Na Região das Américas, casos de LV foram notificados desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, excluindo o Chile e as Ilhas do Caribe (OPAS, 2023). A LC e a LV estão presentes em um total de 21 países, sendo 19 endêmicos para LC e 13 países para LV. No período de 20 anos entre 2001 e 2021, a OPAS recebeu notificação de um total de 1.105.545 casos de LV e LC, com uma média anual de 52.645 casos. A LV, por sua vez, registrou 69.665 novos casos no mesmo período, com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade em torno de 8%, a mais elevada quando comparada a outros continentes (OPAS, 2023).

Em relação à leishmaniose visceral (LV), é conhecida popularmente como calazar que significa febre negra, também apresentando ampla distribuição mundial

sendo caracterizada primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose. Os pacientes apresentam ainda hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Os principais fatores de risco para o óbito por LV envolvem complicações infecciosas e hemorragias, que pode ser evitado com a identificação precoce dos pacientes (Duarte; Badaró, 2009; Brasil, 2006).

Os parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral são *Leishmania* (L.) *chagasi*, *Leishmania* (L.) *donovani* e *Leishmania* (L.) *infantum* (Almeida *et al.*, 2005).

As poucas opções terapêuticas disponíveis para essas doenças apresentam toxicidade e efeitos colaterais elevados, além de evidências de resistência (Roatt *et al.*, 2020). Com isso, a descoberta e desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos torna-se de grande importância. Neste contexto, espécies vegetais, a exemplo de espécie *Krameria tomentosa*, conhecida popularmente como carrapicho-de-cavalo, carrapicho, carrapicho-de-boi, ratainha-da-terra, ratânia do-Brasil, ratânia-da-terra, ratania, ratania-de-nova-granada, têm sido utilizada na medicina popular no combate de disenterias, estomatites, corrimentos vaginais, hemorroidas, hemorragias e afecções na boca. É nativa do continente sul americano e ocorrem no Brasil, Venezuela e Colômbia, sendo encontrada principalmente em solos arenosos (Agra *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2019). É amplamente distribuído no território brasileiro, podendo ser encontrada nas regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e no Nordeste, onde ocorre em todos estados (Simpson, 2015).

Silva *et al.* (2001) isolaram uma trinorneolignana inédita e outras quatro neolignanas já descritas para outras espécies. Madeiro *et al.* (2012) a partir das técnicas de Espectroscopia no infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C um e bidimensionais, conseguiu identificar duas neolignanas inéditas, ottomentosa e sobralina, também foram isoladas as neolignanas eupomateoide 6, 2-(2',4'-diidroxifenil-5-(E)-propenilbenzofurano e diidrocarinatidina, relatadas pela primeira vez na família

A espécie *Krameria tomentosa* vem sendo estudada por alguns pesquisadores o que a torna uma potencial fonte de novas drogas para o tratamento de doenças. Estudos demonstraram que o extrato de *Krameria tomentosa* (carrapicho-de-cavalo) possui vários constituintes químicos, principalmente da classe dos lignoides (Silva *et al.*, 2001; Madeiro *et al.*, 2012). Com base nisto, o presente trabalho

se justifica pelo interesse estudar, em modelos *in vitro*, o efeito do extrato e frações das partes aéreas da espécie vegetal *Krameria tomentosa* A. St.-Hil na infecção por *Leishmania amazonenses*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta da espécie vegetal, identificação botânica

As amostras das folhas de *Krameria tomentosa* A. St.-Hil, foram obtidas por coleta na região da chapada das mesas, localizada no município de Carolina, Maranhão, Brasil. Posteriormente uma exsicata foi enviada ao museu paraense Emilio Golldi para confirmação da espécie vegetal, esta catalogada com o numero MG: 231128 e registrada no SisGen (Sistema nacional de patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado) sob o código: AABBCA4 (Peixoto; Maia, 2013).

Preparo do extrato hidroetanólico

A amostra vegetal foi separada (600 g) e submetida à secagem em estufa com circulação de ar, em temperatura média de 38°C; seguida de trituração em moinho de facas, para obtenção de pó moderadamente grosso (tamanho inferior a 710 µm e superior a 250 µm) (ANVISA, 2010). Amostra do material seco e moído foi extraída por procedimentos extrativos a frio (percolação), com etanol a 70%, por período médio de 20 (vinte) dias. Nesta etapa de estudo foram definidas as variáveis dos hidromódulos, as relações de droga/solvente determinadas em função da percolação. Após o término da extração, foi filtrada, e parte do filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, e liofilizado para obtenção do Extrato Bruto (EB) obtendo-se o extrato bruto hidroalcoólico (3,5 g) e o restante acondicionado em frascos apropriados e mantidas em refrigeração até a realização dos ensaios. Para obtenção das frações Hexânica (FH), Acetato de Etila (FAE) e Aquosa (FA), o (EB) liofilizado foi dissolvido em água/metanol (7:3) e particionado com o solvente a ser obtido à fração (Barros-Neto; Scarminio; Bruns, 1995; Noriega *et al.*, 2012; Matos, 2009; Simões *et al.*, 2017; ANVISA, 2010).

Caracterização química do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE) das folhas de *krameria tomentosa* A. St.-Hil

O extrato bruto e a fração acetato de etila foram analisado por LC-MS em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific®. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Kinetex® C18 100 Å com poros de 5µm, e

dimensões de 4,6 x 100 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água, ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila mais ácido fórmico 0,1% (B), acrescentadas de ácido fórmico 0,1%, em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% de B em 12 minutos, em um fluxo de 1,0 mL/min.

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific®, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por electrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em múltiplos estágios (MSn), em uma interface do tipo ion-trap (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise de todos os espectros. As condições experimentais serão: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350°C, gás de arraste (N₂) e fluxo 60 (unidades arbitrárias).

A faixa de aquisição foi de m/z 100-2000, com dois ou mais eventos de varredura que serão realizados simultaneamente no espectro. A infusão de fluxo direto da amostra foi realizada num analisador do tipo Ion trap da Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Foi utilizado um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma tensão de pulverização de 5,00 kV, uma tensão capilar de 90 V, uma lente de tubo de -100 V e um fluxo de 5 µL min⁻¹. A análise completa de varrimento foi registada na gama m / z de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSn) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento será um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons nessa faixa m / z. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS / MS realizada utilizando uma varredura dependente de dados nas moléculas dos compostos de interesse com uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons de produto foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos.

Manutenção de macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos de linhagem murina RAW 264.7 (doados pelo Professor André Moraes Nicola do Laboratório de Biologia Molecular – UnB) foram mantidos em garrafas de cultivo celular estéreis com meio RMPI-1640 (SIGMA) contendo penicilina

(100 µg/mL), estreptomicina (100 U/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em estufa a 5% de CO₂ à 37 °C.

Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, *in vitro*

Para avaliar a citotoxicidade em células normais, macrófagos da linhagem RAW 264.7 (2×10^5 de células/mL) foram cultivados em placa de 96 poços, utilizando as mesmas concentrações testadas nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, em meio RPMI suplementado. O ensaio foi realizado em triplicata com volume final de 100µL por poço, e cultivado a 37°C e 5% de CO₂. Poços com células cultivadas somente em meio RPMI suplementado e DMSO a 1% foram usados como controle negativo. Poços com DMSO a 100% foram usados controle positivo. Após 48h, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT.

Ensaio de MTT

Para avaliar a viabilidade das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e dos macrófagos RAW 264.7 tratados com o extrato e frações de *K. tomentosa*, foi usado o ensaio de MTT. Este ensaio consiste na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difenil-brometo de tetrazólio (MTT), solúvel em água e de coloração amarela, em cristais insolúveis de formazan, de cor púrpura. A conversão ocorre em células viáveis e metabolicamente ativas, por meio da ação da enzima mitocondrial Succinato Tetrazolium Redutase. Assim, é possível quantificar as células vivas (Stockert *et al.*, 2018).

Em resumo, após o período de incubação, as placas foram centrifugadas, e o sobrenadante removido e substituído por 100 µL de meio específico contendo MTT (5 mg/ mL). Em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições de cultivos das células e na ausência de luz. Três horas depois, as placas foram centrifugadas e o formazan dissolvido em 100µL de DMSO. A absorbância foi medida usando com um leitor de placas (BioTek ELx800) a 540 nm. (Kumar *et al.*, 2018).

Teste de hemólise com eritrócitos de carneiro

A atividade hemolítica foi realizada seguindo a metodologia de Almaaytah e colaboradores (2014). Foram coletados 10mL de sangue de carneiro em um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), disponibilizado pelo biotério da Universidade Federal do Maranhão, o mesmo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa de Uso de Animais (CEUA), tendo recebido o seguinte parecer: PROCESSO n.23115.005441/2017-62. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, a

20°C. O plasma foi removido e os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato salina (PBS).

Para o extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE), fração hexânica (FH) foi preparado diferentes concentrações (50-0,39 mg/mL) que foram incubadas por 1 hora a 37°C em uma placa de 96 poços, com suspensão de eritrócitos e do extrato bruto e das frações das folhas de *Krameria tomentosa*.

Os controles positivo e negativo receberam 100 µL de Triton x-100 a 1% e PBS, respectivamente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 20°C. Foi retirado o sobrenadante (100 ou 150 µL), transferido para uma microplaca e suas absorbâncias medidas a 450 nm. A atividade hemolítica foi expressa em relação a ação do Triton x-100 e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{“Hemólise \% =” “Abs450/(EB, FAE, FH) - Abs450/PBS” / “Abs450/Triton - Abs450/PBS” X 100}$$

Onde: Abs450/OLB corresponde a amostra tratada com (EB, FAE, FH) de *K. tomentosa*; Abs450/PBS é a amostra tratada com PBS; e Abs450/Triton é a amostra tratada com Triton x-100.

Ensaio de toxicidade aguda in vivo com *Tenebrio molitor*

Aquisição e manutenção das larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* entre 10° e 12° estágio larval, foram adquiridas comercialmente através de fornecedores especializados e posteriormente mantidas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, sendo acondicionada em recipientes plásticos cobertos com tela ao abrigo da luz, contendo ração padronizada a base de farelo de trigo, milho e aveia, com temperatura controlada (27±30°C) e a umidade será mantida pela presença de um recipiente com água. As larvas que apresentarem alterações em sua cor ou motilidade serão descartadas e somente serão utilizadas nos ensaios aquelas com aspecto saudável (Souza *et al.*, 2015; Hierro *et al.*, 2020).

Ensaio de toxicidade in vivo (*Tenebrio molitor*)

O teste de toxicidade aguda foi realizado como descrito por Wang e Shi (2015) e Alves *et al.* (2015), com adaptações. A toxicidade aguda BF-CA foi avaliada empregando modelo in vivo da larva *Tenebrio molitor*. As larvas, que foram adquiridas e cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia (LIF/UFMA), com peso médio de 100 mg, foram distribuídas de forma randômica, em placas de petri em quatro grupos

teste nas concentrações de 1000; 500; 250 e 100 mg, e no grupo controle (PBS), contendo 15 larvas cada. Com o auxílio de uma seringa de insulina, foram inoculados 5 µL na região caudal das larvas do BFCA e do controle PBS. As larvas permaneceram em temperatura ambiente e a taxa de sobrevivência foi observada em intervalos de 24 h, durante 10 dias. Para estabelecer a morte das larvas, verificou-se visualmente a melanização e resposta aos estímulos físicos.

Atividade anti-*Leishmania in vitro*

Manutenção das formas promastigotas de *L. amazonenses*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1987/BA-125) foram cultivadas em meio Schneider (SIGMA), gentamicina (50 µg/mL) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO). A cultura foi mantida em incubadora de Demanda bioquímica de Oxigênio (BOD), à 27°C. Formas promastigotas na fase estacionária de crescimento (quatro dias de cultura) com motilidade flagelar foram usadas nos experimentos (Bezerra *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010).

Diferenciação das formas promastigotas em amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

Para obtenção das formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, foram utilizadas formas promastigotas ($5,0 \times 10^7$ /mL) em fase estacionária de crescimento. O cultivo foi feito em meio Schneider com pH 5,5 e suplementado com 5% de SFB e mantido a 32°C em estufa BOD por 96h. Ao final uma alíquota foi retirada para avaliação morfológica das formas amastigotas, através de coloração em Giemsa e análise microscópica (Suplementar 1) (Cysne- Finkelstein *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2002).

Teste de atividade Leishmanicida *in vitro* em formas amastigotas axênicas.

Inicialmente, foi realizada uma triagem com extrato bruto e frações de *K. tomentosa* para se avaliar o efeito sobre a proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos (5×10^7 células/mL) foram tratados com concentrações variando de 500 a 0,24 µg/mL, em triplicata, e cultivados por 48 horas, a 26°C, em um volume final de 100µL de meio Schneider suplementado. O controle negativo foi constituído de formas promastigotas cultivadas somente com meio Schneider suplementado e DMSO a 1%. A droga padrão, Pentamidina® (IC50 4

µg/mL), foi usada como controle positivo. Ao final, foi avaliada a citotoxicidade pelo ensaio de MTT.

A fração mais ativa foi posteriormente utilizada para avaliar sua atividade sobre as formas amastigotas axênicas. Os parasitos (1×10^6 /poço) foram tratados com concentrações seriadas (125 a 3,9 µg/mL), em triplicata, e cultivados por 24 horas à 32°C em meio Schneider suplementado e com pH de 5,5. Formas amastigotas somente em meio Schneider suplementado e DMSO a 1% foram usadas como controle negativo. Pentamidina (50 a 1,56 µg/mL) foi usada como controle positivo. Ao final, foi avaliada a citotoxicidade pelo ensaio de MTT.

Ensaio de morte celular via marcação por Brometo de Etídio / Laranja de Acridina (BE/LA).

As formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas em Placas de 96 poços nos tempos de 4h e 24h com os valores de IC₅₀ do EB de *K. tomentosa*, do (EB) e da (FAE) foram obtidos nas formas promastigotas, tendo como controle positivo a Pentamidina® (IC₅₀ 4 µg/mL) e controle negativo apenas os parasitos em meio Schneider suplementado. Após os períodos de incubação, as placas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 100 µl da solução de corante BE/LA (20µg/mL), ficando em contato por 10 minutos.

Após esse período, a placa foi novamente centrifugada e as leishmanias ressuspensas em 100µl de PBS, do qual foi retirado 20 µl para a confecção das lâminas que, após secas foram analisadas no microscópio invertido de fluorescência de marca Nikon modelo Eclipse Ti-U com aumento de 20x. Foi feita a quantificação de 100 parasitos classificados em viáveis (núcleo normal e cromatina verde com estrutura organizada), apoptóticos (cromatina condensada ou fragmentada, verde ou laranja) e necróticos (cromatina laranja chegando ao vermelho) com base na captação de BE (fluorescência vermelha) e LA (fluorescência verde) (Riblle *et al.*, 2005).

Determinação da Produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico será determinada no sobrenadante de culturas de células de baço, ou de células peritoneais, segundo descrito anteriormente por Ding; Nathan e Stuer (1988).

Avaliação da atividade antioxidante

Método de sequestro do radical livre *DPPH*•

Neste ensaio a atividade sequestradora de radicais livres foi medida usando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich) (Blios, 1958). Trata-se de um dos métodos mais utilizados em ensaios de atividade antioxidante em amostras vegetais. O DPPH é um radical livre de coloração roxa, caracterizado por uma banda de absorção a 517 nm. Se a amostra apresentar um antioxidante, este ao reagir com o radical DPPH, vai reduzi-lo resultando numa alteração da cor roxa para amarela.

Uma alíquota de 250µL de solução de DPPH (1mM) foi misturada com 40µL de diferentes concentrações da amostra (5 – 100µg/mL). Trinta minutos mais tarde, a absorbância foi medida a 517nm. O Ácido Gálico (Sigma-Aldrich) foi utilizado como o composto de controle positivo. A atividade sequestradora de radicais livres foi calculada usando a seguinte fórmula: $[DPPH] (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100$, onde: A_c = controle de absorção; A_s = Absorbância da Amostra. (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995)

Método do ABTS

Neste ensaio a atividade de radical livre das amostras foi medida em termos de hidrogênio doado usando o ABTS radical estável (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) segundo o método de adaptado de Re *et al.*, 1999. Foi utilizado 20 µL da amostra e 250 µL da solução reagente ABTS (30 mg do ABTS, 379,4 mg de persulfato de Potássio e 0,137 mL de solução de persulfato). Foi realizada leitura por espectrofotômetro (734 nm) após 6, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos de incubação. O resultado foi expresso em Percentagem de inibição. O cálculo da porcentagem de inibição foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{(\text{Abs controle})} \times 100$$

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias com experimentos realizados em triplicata.

Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc.). A determinação da concentração inibitória 50% (IC50) para as formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e a concentração citotóxica 50% (CC50) para os macrófagos RAW 264.7 foi realizada por meio de uma regressão não linear. As concentrações foram transformadas em Log(x) e as densidades ópticas (DO) normalizadas para determinar a viabilidade relativa (%),

em razão das do controle negativo. Os valores de IC50 e a CC50 foram obtidos por meio de uma curva sigmoidal. Posteriormente foi determinado o Índice de Seletividade (I.S.) através da razão entre os valores das CC50 e das IC50 do extrato ou frações.

Para avaliar a via de morte, inicialmente, a normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Como todas as variáveis foram consideradas paramétricas, a diferença no percentual médio de células mortas entre os grupos foi determinada através de uma variância (ANOVA) one-way com um pós-teste de Tukey. Para comparar o tipo de morte celular (apoptose ou necrose), uma ANOVA Two-way com um pós-teste de Tukey foi utilizado. Valores $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

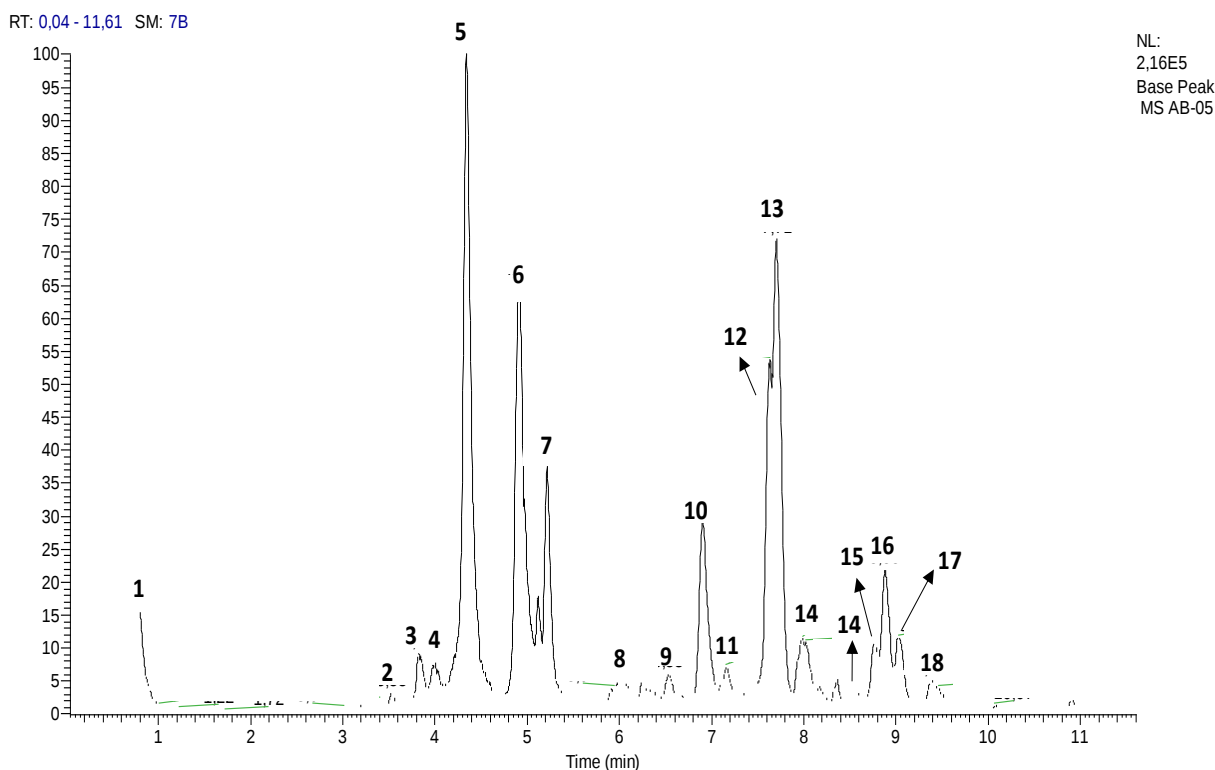
Avaliação da caracterização química do extrato bruto (EB) e fração acetato de etila das folhas de *krameria tomentosa*

A identificação dos diferentes compostos do extrato hidroalcoólico foi realizada mediante comparação com a literatura, considerando seus tempos de retenção, espectros no UV e fragmentos obtidos na Espectrometria de Massas. A Figura 8 ilustra o cromatograma das folhas de *Krameria tomentosa*, exibindo uma ampla faixa de massa, possibilitando uma varredura completa com todos os íons produzidos.

A partir desses dados, foram identificadas substâncias desconhecidas, uma vez que esse método proporciona a obtenção de espectros completos das moléculas e um máximo de dados qualitativos. A elucidação das moléculas ocorre por meio da análise das junções dos picos bases e de suas fragmentações específicas.

E possível observar detalhadamente o cromatograma compostos encontrados no (E.B) conforme observado na Figura 8.

Figura 8 – Cromatograma de íons totais obtidos no modo negativo para o extrato bruto (EB) hidroetanólico (70%) das folhas de *Krameria tomentosa*



Fonte: Autoria própria (2024)

É possível observar detalhadamente a composição química encontrada no extrato bruto (EB) das folhas de *K. tomentosa*, bem como a classe de metabólitos mais predominantes na amostra, que são os flavonoides e os taninos.

Isso pode ser facilmente verificado no quadro 3 abaixo, onde são listados os compostos identificados no extrato bruto, juntamente com suas classes de metabólitos correspondentes. A análise desses dados proporciona uma compreensão mais aprofundada da composição química da amostra e dos principais grupos de compostos presentes nela.

Quadro 3 – Caracterização química do extrato bruto das folhas de *Krameria tomentosa* por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS)

Metabolitos	Pico	RT	M-H	M-I	Composto
Ácido fenólico	1	0,86	353	249; 191	Ácido 5-o-cafeoilquímico
Ácido fenólico	2	3,55	191	163	Ácido químico
Tanino	3	3,83	865	577; 289	Procianidina C2
Tanino	4	4,0	1153	863; 577; 289	Tetrâmero de Prociamidina
Tanino	5	4,28	577	425; 289	Dímero de Procianidina B7
Tanino	6	4,91	1441	1153; 865; 575; 289	Pentamers de Procianidina
Tanino	7	5,13	739	577; 289	Prociadinina B3-7-glucosídeo
Tanino	8	6,02	1439	1027; 863; 575; 449; 300	Pentamérico Procianidina A
Tanino	9	6,51	575	447; 300	Procianidina A1
Flavonoide	10	7,17	609	463; 30	Rutina
Catequina	11	7,62	433	300; 271; 255	Naringenina-7-O-glucosídeo
Flavonoide	12	7,69	447	433; 300; 271; 243	Lutedina-7-O-glucosídea
N.I	13	7,94	1187	919; 593; 285	n.i
Flavonoide	14	7,94	593	575; 285	Kaempferol-3-O-β-D-galactosídeo-7-O-α-L-raminosídeo
Flavonoide	15	8,76	615	593; 284; 255	Quacetina-7-(6"-galoilglicosídeo)
Flavonoide	16	8,86	593	447; 284; 227	Kaempferol-7-neohesperosídeo
Flavonoide	17	9,05	615	593; 429;	Quercetina 4'-(6"-

				284	galoilglicosídeo)
Flavonoide	18	9,36	447	295; 285; 175	Kampferol-O-glicosideo

Fonte: Autoria própria (2024)

Observam-se também as estruturas moleculares dos compostos encontrados no extrato bruto (EB) de *Krameria tomentosa*, incluindo os compostos 5 (Dímero de Procianidina B7), 6 (Pentamers de Procianidina). Vale ressaltar que o composto 13 não foi possível ser elucidado, pois acredita-se que se trata de contaminates presentes na amostra.

É importante ressaltar que todos os 18 compostos presentes na amostra do extrato bruto de *Krameria tomentosa* (E.B), se tratam de compostos fenólicos, conforme descrito na literatura, e são conhecidos por serem ricos em atividade antioxidante.

Essa análise estrutural contribui significativamente para uma compreensão mais abrangente da composição química e das propriedades bioativas do extrato bruto (E.B) dessa espécie vegetal.

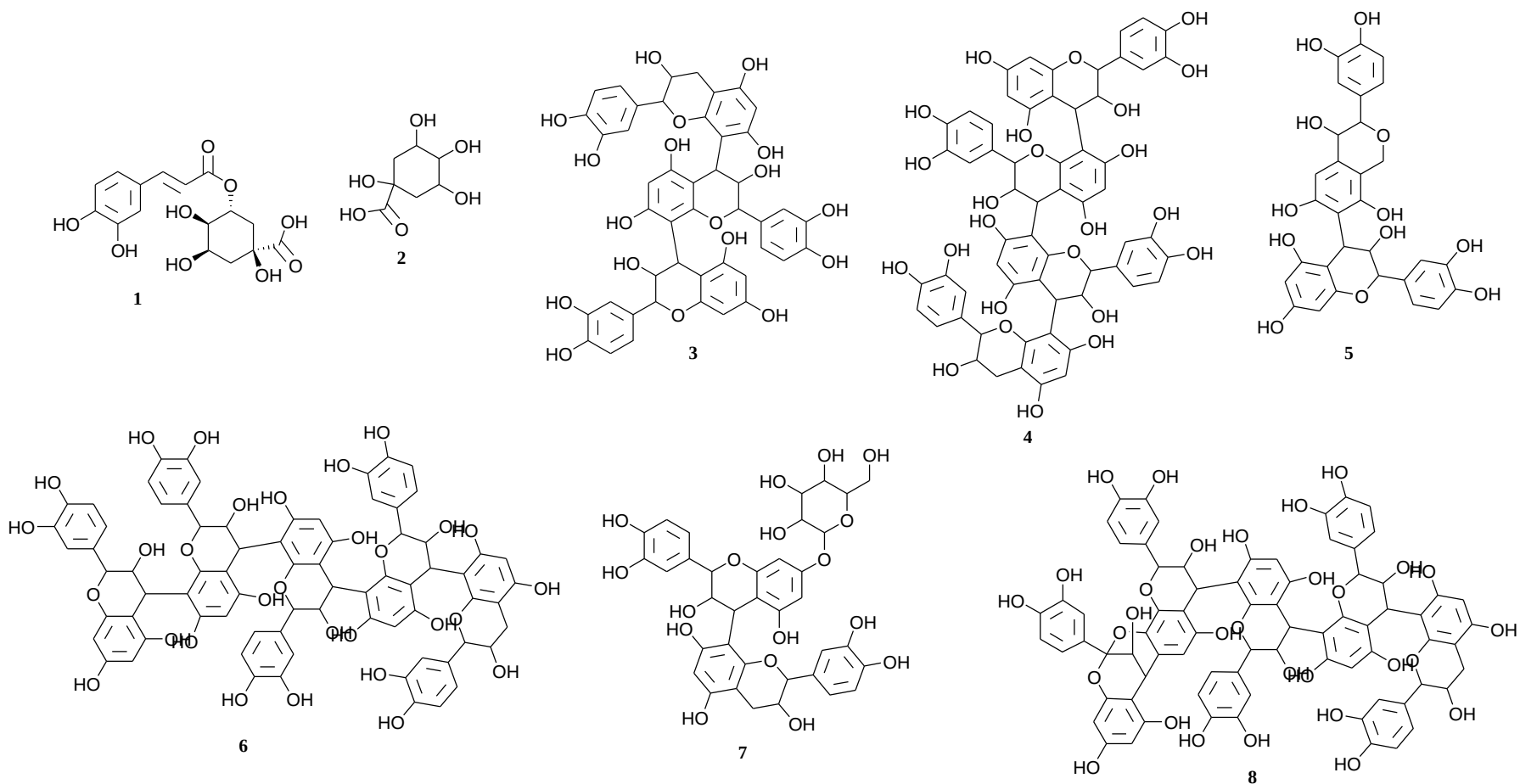
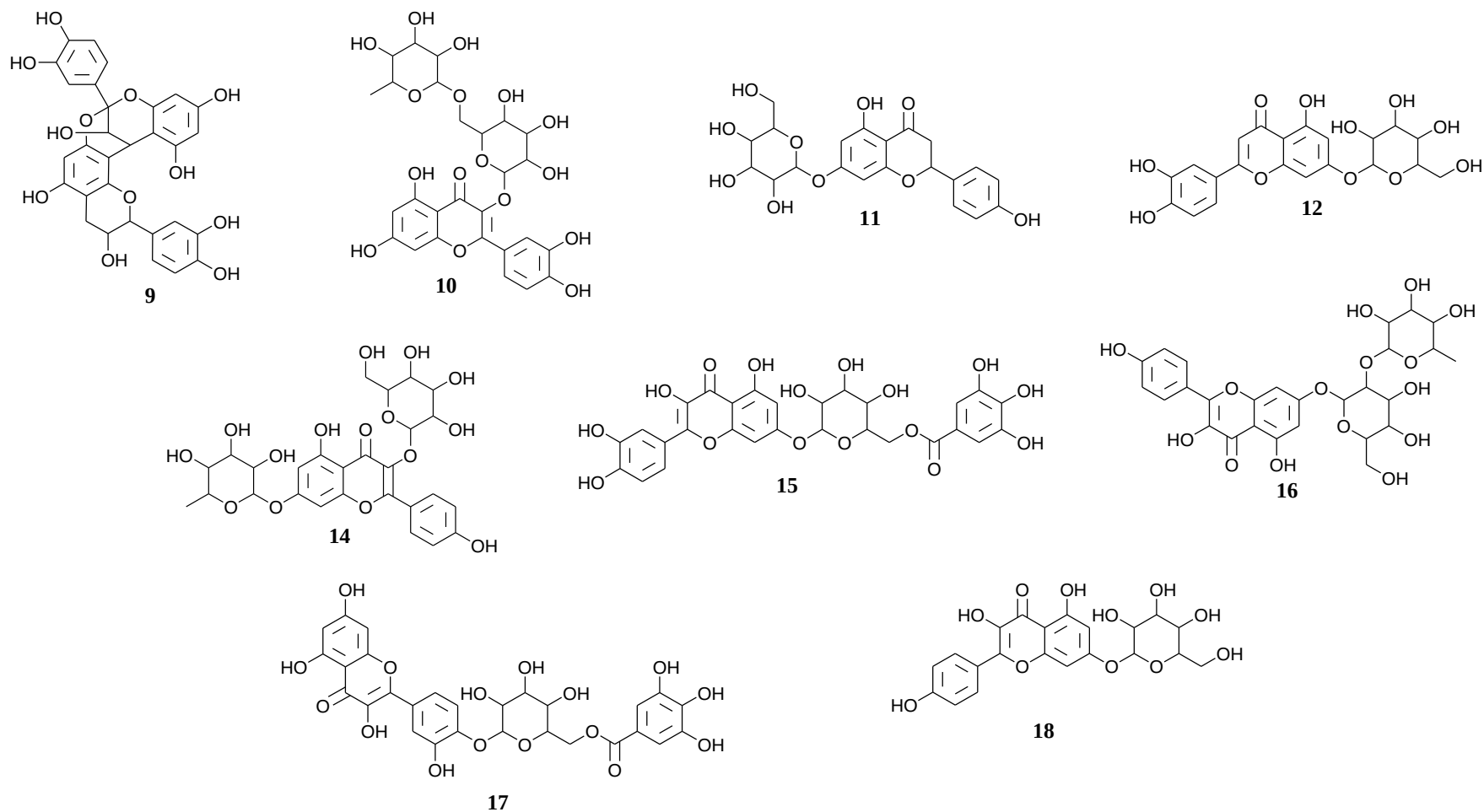
Figura 9 – Estruturas moleculares dos compostos encontrados no extrato bruto de *Krameria tomentosa*

Figura 9 – Estruturas moleculares dos compostos encontrados no extrato bruto de *Krameria tomentosa* (continua)



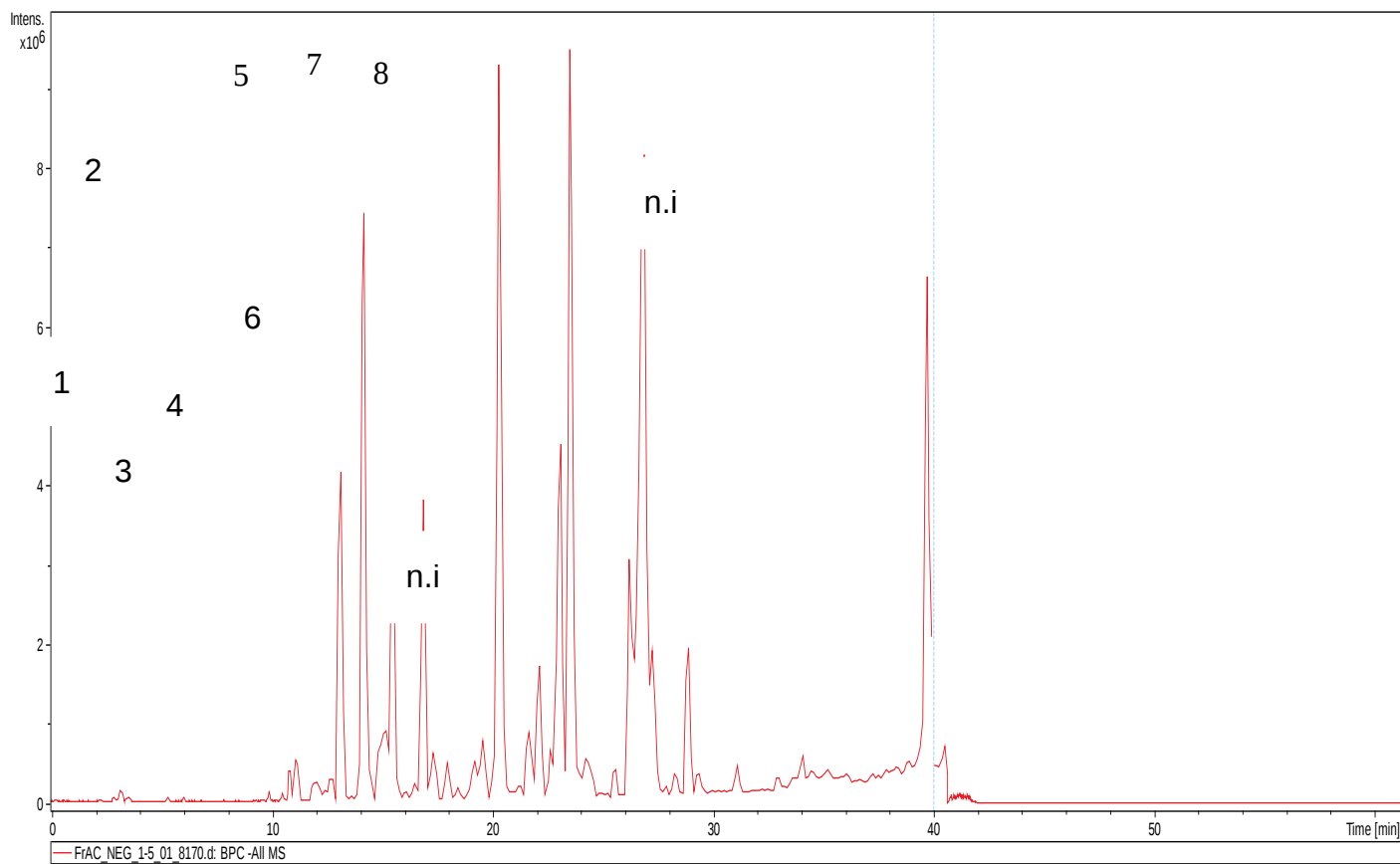
Fonte: Autoria própria (2024)

Através da caracterização química da fração acetato de etila (FAE) foi possível a identificação de 8 compostos químicos por meio de análises por CG-EM. Vale ressaltar que as substâncias 9 e 10 respectivamente não puderam ser elucidadas pois se tratam de detritos presentes na amostra durante a leitura. É possível observar de forma mais clara os compostos químicos encontrados na (FAE) conforme observado no quadro 4.

Entre os compostos identificados na fração acetato de etila (FAE), destacam-se o Quercetina-O-deoxihexosídeo, Quercetina-galoil-hexosídeo e Ácido cafeoilquímico, que são compostos amplamente encontrados na amostra analisada. Esses resultados são semelhantes aos obtidos no cromatograma do extrato bruto (EB) das folhas de *Krameria tomentosa*, conforme ilustrado no quadro 4 e na Figura 10.

Esses achados corroboram com a composição química observada no extrato bruto (E.B), indicando uma presença semelhante dos compostos identificados tanto na fração acetato de etila (FAE), quanto no extrato bruto (E.B). A análise detalhada desses compostos é fundamental para compreender as propriedades e potenciais aplicações terapêuticas da fração acetato de etila da *Krameria tomentosa*.

Figura 10 – Avaliação da caracterização química da Fração acetato de etila (FAE) das folhas de *Krameria tometosa*



Fonte: Autoria própria (2024)

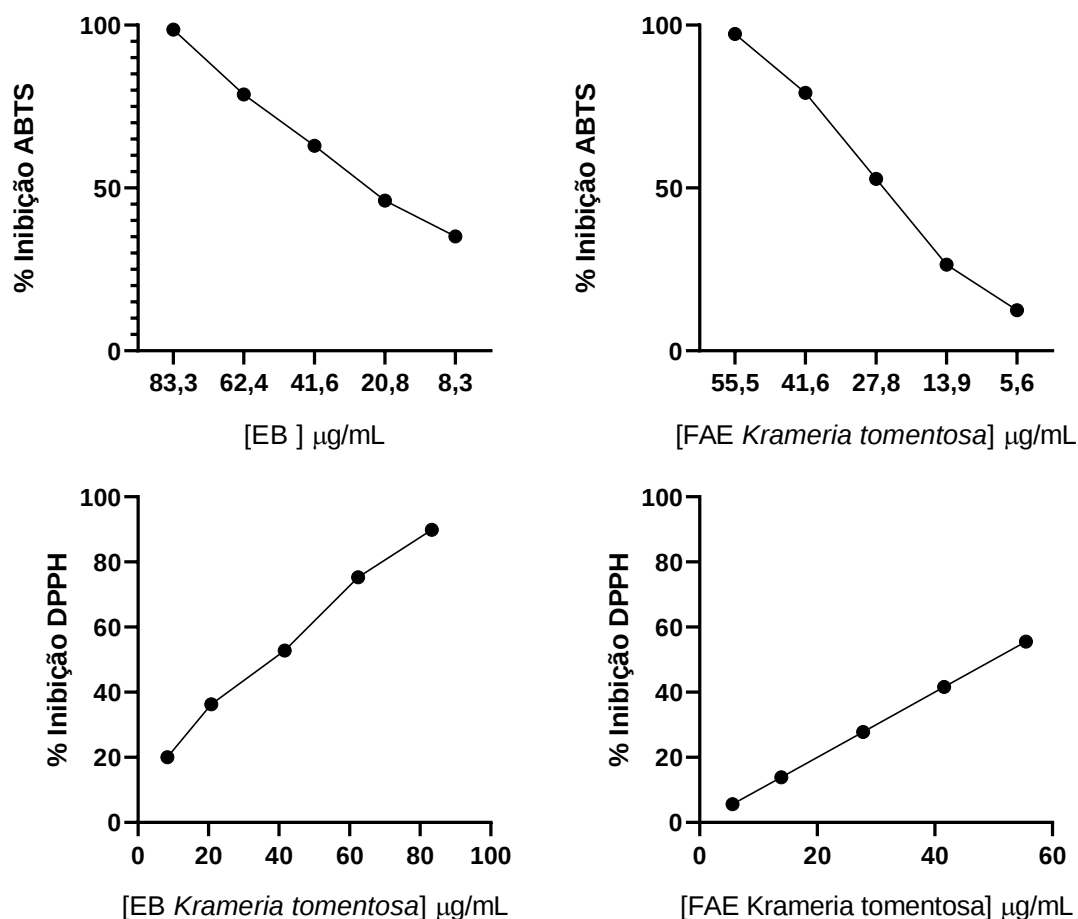
Quadro 4 – Caracterização química da fração acetato de etila (FAE) das folhas de *krameria tomentosa* por Coromatografia Líquida Acoplada á Espectrometria de Massas (LC-ESI/MS)

Metabolito	Pico	RT	M-H	M-I	Composto
Tanino	1	13,2	577,23	276.30;343.20;385.68	Procianidina tipo B-dimero
Ácido fenólico	2	14,3	553,15	84.68;126.93;173.63;192.92	Ácido cafeoilquimico
Ácido fenólico	3	16,9	515,23	376,80	Ácido 3,5- dicafeoiquinico
Ácido fenólico	4	17.,0	515	400	Ácido 3,5- dicafeoiquinico
Ácido fenólico	5	20,4	353,16	173.43;192.07; 356,30	Ácido cafeoilquimico
Flavonoide	6	23,1	433,17	303.84	Quercetina raminosidea
Flavonoide	7	23,5	447.20	302.91;449.07	Quercetina -O- deoxihexosideo
Flavonoide	8	27,9	615.19	288.69 e 432.30	Quercetina- galoil- hexosideo

Fonte: Autoria própria (2024)

Conforme observado no quadro 4, na (FAE) foi possível identificar um resultado semelhante ao extrato bruto no que se refere a indendificação dos compostos presentes na amostra, onde todos os compostos de tratam de fenóis com destaque para flavonoides e taninos.

Figura 11 – Atividade antioxidante pelos métodos ABTS E DPPH em cinco diluições do Extrato Bruto (EB) e Fração Acetato de Etila (FAE) das das folhas de *Krameria tomentosa*.



Fonte: Autoria própria (2024)

Quadro 5 – Atividade antioxidante pelos métodos ABTS E DPPH concentração efetiva para reduzir em 50 % a concentração inicial do Radical ABT ou DPPH(EC50) do Extrato Bruto (EB) e Fração Acetato de Etila das das folhas de *Krameria tomentosa*

AMOSTRAS	EC50 ABTS μg/mL	EC50 DPPH μg/mL
EB	26,69	38,05
FAE	26,77	34,57
Quercetina	2,9	3,44

Fonte: Autoria própria (2024)

De acordo com a Figura 20 e quadro 8, foi observada uma EC50 de 26,7 pelo método ABTS tanto para EB como para FAE e EC50 de 38,05 e 34,57 pelo método

DPPH resultados estes bem similares tanto para o extrato bruto quanto para a fração acetato de Etila.

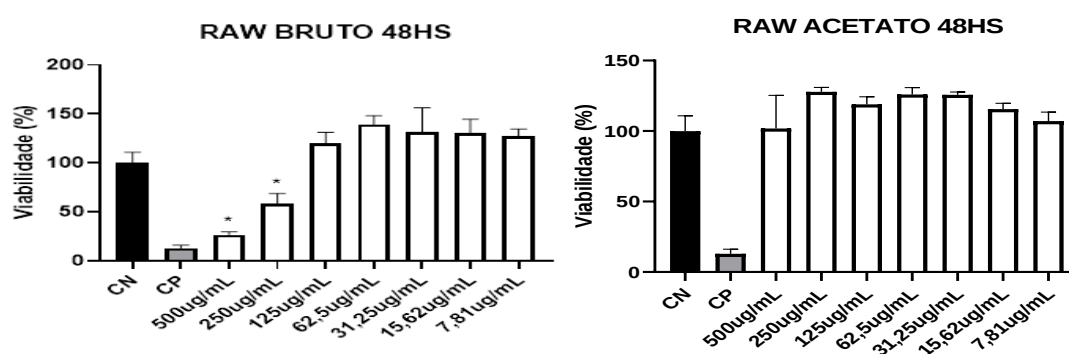
Tanto o extrato bruto (EB) quanto à fração acetato de etila (FAE) das folhas de *Krameria tomentosa* demonstraram evidências de sua capacidade antioxidante, indicando que a espécie pode ser uma promissora fonte de antioxidantes naturais.

Ensaio de citotoxicidade em células RAW

Avaliamos os efeitos do extrato bruto (EB) e das frações acetato de etila (FAE), aquosa (FA) e hexânica (FH) sobre a viabilidade de macrófagos RAW 264.7. Observamos que tanto o EB quanto a FH demonstraram toxicidade para os macrófagos nas duas primeiras concentrações testadas, 500 e 250ug/mL. A fração aquosa (FA) mostrou-se citotóxica apenas na primeira concentração avaliada. Por outro lado, a fração acetato de etila (FAE) não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações utilizadas.

Esses resultados destacam a importância de avaliar a citotoxicidade das diferentes frações do extrato da *Krameria tomentosa*, pois mostram que a FAE pode ser uma opção promissora para estudos futuros, devido à sua falta de toxicidade em concentrações testadas.

Figura 12 – Gráficos de viabilidade do extrato das folhas de *Krameria tomentosa* do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE) em 48 h em sete diluições



Fonte: Autoria própria (2024)

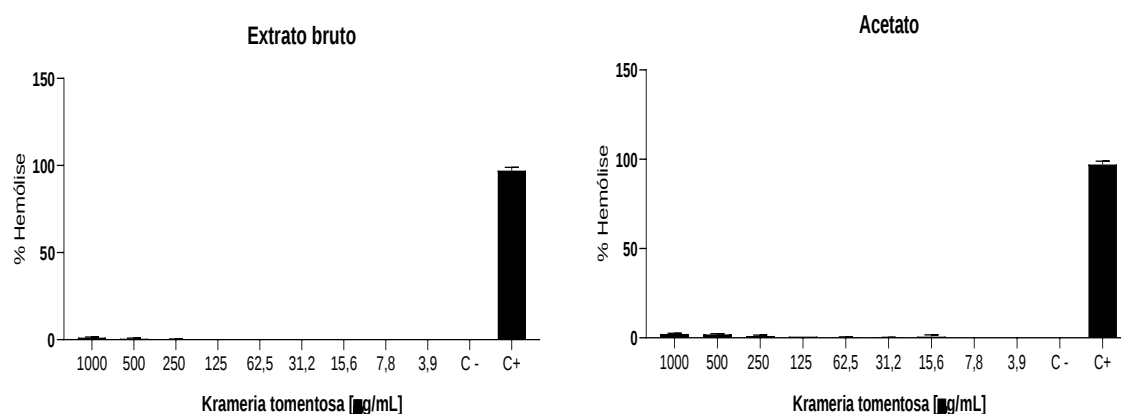
Ensaios de hemólise com hemácias de carneiro extrato bruto (EB) fração acetato de etila (FAE) e fração hexânica (FH) das folhas de *krameria tomentosa*.

Foi avaliado o efeito tóxico das frações acetato de etila, extrato bruto e fração hexânica das folhas de *Krameria tomentosa* em eritrócitos de carneiro por meio do ensaio *in vitro* da atividade hemolítica. Observou-se que não houve citotoxicidade no

extrato bruto e na fração acetato de etila nas concentrações de 500, 250 125, 62,5, 31,25, 15,62 e 7,81mg/mL.quando comparado ao controle positivo, como ilustrado na Figura 12.

Esses resultados indicam que o extrato bruto apresenta potencial citotóxico em relação aos eritrócitos de carneiro, enquanto as outras frações (acetato de etila e extrato bruto) não demonstraram atividade hemolítica significativa nas concentrações testadas. Essas informações são importantes para avaliar o perfil de segurança das frações da *Krameria tomentosa* e podem influenciar considerações sobre sua utilização em aplicações terapêuticas.

Figura 13 – Percentual de hemólise do extrato bruto (EB) das frações acetato de etila (FAE) e (FH) do extrato das folhas de *K.tomentosa* em eritrócitos de carneiro.



Fonte: Autoria própria (2024)

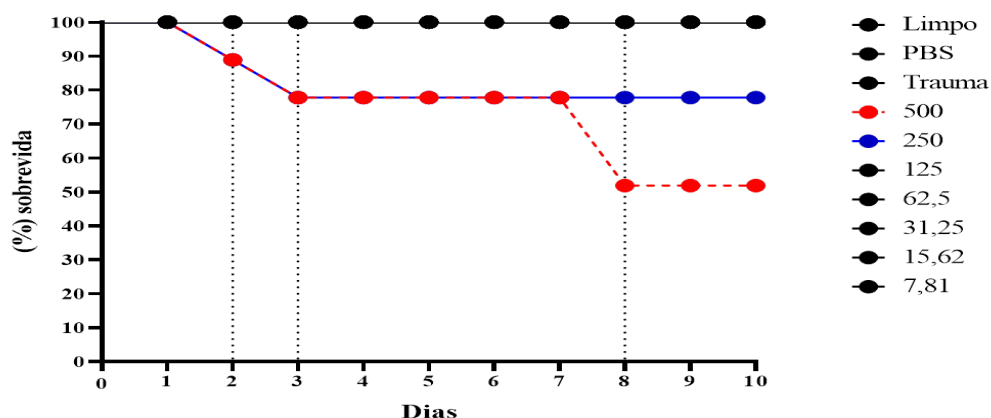
Ensaio de toxicidade in vivo (*Tenebrio molitor*) fração acetato de etila e extrato bruto das folhas de *Krameria tomentosa*.

O ensaio in vivo com as larvas de *T. molitor* demonstrou que a média de sobrevivência foi de 93,3% no grupo que recebeu a maior dose (1000 mg/kg), enquanto apresentou taxa de sobrevivência de 99,9% nas doses de 500 e 7,81 mg/kg, sem significância estatística ($p=0,5259$) quando comparadas com o controle. Esses resultados sugerem baixa toxicidade no extrato bruto (EB) de *Krameria tomentosa*, como pode ser observado na figura 13.

Esses achados indicam que o extrato bruto da *Krameria tomentosa* possui uma baixa toxicidade em larvas de *T. molitor*, o que é promissor em termos de segurança para seu potencial uso terapêutico. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar outros aspectos da toxicidade e segurança do extrato, bem

como para compreender melhor seus efeitos em diferentes modelos animais e em humanos.

Figura 14 – Taxa de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* após injeção com o extrato bruto da folha de *Krameria tomentosa*.

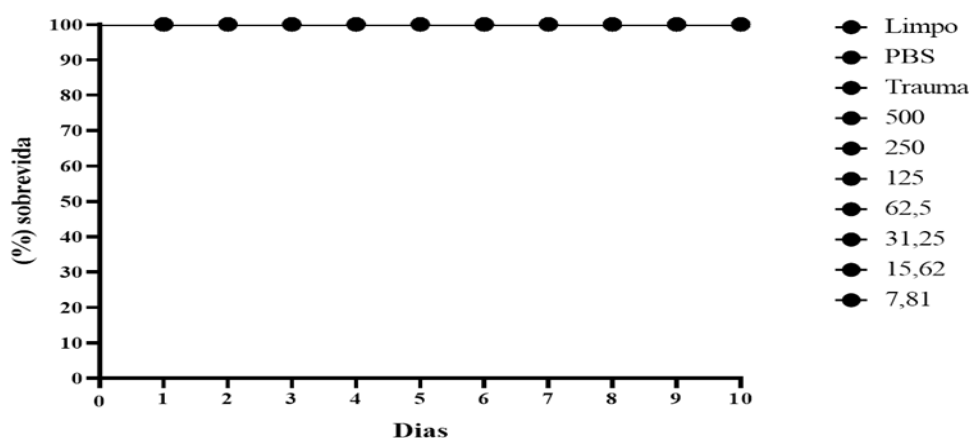


Fonte: Autoria própria (2024)

Na análise da toxicidade aguda in vivo em larvas de *Tenebrio molitor*, foi observada que o tratamento com o (EB) nas doses de 500 e 250 ug/kg, apresentou sobrevivência de 50% e 80% respectivamente. Enquanto que (FAE) apresentou 100% de sobrevivência em todas as doses testadas. Não foi observada significância estatística quando comparadas com o grupo controle, sugerindo que não houve toxicidade aguda, conforme ilustrado na Figura 14.

Esses resultados são promissores e sugerem que a fração acetato de etila da *Krameria tomentosa* possui uma baixa toxicidade aguda em larvas de *T. molitor*. Essa descoberta pode ser relevante para investigações futuras sobre o potencial terapêutico e a segurança dessa fração específica do extrato da planta.

Figura 15 – Taxa de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* após injeção da fração acetato (FAE) de etila das folhas de *Krameria tomentosa*.



Fonte: Autoria própria (2024)

Atividade Anti-Leishmania

Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*

O efeito leishmanicida *in vitro* foi avaliado em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Utilizamos a CC50 das células RAW para calcular o índice de seletividade dos extratos e frações tanto para as formas promastigotas quanto amastigotas.

Analisando os dados, observamos que o extrato bruto apresentou IC50 de 251,9 µg/mL para as formas promastigotas, sendo que a fração acetato de etila foi a mais ativa, com IC50 de 63,12 µg/mL e um índice de seletividade (IS) de 7,92 para a FAE. A fração aquosa não apresentou atividade em nenhuma das concentrações utilizadas. Ver quadro 5

Quadro 6 – Efeito do extrato de *Krameria tomentosa* no extrato bruto e na fração acetato de etila, em 48 horas, nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e macrófagos RAW 264.7, expressos pela IC50 e CC50, respectivamente, seguido do I.S.

48 HORAS	RAW 264.7 CC50	Promastigotas IC50	IS
BRUTO	192,4	251,9	0,76
ACETATO	>500	63,12	7,92

Fonte: Autoria própria (2024)

Legendas: IC50 = metade da concentração inibitória máxima, CC50 = citotoxicidade celular, I.S. = Índice de Seletividade, i.d. = Indeterminado.

De forma semelhante ao observado nas formas promastigotas, a FAE reduziu a viabilidade das formas amastigotas parasitárias, com uma IC50 de 111,1 µg/mL e IS de 4,5. O extrato bruto e a fração aquosa não apresentaram resultados significativos em relação à inibição da viabilidade celular das formas amastigotas. Ver quadro 6.

Esses resultados indicam que tanto a FAE quanto a fração hexânica possuem atividade leishmanicida contra ambas as formas parasitárias testadas, promovendo uma redução significativa da viabilidade celular. Essas descobertas são importantes para o desenvolvimento de potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose, especialmente considerando a necessidade de alternativas menos tóxicas e mais eficazes.

Quadro 7 – Efeito do extrato de *Krameria tomentosa* no extrato bruto e na fração acetato de etila, e aquosa em 48 horas, nas formas amastigota de *Leishmania amazonensis* e macrófagos RAW 264.7, expressos pela IC50 e CC50, respectivamente, seguido do I.S.

48 HORAS	RAW 264.7 CC50	AMASTIGOTAS IC50	IS
BRUTO	192,4	883,1	0,21
ACETATO	>500	111,1	4,5

Fonte: Autoria própria (2024)

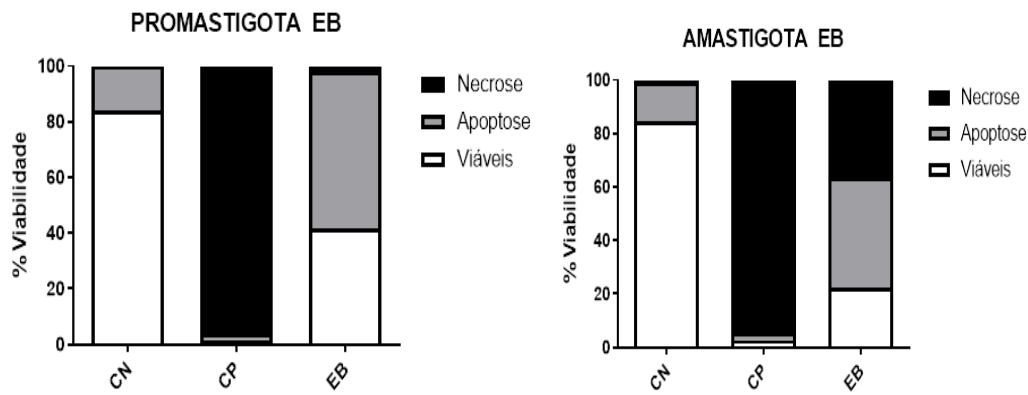
Legendas: IC50 = metade da concentração inibitória máxima, CC50 = citotoxicidade celular, I.S. = Índice de Seletividade, i.d. = Indeterminado.

Efeitos do extrato bruto e da fração acetato de etila das folhas de *Krameria tomentosa* na indução de morte em células amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*.

O tratamento com a IC50 tanto do extrato bruto (EB) quanto da fração acetato de etila (FAE) por 4 horas resultou em uma porcentagem de células apoptóticas maior quando comparado às células necróticas em ambas as formas parasitárias. Na Figura 15 e 16, é possível observar imagens em microscopia óptica de alta resolução dos controles e das amostras testadas, evidenciando assim os resultados apresentados nas Figuras 17 e 18.

Vale ressaltar que o extrato bruto (EB) apresentou mais mortes por apoptose nas formas promastigotas em relação às formas amastigota porem nas formas amastigotas houve numero significativo de mortes tanto por apoptose quanto por necrose. Resultado esse evidenciado na figura 16.

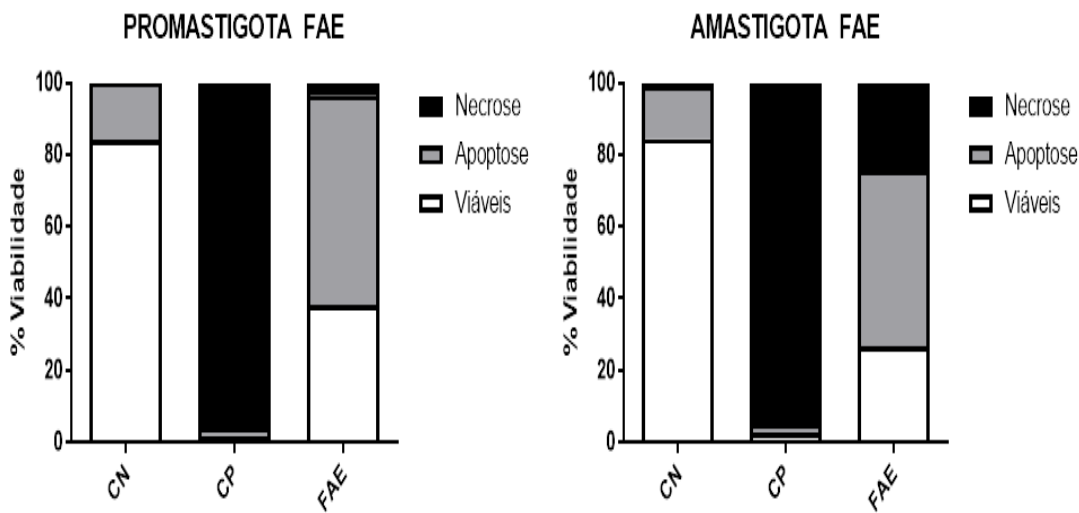
Figura 16 – Porcentagem de células promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B) de *Leishmania amazonensis* necróticas, apoptóticas e viáveis após incorporação de brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA).



Fonte: Autoria própria (2024)

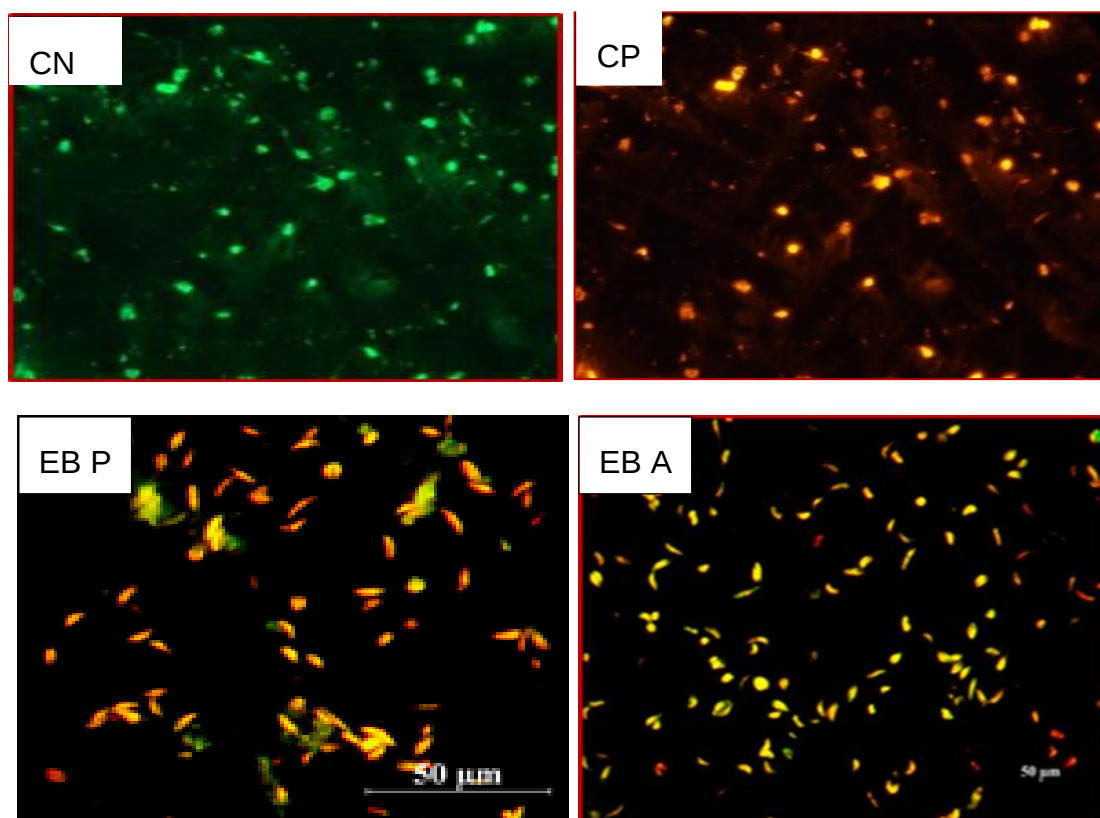
A fração acetato de etila (FAE) apresentou mais mortes por apoptose nas formas promastigotas em relação às formas amastigota quando comparadas ao grupo controle pentamidina. Resultado bem similar ao extrato bruto (E.B). E possível observa esse percentual da (FAE) na Figura 17.

Figura 17 – Porcentagem de células promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B).



Fonte: Autoria própria (2024)

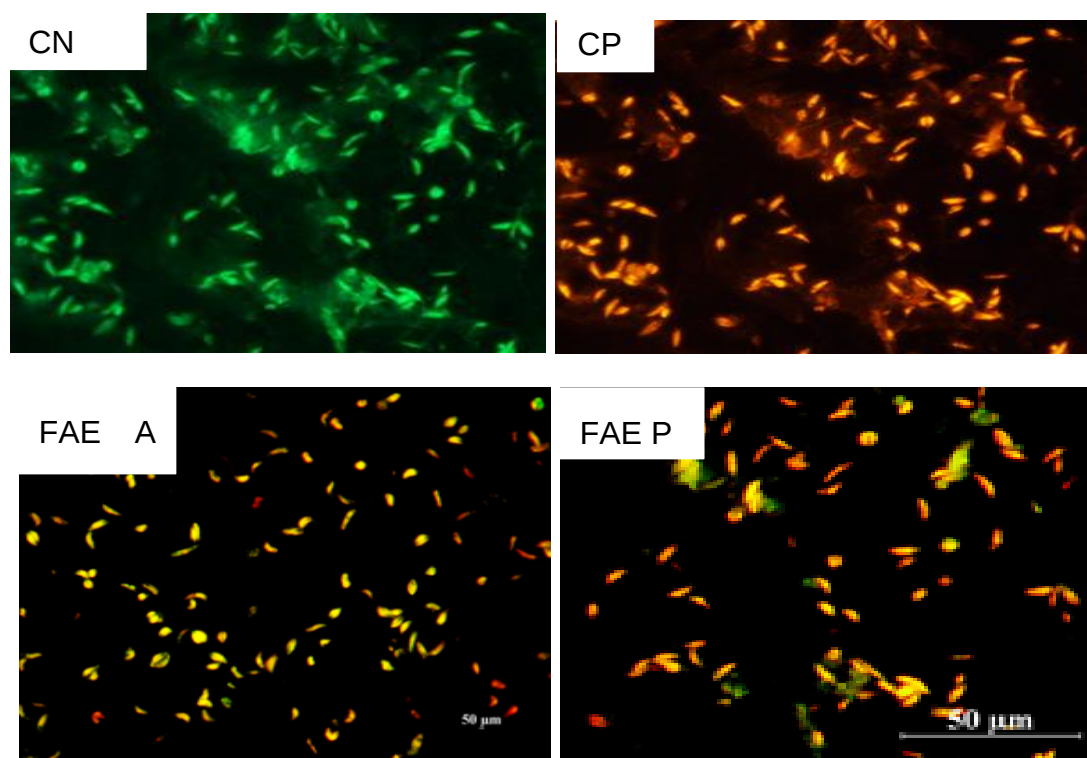
Figura 18 – Controle negativo (CN), células viáveis Controle positivo (CP) *Leishmania amazonensis* necróticas, apoptóticas e viáveis após incorporação de brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA).



Fonte: Autoria própria (2024)

Para facilitar a compreensão quanto à via de morte celular, das formas promastigotas e amastigotas do *L. amazonensis*, estas foram tratadas com a IC50 além do extrato bruto e da fração acetato de etila (FAE) como se pode observar na figura 19. Sendo obtida em ensaios anteriores, por 4 horas. A presença de células viáveis, apoptóticas e necróticas nas formas promastigota e amastigota. Foi avaliada por microscopia de fluorescência, após marcação com BE/LA.

Figura 19 – Marcação de células necróticas/apoptóticas com brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA). O experimento foi conduzido em quatro horas, após tratamento das formas promastigotas de *L. amazonensis*



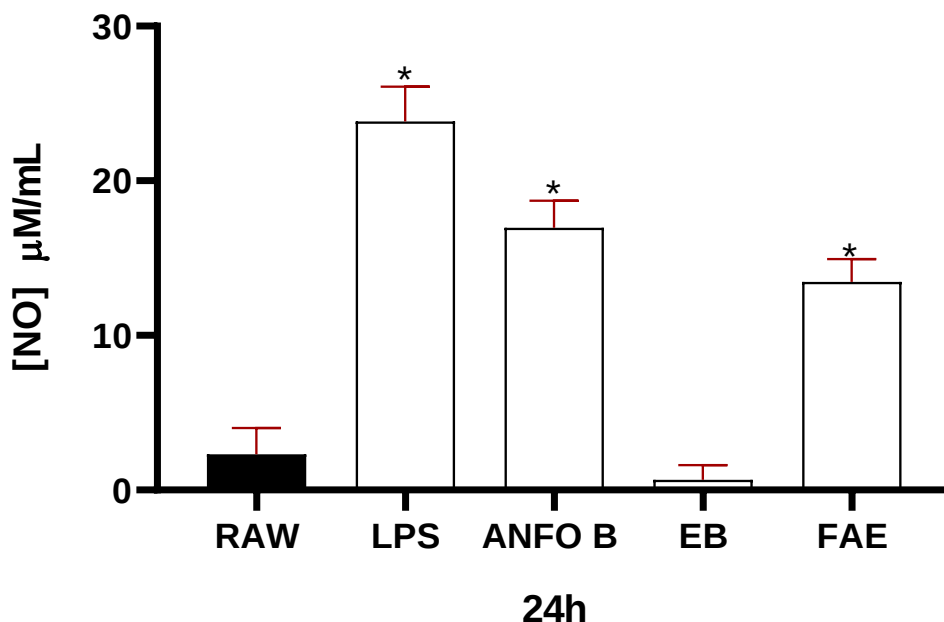
Fonte: Autoria própria (2024)

Avaliação da produção de óxido nítrico do EB, das frações FAE, HE das folhas de *Krameria tomentosa*

Avaliamos a produção de óxido nítrico no sobrenadante de células RAW tratadas com extrato bruto ou frações. Observamos que as células RAW tratadas com extrato bruto (EB) não produziram NO, enquanto a fração acetato de etila (FAE) induziram a produção de NO quando comparadas ao grupo controle. Isso pode ser visualizado na Figura 20.

Esses resultados sugerem que a fração acetato de etila pode induzir a produção de óxido nítrico em células RAW, indicando possíveis efeitos imunomoduladores dessa fração da *Krameria tomentosa*. Essa capacidade de modular a produção de óxido nítrico pode ser relevante para seus potenciais efeitos terapêuticos, especialmente em condições inflamatórias e imunológicas.

Figura 20 – Determinação da produção de Óxido Nítrico no sobrenadante da cultura de células RAW tratadas com a concentração de 100µg/mL de (EB), Fração Acetato de Etila (FAE), Lipopolissacarídeo (LPS), Anfotericina B em 24 horas de cultivo.



Fonte: Autoria própria (2024)

Avaliação do potencial antioxidante do extrato bruto das folhas de *Krameria tomentosa* e frações.

Foi avaliado o potencial antioxidante do extrato bruto (EB) das folhas de *Krameria tomentosa* e das frações acetato de etila (FAE) e hexânica (FH). Isso foi feito utilizando os métodos DPPH e ABTS, cujos resultados são representados na figura 21 e quadro 8 respectivamente.

Esses métodos são comumente empregados para determinar a capacidade antioxidante de compostos e extratos naturais. O método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) mede a capacidade de um antioxidante em neutralizar os radicais livres, enquanto o método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) avalia a capacidade de captura de radicais livres.

Discussão

Nos últimos anos o interesse por produtos de origem natural vem crescendo, justamente por muito destes apresentarem atividades biológicas, devido a metabolitos presentes em sua composição, essa substancia vem tendo sua aplicabilidade em

diversas áreas. Aumentando assim os interesses das indústrias farmacêuticas em produtos de origem natural. Nesse sentido *Krameria tomentosa* é uma espécie amplamente encontrada no Brasil, com efeitos benéficos à saúde e que já são comprovados na literatura.

Vários compostos químicos, isolados de extratos vegetais, possuem atividades leishmanicidas comprovadas contra as promastigotas e amastigotas do gênero *Leishmania* em testes in vitro. Já foi relatada atividade leishmanicida em terpenoídes (Sauvain *et al.*, 1996; Camacho *et al.*, 2000), Chalconas (Chen *et al.*, 1993; Boeck *et al.*, 2006), Flavonoides (Araujo; Alegrio; Leon, 1998) e de alcaloides (Mahiou *et al.*, 2004; Fournet *et al.*, 1996). Apesar de alguns compostos e produtos naturais terem suas atividades comprovadas contra os parasitas do gênero *Leishmania*, muitos estudos devem ser feitos em relação ao seu manuseio, coleta e modo de produção, e também em relação a sua composição química.

Porém ainda é pouco os estudos relacionados à *Krameria tomentosa* em relação a sua composição química e principalmente em relação a sua atividade biológica. Logo, o presente estudo teve como objetivo analisar a composição química do (EB), da (FAE) dessa espécie vegetal bem como analisar através de teste in vitro e in vivo se o (EB) e as frações (FAE), (FH) e (FA) apresentam potencial citotóxico para ser utilizado para o tratamento das leishmanioses.

A partir do estudo químico, identificamos os compostos bioativos presentes no extrato bruto das folhas de *Krameria tomentosa*. A caracterização química é essencial para compreender quais metabólitos secundários estão presentes em uma determinada espécie, uma vez que esses compostos podem variar em termos quantitativos ou qualitativos devido a fatores ambientais, ontogenéticos e hereditários (Kyriacou *et al.*, 2017).

Após a caracterização química do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE) das folhas de *Krameria tomentosa*, onde foram identificados compostos bioativos, procedemos à avaliação de sua eficácia na atividade leishmanicida, antioxidante e sua segurança por meio de ensaios de citotoxicidade em células da linhagem RAW e eritrócitos de carneiro in vitro, bem como toxicidade aguda in vivo utilizando um modelo alternativo com larvas de *Tenebrio molitor*. Além disso, investigamos a atividade imunomoduladora por meio da dosagem de óxido nítrico e teste de morte celular.

A análise dos resultados obtidos fornece dados importantes sobre a composição química, atividade biológica e potenciais aplicações terapêuticas do extrato bruto (EB) e das frações da planta *Krameria tomentosa*. A identificação dos diferentes compostos no extrato hidroalcoólico, realizada por meio de técnicas como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), permitiu a identificação de diversas substâncias. Além disso, a análise detalhada revelou a presença predominante de flavonoides e taninos na amostra, conhecidos por suas propriedades antioxidantes (Borges *et al.*, 2011).

Quanto à caracterização química do (EB) e da (FAE) observamos que a maioria dos metabólitos secundários encontrados em *Krameria tomentosa* são compostos fenólicos, com destaque para ácidos fenólicos, flavonoides, rutina e os taninos. Esses resultados corroboram com estudos anteriores realizados por Lima (2018) e Martins (2019), que também identificaram esses compostos nas folhas do extrato hidroetanólico dessa espécie. A rutina tem despertado interesse na comunidade científica devido às suas diversas propriedades farmacológicas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e cardioprotetora (Lima *et al.*, 2021), sendo rica em vitamina P e apresentando funções clínicas relevantes na prevenção de doenças (Ferreira Neto; Santos; Tellis, 2021).

Os flavonoides são metabólitos secundários encontrados em uma ampla variedade de fontes vegetais, desempenhando um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e doenças imunológicas. Esses compostos são subdivididos em diversas classes, incluindo flavonóis, isoflavonas, flavonas, flavanonas, flavanóis, antocianinas e taninos condensados. A sua estrutura fundamental consiste em dois anéis fenólicos (A e B) e um anel C, totalizando quinze átomos de carbono (C15) (Moraes *et al.*, 2017).

Silva *et al.* (2012) e Muzitano *et al.* (2006) ressaltam que a quercetina (quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-rhamnosídeo), apresentou atividade anti *Leishmania* em promastigotas de *L. amazonensis* e baixa citotoxicidade para as células hospedeiras. Esse campo de estudo tem motivado as indústrias farmacêuticas a desenvolverem novos medicamentos de origem vegetal (Jardim, 2019; Morguette *et al.*, 2022; Oliveira, 2020; Nascimento, 2022).

De acordo com os estudos realizados por Tasdemir *et al.* (2006), foi possível concluir que a quercetina e derivados (7,8 – dihidroxiflavona) possuem atividade antiprotozoários potente e eficaz. A maioria dos compostos mais ativos contra

tripanossomas e *Leishmania* têm uma estrutura típica de flavona (2,3 e C-4 da função ceto) e/ou uma subestrutura de catecol sem obstáculos no anel B, no esqueleto benzocromona e em 7,8 – dihidroxiflavona.

E paralelo a isso, foi realizado o teste de citotoxicidade em células RAW 264.7, onde estes são primordiais nas fases iniciais de desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias. Uma vez que definem a concentração a ser utilizada no teste de IC50, pois com esse valor evita os danos celulares e asseguram a seletividade para o parasito.

Em contrapartida, o efeito citotóxico observado em células RAW 264.7 tratadas com as maiores concentrações do extrato pode estar relacionado à ativação celular e consequente geração de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como demonstrados pela indução da produção de óxido nítrico pela (FH) das folhas de *Krameria tomentosa* em células RAW 264.7.

Os compostos fenólicos são considerados marcadores químicos e taxonômicos das espécies da família Leguminosae, pois são encontrados em grandes quantidades e diversidade (Hegnauer; Hegnauer, 1973), e por isso, foram encontrados em abundância no (EB) e (FAE). Logo a baixa citotoxicidade do extrato pode ser explicada pela presença desses metabólitos em sua composição, que podem promover uma ação protetiva às células, bem como também devido as proteases, uma vez que o inibidor também apresentou baixa citotoxicidade. Vale ressaltar que fatores como o tipo celular utilizado para a avaliação dos extratos, o tipo de solvente utilizado para a extração e a composição química dos extratos estudados, certamente influenciam na sua atividade biológica e também na sua toxicidade, visto que o BF-CA foi obtido com água e não com solventes orgânicos que podem ser tóxicos para as células (Lima; Cardoso, 2007; Versteg *et al.*, 2017).

Estudos clínicos têm discutido o ácido cafeoilquímico quanto à importância de substâncias fenólicas como (flavonoides e ácidos fenólicos), encontradas em alimentos de origem vegetal, na prevenção de doenças cardiovasculares. Segundo Vasconcelos *et al.* (2009), os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos existentes na natureza e estão amplamente distribuídos nos vegetais. (Pietta, 2000).

Procianidina tem sido descrito como principais atividades biológicas, podemos destacar: antioxidante (Moretoni, 2008), cardioprotetora (Hooper *et al.*, 2008) e anticancerígena (Sandhar *et al.*, 2011). Assim como, apresentam atividade anti-

inflamatória (Olajuyigbe; Afolayan, 2011), antimicrobiana (Georgiev *et al.*, 2014), antiviral (Tapas *et al.*, 2008), antialérgica (Sandhar *et al.*, 2011), hepatoprotetora (Tapas *et al.*, 2008), antidiabética (Kandaswami *et al.*, 2005) e apresenta efeitos no tratamento de doenças neurodegenerativas (Kumar; Pandey, 2013).

Os ensaios que analisam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar as substâncias conforme seu potencial de letalidade ou toxicidade (Valadares, 2007). Diversos estudos explicam que todas as substâncias podem apresentar elevada toxicidade de acordo com a maneira que é utilizada, dependendo apenas das condições de exposição, como: dose, tempo, frequência e via de administração (Valadares, 2007; Zatta *et al.*, 2009; Pires Júnior *et al.*, 2012).

Melo (2018) relaciona a atividade citotóxica de extrato aquoso dos ramos de *Krameria tomentosa* com a presença de alguns metabólitos encontrados na triagem fitoquímica. Como (flavonoides, proantocianidinas e leucoantocianidina). Resultado semelhante aos nossos achados.

No que diz respeito à atividade biológica, os testes de citotoxicidade em células RAW 264.7 e eritrócitos de carneiro forneceram informações importantes sobre a segurança das diferentes frações. Enquanto o EB e a FH demonstraram toxicidade em concentrações mais elevadas, a FAE mostrou-se não citotóxica em todas as concentrações testadas, sugerindo seu potencial uso terapêutico com menor risco de efeitos adversos.

Além disso, os ensaios in vivo com larvas de *T. molitor* corroboraram a baixa toxicidade do EB e da FAE, destacando seu potencial como agentes terapêuticos seguros. Os resultados dos ensaios leishmanicidas in vitro revelaram que a FAE e a FH apresentaram atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, enquanto o EB e a fração aquosa não mostraram atividade significativa. E, assim como outros organismos, *T. molitor* possui um sistema de defesa contra infecções mediadas pela produção de espécies reativas, sendo estas produzidas em excesso em quadros mais críticos (Zhu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018). Devido a capacidade do *T. molitor* produzir espécies reativas em resposta à infecção faz deste inseto um modelo potencial para o estudo de substâncias com caráter antioxidante. Considerando que o (EB) e (FAE) não é tóxico e que os metabólitos secundários apresentam atividade antioxidante, logo, esse extrato representa um bom indicativo para futuros testes em modelo de infecção.

Os resultados obtidos nos testes de atividade anti-leishmaniana demonstraram que o extrato bruto (EB) e principalmente a fração acetato de etila (FAE) foram eficazes contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com valores de IC₅₀ indicando sua atividade leishmanicida. No entanto, um aspecto importante a ser considerado é o índice de seletividade (IS), que é calculado como a razão entre a CC₅₀ em células hospedeiras (no caso, células RAW) e a IC₅₀ nas formas parasitárias. Carmo *et al.* (2012) Capello *et al.* (2015).

O índice de seletividade é crucial na avaliação da eficácia terapêutica de um composto, pois indica a capacidade de um tratamento de ser seletivo para o parasita, minimizando os danos às células hospedeiras. Nesse contexto, uma alta seletividade é desejável, indicando que o composto tem uma ação direcionada ao parasita, enquanto tem pouco ou nenhum efeito nas células hospedeiras. No caso deste estudo, observamos que a FAE apresentou um índice de seletividade mais alto em comparação com o EB, o que sugere uma maior eficácia e seletividade dessa fração contra as formas parasitárias.

Neste estudo, observamos que o tratamento com EB e FAE resultou em uma maior proporção de células apoptóticas em comparação com células necróticas, tanto em formas promastigotas quanto amastigotas de *L. amazonensis*. Isso é indicativo de que o EB e FAE estão promovendo a morte celular de maneira controlada e programada, minimizando o potencial de danos aos tecidos hospedeiros e reduzindo a resposta inflamatória. (Borges *et al.*, 2013).

Portanto, a indução de apoptose em vez de necrose é um resultado promissor, pois sugere que o EB e a FAE têm o potencial de serem agentes terapêuticos eficazes contra a leishmaniose, sem causar danos significativos às células hospedeiras. Essa preferência pelo apoptose como mecanismo de morte celular destaca a importância da seletividade e segurança dos tratamentos para o desenvolvimento de terapias eficazes e com baixo potencial de efeitos adversos.

Zangger, Mottram e Fasel (2002) relatam em seu estudo que morte celular traz benefícios importantes para o hospedeiro no que diz respeito à eliminação de células danificadas, infectadas ou que não possuem mais nenhuma utilidade, sendo capaz ainda, de estimular as funções do sistema imunológico. Diferente de um ambiente necrótico, as células não sofrem lise e sua eliminação acontece por meio da fagocitose, inibindo assim o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada.

Além disso, é importante discutir a preferência pela indução de morte por apoptose em vez de necrose. A apoptose é um processo programado de morte celular que ocorre de forma controlada, sem causar inflamação ou danos aos tecidos circundantes. Por outro lado, a necrose é uma forma de morte celular não programada, que pode desencadear uma resposta inflamatória e causar danos aos tecidos (Kroemer *et al.*, 2009).

Conforme estudo apresentado por Castaneda *et al.* (2017), a ativação de macrófagos estimula um metabolismo gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, bem como peroxinitrito, referido na literatura como “burst”, surto ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa, caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e de ATP (trifosfato de adenosina), aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons. A exposição de células ao estresse oxidativo causa alterações nas membranas celulares, danos ao DNA e reduz a capacidade de reparação desta macromolécula (Thirupurasundari; Padmini; Devaraj, 2009). Estas espécies químicas são altamente reativas e, geralmente, resultam em degradação de proteínas, peroxidação de lipídios e oxidação do DNA. Estes eventos, por sua vez, podem estar relacionados a várias doenças crônicas, tais como, diabetes, câncer, aterosclerose desordens neurodegenerativas e inflamação (Rahman *et al.*, 2007).

Espécies reativas de nitrogênio são geradas na cadeia respiratória mitocondrial e por meio da ação da enzima óxido nítrico sintase, de modo que a isoforma induzível desta enzima (inducible NO synthase, iNOS) é potencialmente induzida em resposta a estímulos próinflamatórios. Macrófagos são ativados por interferon- γ e produtos microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de NO. O óxido nítrico constitui um potente mediador envolvido nas funções microbidas dos macrófagos, tais como citotoxicidade contra patógenos intracelulares, vírus e tumores (Mcneill *et al.*, 2015).

Embora o NO, seja um importante mediador das funções exercidas pelos macrófagos, sugerimos que a citotoxicidade associada ao extrato, em suas maiores concentrações, possa estar relacionada a um mecanismo concentração dependente do NO produzido pelas células RAW 264.7. Isto se justifica pelo fato de o extrato ser capaz de induzir a produção de NO em concentração não citotóxica (125 $\mu\text{g/mL}$). Foi observado também, a capacidade da FAE em induzir a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 sugere assim um potencial efeito imunomodulador dessa fração.

Ao realizarmos os testes de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH, foi observado que ambos os extratos obtiveram uma atividade antioxidante significativa. Os antioxidantes são compostos que atuam inibindo ou diminuindo os efeitos prejudiciais dos radicais livres e compostos oxidantes. Como destacado por Cardoso (2022), existem diferentes tipos de radicais livres, cada um com diferentes formas de atuação nos organismos, o que torna difícil a existência de um método universal para determinar a atividade antioxidante. Além disso, segundo Melo (2018), é importante ressaltar que nenhum antioxidante possui todas as características ideais.

Utilizando o método ABTS, observamos a capacidade antioxidante do extrato bruto das folhas de *Krameria tomentosa*. Sugere-se que essa atividade antioxidante esteja relacionada aos flavonoides isolados presentes no extrato, os quais possuem hidroxilas nos carbonos, capazes de doar elétrons e desencadear a atividade antioxidante (Lemos *et al.*, 2022).

A atividade antioxidante desperta interesse na pesquisa científica devido ao seu papel na prevenção de doenças neurológicas, cardiovasculares, diabetes e câncer (Oliveira *et al.*, 2022). Muitos compostos antioxidantes de origem vegetal têm demonstrado eficácia no combate ao envelhecimento da pele, protegendo as células contra o dano oxidativo, o que os torna excelentes matérias-primas para a produção de cosméticos (Silva *et al.*, 2022).

Melo (2018) em seu estudo do extrato aquoso das folhas de *K. tomentosa* apresentou uma atividade antioxidante tão boa ou maior que a dos padrões utilizados. Vale ressaltar que os compostos utilizados como padrões são substâncias puras já conhecidas por suas propriedades antioxidantes.

Por fim, os testes de atividade antioxidante revelaram que tanto o EB quanto a FAE demonstraram forte capacidade antioxidante, medida pelos métodos DPPH e ABTS. Esses resultados destacam o potencial da *Krameria tomentosa* como fonte de antioxidantes naturais.

Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que o extrato bruto e as frações da *Krameria tomentosa* possuem atividades biológicas promissoras, incluindo atividade leishmanicida, baixa toxicidade e potente atividade antioxidante. Esses achados justificam estudos adicionais para explorar o potencial terapêutico dessa planta em condições médicas, especialmente aquelas relacionadas à inflamação, infecções parasitárias e estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia brasileira**. Brasília: ANVISA, 2010. 2v.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

ALMAAYTAH, A.; TARAZI, S.; ALSHEYAB, F.M.; ALBALAS, Q. MUKATTASH, T. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Mauriporin, a Multifunctional Scorpion Venom Peptide. **Int J Pept Res Ther.**, v. 20, n. 4, p. 397-408, 2014.

ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E, ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227-232, 2005.

ALVES, P. R. L.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 751-754, 1998.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora Campinas, 1995.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M. et al. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.631-637. João Pessoa. 2006.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199, 1958. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>. Acesso em: 20 fev. 2024.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg Med Chem**, v. 14, p. 1538-1545. 2006.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. D. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, Centro Científico Conhecer de Goiânia, v. 7, p. 12, maio. 2011.

BORGES, R.; NASCIMENTO, M.V.M.; CARVALHO, A.A.V.; VALADARES, M.C.; DE

PAULA, J.R.; COSTA, E.A.; CUNHA, L.C. **Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract from *Synadenium umbellatum* Pax. (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar. **Boletim epidemiológico**, n. esp., mar. 2021.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, L. S.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SOLIS, P. N. Terpenoids from *Guarea hophalocarpa*. **Phytochemistry**, v. 56: p. 203-210, 2000.

CAPELLO, T. M. et al. Chemical composition and in vitro cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of *Piper cernuum*. **Natural Product Communications**, v. 10, p. 285–288, 2015.

CARDOSO, S. P.; CÂMARA, C. A.; SILVA, T. Estudos químicos de flores de *Croton Heliotropiifolius* e *Croton Blanchetianus* visitadas por abelhas. **Química de compostos naturais**, v. 57, n. 3, p. 525-527, 2022.

CARMO, D. F. M. do; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; SILVA, J. R. A. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. **Molecules**, v. 17, p. 1819-1829, 2012.

CARVALHO, S. H.; FRÉZARD, F.; PEREIRA, N. P.; MOURA, A. S.; RAMOS, L. M. Q. C.; CARVALHO, G. B, ROCHA, M. O. C. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, London, v. 24, n. 4, 2019.

CASTANEDA, O. A. et al. Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 111-118, 2017.

CHEN, M.; BROGGER CHRISTENSEN, S.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K. et al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 37, p. 2550-2556, 1993.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R. M.; ALVES, F. A.; LEON, L. L. *Leishmania amazonensis*: longterm cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 89, n. 1, p. 58-62, 1998.

DING, A.; NATHAN, C. F.; STUER, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2503, 1988.

DUARTE, M.I.S.; BADARÓ, R.S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 1707-36.

FARIAS, F. J. A. S.; SILVA, E. do C. da; SILVA, S. A. da; PINHEIRO, V. C. S.; BEZEERA, J. M. T. Epidemiological profile of american tegumentary leishmaniasis in the state of Maranhão in recent years. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 3, p. 1-9, 2021.

FERREIRA NETO, Paula Teixeira Pinto; SANTOS, Taís Rubia; TELLIS, Carla Junqueira Moragas. Desenvolvimento de novos derivados de plantas medicinais para doenças negligenciadas: uma análise bibliométrica. **Revista Fitos**, v. 16, Supl. 2, p. 267-292, mar. 2022.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS, A. A.; TORRES, O. S.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A. In vitro efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 40, p. 2447-2451, 1996.

GEORGIEV, V. et al. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

HEGNAUER, R.; HEGNAUER, M.; **Chemotaxonomie der Pflanzen**: Leguminosae Bd. 11a. Birkhäuser: Verlag, 1973.

HIERRO, J. N. del; GUTIÉRREZ-DOCIO, A.; OTERO, P.; REGLERO, G.; MARTINET, D. Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 309, p. 125742-125777, mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125742>. Acesso em: 20 fev. 2024.

HOOPER, L.; KROON, P. A.; RIMM, E. B.; COHN, J. S.; HARVEY, I.; LE CORNU, K. A.; CASSIDY, A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 1, p. 38-50, 2008.

JARDIM, M.; CURY, N.M.; YUNES, J. A.; LÓPEZ, J. A.; HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L. Effect of *Anacardium occidentale* leaf extract on human acute lymphoblastic leukaemia cell lines. **Natural Product Research**, v. 33, n. 11, p. 1633-1636, 16 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1425841>. Acesso em: 20 mar. 2024.

KANDASWAMI, C.; KANADASWAMI, C.; LEE, L.-T.; LEE, P.-P. H.; HWANG, J.-J.; KE, F.-C.; LEE, M.-T. The antitumor activities of flavonoids, **In vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, 162750, 2013.

KUMAR, A.; KUMAR, D.; GEORGE, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 263–272, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.024>. Acesso em: 20 fev. 2024.

KYRIACOU, M. C. et al. Microgreens as a Component of Space Life Support Systems: A Cornucopia of Functional Food. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1587, 2017.

LEMOS, M. F. et al. Chlorogenic acid and caffeine contents and anti-inflammatory and antioxidant activities of green beans of conilon and arabica coffees harvested with different degrees of maturation. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 101467, 2022.

LI, H.; YU, S.; CAO, F.; WANG, C.; ZHENG, M.; LI, X.; QIU, L. Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 151, p.1-9, 2018.

LIMA, H. L. S. **Filmes antioxidantes comestíveis de celulose bacteriana e hidrolisado de gelatina de pele de peixe**. Orientadora: Morsyleide de Freitas Rosa. 2018. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

LIMA, A. S.; ROCHA, A. P. S.; SEREJO, R. S.; LIMA, G. D. de A.; LIMA NETO, J. de S.; FERREIRA, M. C. M. et al. Acaricide activity of extract and an isolated compound of *Lithraea brasiliensis* on *Rhipicephalus microplus* and selectivity actions against a non-target organism. **Veterinary Parasitology**, v. 300, 2021.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v.3, n.3, 2007.

MADEIRO, S. A.; DE LUCENA, H. F.; SIQUEIRA, C. D.; DUARTE, M. C.; BRAZFILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. New Neolignans from *Krameria tomentosa* A. St.-Hil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2021-2026, 2012.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **J Nat Prod.**, v. 57, p. 890-895, 1994.

MARTINS, T. A. **Influência da adição do octanoato de sódio ao meio do cultivo para a produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802**. Orientador: Franciolo Vendruscolo. 2019. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MCNEILL, E. et al. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 79, p. 206-216, 2015.

MELO, M. C. L. V. **Avaliação da toxicidade e do potencial antioxidante, antimicrobiano e antineoplásico do extrato aquoso de ramos de *Krameria tomentosa* A. ST.-HIL (Krameriaceae)**. Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia. 2018. 93f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

MORAES, L. A. de et al. New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 4, p. 517-525, 2017.

MORETONI, C. B. **Avaliação Fitoquímica e das Atividades Antioxidante, Citotóxica e Hipoglicemiante dos Frutos de *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae)**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MORGUETE, P. Y.; SA, L. B. de; GARCIA, S.; ARBO, M. D.; ZUANAZZI, J. A. *et al.* hepatoprotective activity of verbena litoralis, verbena montevidensis and their main iridoid, brasoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 1119-06, 2022.

MUZITANO, M.F.; CRUZ, E.A.; DE ALMEIDA, A.P.; DA SILVA, S.A.G.; KAISER, C.R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN; B.; COSTA, S.S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v. 72, p.81-83, 2006.

NASCIMENTO, A. J. S. **Química dos Medicamentos**: Proposta de Sequência didática. 2022. 68 f. Monografia (Licenciatura em Química) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022.

NORIEGA, P., MAFUD, D. F., SOUZA, B., SOARES-SCOTT, M., RIVELLI, D. P., BARROS, S.B.M., BACCHI, E. M. Applying design of experiments (DOE) to flavonoid extraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 119-1129, 2012.

OLAJUYIGBE, O. O.; AFOLAYAN, A. J. Phenolic content and antioxidant property

of the bark extracts of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n.130, 2011.

OLIVEIRA, J. A. de C. Composição química e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R.Harley. **Revista da Biologia**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–6, 2022. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revbiologia/article/view/157473>. Acesso em: 12 fev. 2024.

OLIVEIRA, D. F. de; MARTINS, J. A.; COSTA, J. S. E; OLIVEIRA, C. R. skin phytotherapy and pharmacological aspects: a brief review. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.4, n. 3, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Leishmaniose visceral**. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 05 jan. 2024.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniose**. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 10 jan. 2024.

PEIXOTO, A. L.; MAIA, L. C. **Manual de procedimentos para herbários**. Recife: Editora Universitária UFPE, 2013.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIRES JÚNIOR, H. B. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em camundongos. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.13, n.4, p. 512-519, out./dez. 2012.

RAHMAN, K. et al. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RAMIREZ J.; TULIG M.; WATSON K.; THIERS B. **The New York Botanical Garden Herbarium (NY)**. Version 1.16. 2019. The New York Botanical Garden. Occurrence dataset. Disponível em: https://www.gbif.org/occurrence/search?offset=20&dataset_key=d415c253-4d61-4459-9d25-4015b9084fb0&taxon_key=7309948. Acesso em: 15 jan. 2024.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E., MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 341-349, 2010.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 5, n. 12, 2005.

ROATT, B.; CARDOSO, J. M. de O.; BRITO, R. C. F. de, COURA-VITAL, W.; AGUIAR-SOARES, R. D. O. de, REIS, A. B. Recent advances and new strategies on

leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Minas Gerais, 104, 21, 8965-8977, ago. 2020.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J-C.; GAYRAL, P.; DEDET, J-P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dellineaceae). **Phytother Res**, v. 10, p. 1-4, 1996.

SANDHAR, H. K. et al. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, 2011.

SILVA, S. A.; CASTRO, J. C. D.; SILVA, T. G. D.; DA-CUNHA, E. V.; BARBOSAFILHO, J. M.; SILVA, M. S. D. Kramentosan, a new trinorlignan from the roots of *Krameria tomentosa*. **Natural Product Letters**, v. 15, n. 5, p. 323-329, 2001.

SILVA, A.M.; TAVARES, J.; SILVESTRE, R.; OUAISSI, A.; COOMBS, G. H.; SILVA, A.C. Characterization of *Leishmania infantum* thiol-dependent reductase 1 and evaluation of its potential to induce immune protection. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 6, p. 345-50, 2012.

SILVA, E. M. da; SILVA, Érik J. F. da; OLIVEIRA, R. B. de; SILVA, A. F. da. Prospecção no Âmbito da Produção de Antioxidantes Naturais para Inserção no Mercado Alimentício. **Cadernos de Prospecção**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 245–260, 2022. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/nit/article/view/43058>. Acesso em: 12 fev. 2024.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed. 2017.

SIMPSON, B. **Krameriaceae**. In: FLORA DO BRASIL. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB140>. Acesso em: 20 jan. 2024.

SOUZA, P.C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M.; BOCATE, K. P.; PANAGIO, L. A.; ITO, F. A.; FURLANETO, M. C. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **J Microbiol Methods**, v. 118, p.182-6, nov. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453946>. Acesso em: 20 fev. 2024.

STOCKERT, J. C.; HOROBIN, R. W.; COLOMBO, L. L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*, v. 120, p. 159-67, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>. Acesso em: 20 fev. 2024.

TAPAS, A. R. de et al. Flavonoids as Nutraceuticals : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARD, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUNC, F.;

RÜEDI, P. 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 Chemother**, v. 4, p. 1352-1364, 2006.

TEIXEIRA, M. C. *et al.* A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different Leishmania species. **Parasitology research**, v. 88, n. 11, p. 963-968, 2002.

THIRUPURASUNDARI, C. J.; PADMINI, R.; DEVARAJ, S. N. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 177, n. 3, p. 190-195, 2009.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia**, v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/2083>. Acesso em: 12 fev. 2024.

VASCONCELOS, J. *et al.* Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 1, p.1-10, 2009.

VERSTEG, N. *et al.* Determinação da citotoxicidade de extratos hidroalcoólicos de plantas da família lamiaceae e fabaceae. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 26., 2017. **Arquivos** [...]. Pelotas: UFPEL, 2017.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 13, n. 3 p. 191-200, 2015.

WANG, X.; SHI, G. An introduction to the chemistry of graphene. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S.l.], v. 17, n. 43, p. 28484-28504, 2015.

ZANGGER, H.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 1126-1139, 2002.

ZATTA, D. T. *et al.* Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da Jacaranda decurrens. **Latin American Journal of Pharmacy** [S.l.], v. 28, p. 9, 2009.

ZHU, J. J.; XU, Y. Q.; HE, J. H.; YU, H. P.; HUANG, C. J.; GAO, J. M. *et al.* Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 2, 139-148, 2014.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que o extrato bruto e fração acetato de etila das folhas de *Krameria tomentosa* apresenta grande potencial na descoberta de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses. Este potencial reside na possibilidade do extrato de potencializar o efeito dos medicamentos existentes no mercado, ao mesmo tempo em que pode reduzir os efeitos adversos e a resistência microbiana associada a esses tratamentos.

A caracterização química do extrato bruto (EB) e da fração acetato de etila (FAE) revelou a predominância de compostos fenólicos, especialmente flavonoides e taninos.

Além disso, os ensaios de citotoxicidade em células de linhagem RAW e eritrócitos de carneiro demonstraram que o EB e a FAE não apresentou toxicidade. Nos modelos *in vivo* com larvas de *Tenebrio molitor*, a FAE mostrou-se especialmente segura, com resultados semelhantes ao grupo controle, enquanto o EB apresentou uma diminuição não significativa na sobrevivência em algumas concentrações.

Nos testes de atividade anti-Leishmania, tanto o EB quanto a FAE foram eficazes contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com valores de IC₅₀ indicativos de sua atividade leishmanicida. Além disso, observamos que tanto o EB quanto a FAE induziram predominantemente a morte celular por apoptose.

Os resultados obtidos indicam que o extrato bruto e as frações das folhas de *Krameria tomentosa* possuem atividades biológicas promissoras, incluindo atividade leishmanicida, baixa toxicidade e potente atividade antioxidante. Portanto, é essencial realizar estudos adicionais para explorar o potencial terapêutico dessa planta em condições clínicas, especialmente aquelas relacionadas a processos inflamatórios, infecções parasitárias e estresse oxidativo. Isso pode envolver a investigação dos componentes químicos isolados da planta ou o desenvolvimento de um novo fitoterápico de acordo com as diretrizes da farmacopeia brasileira de 2020.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia brasileira**. Brasília: ANVISA, 2010. 2v.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- ALMAAYTAH, A.; TARAZI, S.; ALSHEYAB, F.M.; ALBALAS, Q. MUKATTASH, T. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Mauriporin, a Multifunctional Scorpion Venom Peptide. **Int J Pept Res Ther.**, v. 20, n. 4, p. 397-408, 2014.
- ALMEIDA, M. A. O.; JESUS, E. E.; SOUSA-ATTA, M. L.; ALVES, L. C.; BERNE, M. E, ATTA, A. M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227-232, 2005.
- ALVES, S. L. C.; NEVES, M. C. P.; COSTA, J. R. Avaliação da contaminação microbiológica de alface orgânica e convencional em diferentes pontos de comercialização. **Comunicado Técnico**, n. 105, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.
- ALVES, P. R. L.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015.
- ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 751-754, 1998.
- BAHMANI, M.; SAKI, K.; EZATPOUR, B.; SHAHSAVARI, S.; EFTEKHARI, Z.; JELODARI, M. et al. Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p. 695-701, 2015.
- BARRETO, A. C.; OLIVEIRA, V. J. dos S. de. Conhecimento de profissionais de saúde sobre as plantas medicinais e os fitoterápicos na atenção básica no município do Recôncavo da Bahia. **Revista Fitos**, v. 16, n. 3, p. 291-304, set. 2022.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora Campinas, 1995.
- BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Clin. Infect Dis.**, v. 7, p. 33-38, 2005.
- BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M. et al. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas

medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.631-637. João Pessoa. 2006.

BIZZO, H.; REZENDE, C. O Mercado de Óleos Essenciais no Brasil e no Mundo na Última Década. **Química Nova**, [S.l.], v. 45, n. 8, p. 949-958, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170889>. Acesso em: 20 jan. 2024.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199, 1958. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>. Acesso em: 20 fev. 2024.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg Med Chem**, v. 14, p. 1538-1545. 2006.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. D. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, Centro Científico Conhecer de Goiânia, v. 7, p. 12, maio. 2011.

BORGES, R.; NASCIMENTO, M.V.M.; CARVALHO, A.A.V.; VALADARES, M.C.; DE PAULA, J.R.; COSTA, E.A.; CUNHA, L.C. **Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract from Synadenium umbellatum Pax. (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manejo Terapêutico de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**. 2018. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/ManualLTAvizualiza%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2024

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar. **Boletim epidemiológico**, n. esp., mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, L. S.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SOLIS, P. N. Terpenoids from Guarea hophalocarpa. **Phytochemistry**, v. 56: p. 203-210, 2000.

- CAMPOLINA, T. B.; VILLEGAS, L. E. M.; MONTEIRO, C. C. PIMENTA, P. F. P.; SECUNDINO, N. F. C. Tripartite interactions: Leishmania, microbiota and Lutzomyia longipalpis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 14, n. 10, e0008666, 2020.
- CAPELLO, T. M. et al. Chemical composition and in vitro cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of Piper cernuum. **Natural Product Communications**, v. 10, p. 285–288, 2015.
- CARDOSO, S. P.; CÂMARA, C. A.; SILVA, T. Estudos químicos de flores de Croton Heliotropiifolius e Croton Blanchetianus visitadas por abelhas. **Química de compostos naturais**, v. 57, n. 3, p. 525-527, 2022.
- CARMO, D. F. M. do; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; SILVA, J. R. A. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of Piper species. **Molecules**, v. 17, p. 1819-1829, 2012.
- CARVALHO, S. H.; FRÉZARD, F.; PEREIRA, N. P.; MOURA, A. S.; RAMOS, L. M. Q. C.; CARVALHO, G. B, ROCHA, M. O. C. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, London, v. 24, n. 4, 2019.
- CASTANEDA, O. A. et al. Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 111-118, 2017.
- CASTRO, J. C.; SILVA, M. S.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Inhibitory Effect of the Norlignan 2-(2'-Hydroxy-4', 6'-dimethoxyphenyl)-5-[(E)-propenyl] benzofuran from Krameria tomentosa on Acetylcholine-Induced Relaxation of the Rat Aorta. **Planta Medica**, v. 72, n. 01, p. 78-81, 2006.
- CINCURÁ, C.; LIMA, C. M. F. de, MACHADO, P. R. L.; OLIVEIRA-FILHO, J.; GLESBY, M. J.; LESSA, M. M.; CARVALHO, E. M. Mucosal leishmaniasis: A Retrospective Study of 327 Cases from an Endemic Area of Leishmania (Viannia) braziliensis. **Am J Trop Med.**, v. 97, n. 3, p. 761-766, set. 2017.
- COSTA-LIMA, J. L. Krameriaceae. **Flora do Brasil**. 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB8091>. Acesso em: 20 jan. 2024.
- CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R. M.; ALVES, F. A.; LEON, L. L. Leishmania amazonensis: longterm cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 89, n. 1, p. 58-62, 1998.
- DING, A.; NATHAN, C. F.; STUER, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2503, 1988.
- DREOSTI, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutr.**, v.16,

p. 692-694, 2000.

DUARTE, M.I.S.; BADARÓ, R.S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 1707-36.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 4-6, jan. 2006.

EBERT, E. F.; SIVINSKI, E. A.; PELISSER, C.; ENDRES, C. M.; MATTIA, J. L. de. Capuchinha (*Tropaeolum majus*) bioactive compounds and their functionality in the organism. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e0510162262 3, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22623>. Acesso em: 20 jan. 2024.

FARIAS, F. J. A. S.; SILVA, E. do C. da; SILVA, S. A. da; PINHEIRO, V. C. S.; BEZEERA, J. M. T. Epidemiological profile of american tegumentary leishmaniasis in the state of Maranhão in recent years. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 3, p. 1-9, 2021.

FERREIRA NETO, Paula Teixeira Pinto; SANTOS, Taís Rubia; TELLIS, Carla Junqueira Moragas. Desenvolvimento de novos derivados de plantas medicinais para doenças negligenciadas: uma análise bibliométrica. **Revista Fitos**, v. 16, Supl. 2, p. 267-292, mar. 2022.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS, A. A.; TORRES, O. S.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A. In vitro efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 40, p. 2447-2451, 1996.

GEORGIEV, V. et al. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GIANNINI, T. C.; TAKAHASI, A.; MEDEIROS, M. C. M. P.; SARAIVA, A. M.; ALVES, S. I. Análise de Componentes Principais (PCA) das variáveis climáticas da área de ocorrência de *Krameria* Loebl. (Krameriaceae). In: CONGR. ECOLOGIA DO BRASIL, 9., 2009, São Lourenço, MG. **Anais [...]**, São Lourenço: UFMG, 2009.

GIANNINI, T.C.; TAKAHAS A. I.; MEDEIROS, M.C.M.P.; SARAIVA, A.M.; SANTOS, I. A. Ecological niche modeling and principal component analysis of *Krameria* Loebl. (Krameriaceae). **Journal of Arid Environments**, v. 75, p. 870-872, 2011.

GIMENES, M.; LOBÃO, C. da S. A Polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (Krameriaceae) por Abelhas (Apidae) na Restinga, BA. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 440-445, 2006.

HEGNAUER, R.; HEGNAUER, M.; **Chemotaxonomie der Pflanzen**: Leguminosae Bd. 11a. Birkhäuser: Verlag, 1973.

HOOPER, L.; KROON, P. A.; RIMM, E. B.; COHN, J. S.; HARVEY, I.; LE CORNU, K. A.; CASSIDY, A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 1, p. 38-50, 2008.

HWANG, S. J. KIM, Y. W.; PARK, Y.; LEE, H. J.; KIM, K, W. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v. 63, n. 1, p. 81-90, 2014.

JARDIM, M.; CURY, N.M.; YUNES, J. A.; LÓPEZ, J. A.; HERNÁNDEZ-MACEDO, M. L. Effect of Anacardium occidentale leaf extract on human acute lymphoblastic leukaemia cell lines. **Natural Product Research**, v. 33, n. 11, p. 1633-1636, 16 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1425841>. Acesso em: 20 mar. 2024.

JUSSIEU, A. L. de. **Genera plantarum**. Paris: Herissant; T. Barrois, 1789.

KANDASWAMI, C.; KANADASWAMI, C.; LEE, L.-T.; LEE, P.-P. H.; HWANG, J.-J.; KE, F.-C.; LEE, M.-T. The antitumor activities of flavonoids, **In vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.

KIRCHNER, G. de A.; PELAQUIN, M. M.; MAGALHÃES, M.; GOUVEIA, N. M. de. Possíveis interações medicamentosas de fitoterápicos e plantas medicinais incluídas na relação nacional de medicamentos essenciais do SUS: revisão sistemática. **Revista Fitos**, v. 16, n. 1, p. 93-119, mar. 2022.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, 162750, 2013.

KUMAR, A.; KUMAR, D.; GEORGE, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 263–272, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.024>. Acesso em: 20 fev. 2024.

KYRIACOU, M. C. et al. Microgreens as a Component of Space Life Support Systems: A Cornucopia of Functional Food. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1587, 2017.

LEE, H. S.; HONG, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. **J Chromat A**, v. 624, n. 1-2, 2005.

LEMOES, M. F. et al. Chlorogenic acid and caffeine contents and anti-inflammatory and antioxidant activities of green beans of conilon and arabica coffees harvested

with different degrees of maturation. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26, n. 3, p. 101467, 2022.

LESTINOVA, T.; ROHOUSOVA, I.; SIMA, M.; OLIVEIRA, C. I. de, VOLFF, Petr. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **Neglected Tropical Diseases**, Salvador, 11, 7, 1-26, jul. 2017.

LEYVA-LÓPEZ, N.; NAIR, V.; BANG, W. Y.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; & HEREDIA, J. B. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 187, p. 302-312, 2016.

LI, H.; YU, S.; CAO, F.; WANG, C.; ZHENG, M.; LI, X.; QIU, L. Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 151, p.1–9, 2018.

LIMA, A. S.; ROCHA, A. P. S.; SEREJO, R. S.; LIMA, G. D. de A.; LIMA NETO, J. de S.; FERREIRA, M. C. M. *et al.* Acaricide activity of extract and an isolated compound of *Lithraea brasiliensis* on *Rhipicephalus microplus* and selectivity actions against a non-target organism. **Veterinary Parasitology**, v. 300, 2021.

LIMA, H. L. S. **Filmes antioxidantes comestíveis de celulose bacteriana e hidrolisado de gelatina de pele de peixe**. Orientadora: Morsyleide de Freitas Rosa. 2018. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v.3, n.3, 2007.

LOGRADO JUNIOR, V. VIEIRA, M. N.; SILVA, K. B. M.; MARIANO, S. M. B. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Palmas, Tocantins. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 9, n. 3, p. 21-26, 2022.

MACUÁCUA, Xadrique Vitorino. **Análise espacial da produção de plantas medicinais prioritárias no estado do Amazonas**. Orientador: Henrique dos Santos Pereira. 2022. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2022.

MADEIRO, S. A.; DE LUCENA, H. F.; SIQUEIRA, C. D.; DUARTE, M. C.; BRAZ FILHO, R.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. New Neolignans from *Krameria tomentosa* A. St.-Hil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2021-2026, 2012.

MCNEILL, E. *et al.* Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 79, p. 206-216, 2015.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **J Nat Prod.**, v. 57, p. 890-895, 1994.

MARTINS, T. A. **Influência da adição do octanoato de sódio ao meio do cultivo para a produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802**. Orientador: Franciello Vendruscolo. 2019. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MELO, M. C. L. V. **Avaliação da toxicidade e do potencial antioxidante, antimicrobiano e antineoplásico do extrato aquoso de ramos de *Krameria tomentosa* A. ST.-HIL (Krameriaceae)**. Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia. 2018. 93f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, v. 146, p. 232-246, 2019.

MORAES, L. A. de et al. New invasion of *Bemisia tabaci* Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 4, p. 517-525, 2017.

MORETONI, C. B. **Avaliação Fitoquímica e das Atividades Antioxidante, Citotóxica e Hipoglicemiante dos Frutos de *Cucumis anguria* L. (Cucurbitaceae)**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MORGUETE, P. Y.; SA, L. B. de; GARCIA, S.; ARBO, M. D.; ZUANAZZI, J. A. *et al.* hepatoprotective activity of verbena litoralis, verbena montevidensis and their main iridoid, brasoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, p. 1119-06, 2022.

MUZITANO, M.F; CRUZ, E.A.; DE ALMEIDA, A.P.; DA SILVA, S.A.G.; KAISER, C.R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN; B.; COSTA, S.S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v. 72, p.81-83, 2006.

NASCIMENTO, A. J. S. **Química dos Medicamentos**: Proposta de Sequência didática. 2022. 68 f. Monografia (Licenciatura em Química) – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022.

NEVES, B. M.; BAUERMANN, L.; BIEGELMEYER, R.; APEL, M.; HENRIQUES, A. Avaliação da atividade antioxidante do óleo volátil de *Siphoneugena reitzii* d.(myrtaceae) e de monoterpenos isolados. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20., 2008, Porto Alegre. **Livro de resumos** [...]. Porto Alegre: UFRGS, 2008.

NORIEGA, P., MAFUD, D. F., SOUZA, B., SOARES-SCOTT, M., RIVELLI, D. P., BARROS, S.B.M., BACCHI, E. M. Applying design of experiments (DOE) to

flavonoide xtraction from *Passiflora alata* and *P. edulis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 119-1129, 2012.

ODONNE, G.; HOUËL, E.; BOURDY, G.; STIEN,. Treating leishmaniasis in Amazonia: A review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199: 211-230, 2017.

OLAJUYIGBE, O. O.; AFOLAYAN, A. J. Phenolic content and antioxidant property of the bark extracts of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n.130, 2011.

OLIVEIRA, J. A. de C. Composição química e avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R.Harley. **Revista da Biologia**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–6, 2022. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revbiologia/article/view/157473>. Acesso em: 12 fev. 2024.

OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, R. L.; FARIAS, L. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. Isolated from broiler chickens in Brazil. **Poultry Science**, v. 100, n. 5, p. 101-123, 2021.

OLIVEIRA, D. F. de; MARTINS, J. A.; COSTA, J. S. E; OLIVEIRA, C. R. skin phytotherapy and pharmacological aspects: a brief review. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.4, n. 3, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Leishmaniose visceral**. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 05 jan. 2024.

PACHECO-FERNANDEZ, T.; VOLPEDO, G.; GANNAVARAM, S.; BHATTACHARYA, P.; DEY, R.; SATOSKAR, A. et al. PACHECO-FERNANDEZ, T. et al. Revival of leishmanization and leishmanin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 639801, 2021.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniose**. 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 10 jan. 2024.

PEIXOTO, A. L.; MAIA, L. C. **Manual de procedimentos para herbários**. Recife: Editora Universitária UFPE, 2013.

PEREIRA, A. R. A. **O uso de plantas medicinais e a qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes com câncer**. Orientador: Namie Okino Sawada. 2022. 196f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/22/22132/tde-18082022-094229/>. Acesso em: 10 abr. 2024.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIRES JÚNIOR, H. B. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em camundongos. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.13, n.4, p. 512-519, out./dez. 2012.

PREVEDELLO, M. T.; COMACHIO, G. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres, e Doenças Crônicas Não Transmissíveis: uma revisão de literatura / Antioxidants and their relationship with free radicals, and Chronic Non communicable Diseases: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 55244-55285, 2021. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/30840>. Acesso em: 20 jan. 2024.

RAHMAN, K. et al. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RAMIREZ, H.; GUEVARA, M. E.; PÉREZ, R. H. E. **Cultivo de tejidos vegetales: conceptos y prácticas**. Palmira: UNAL, 2012.

RAMIREZ J.; TULIG M.; WATSON K.; THIERS B. **The New York Botanical Garden Herbarium (NY)**. Version 1.16. 2019. The New York Botanical Garden. Occurrence dataset. Disponível em: https://www.gbif.org/occurrence/search?offset=20&dataset_key=d415c253-4d61-4459-9d25-4015b9084fb0&taxon_key=7309948. Acesso em: 15 jan. 2024.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical. **Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581-96, sep. 2007.

ROATT, B.; CARDOSO, J. M. de O.; BRITO, R. C. F. de, COURA-VITAL, W.; AGUIAR-SOARES, R. D. O. de, REIS, A. B. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Minas Gerais, 104, 21, 8965-8977, ago. 2020.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E., MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, p. 341-349, 2010.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 5, n. 12, 2005.

ROCHA L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. Review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514-35, 2005.

RODRIGUES, H. J. A. **Prevalência da leishmaniose visceral em cães no município de João Pessoa/PB, em 2021**. Orientador: Inácio José Clementino. 2022. 24f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2022.

RODRIGUES, L. da S.; SOBREIRA, I. E. M. M. Uso de plantas medicinais por adultos diabéticos e/ou hipertensos de uma unidade básica de saúde do município de Caucaia-CE, Brasil. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 341-354, 2020.

ROGÉRIO, L. V. F.; RIBEIRO J. C. Uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos em insônia: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 3, n. 2, p. 35-44, 2021. Disponível em: <https://revistacientifica.crfmg.emnuvens.com.br/crfmg/article/download/130/87/240>. Acesso em: 20 jan. 2024.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!. **International immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29294040/>. Acesso em: 10 fev. 2024.

SANDHAR, H. K. et al. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, 2011.

SANTOS, E. C. S. **Investigação do potencial tóxico do extrato etanólico de Krameria tomentosa A. St. HILL sobre o sistema reprodutor de ratos e ratas e suas proles**. Orientadora: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz. 2016. 182f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016.

SANTIAGO, A.; PITA, S. S. da R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, Bahia, 10, 7, 1-11, jun. 2021.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitol Res**, v. 120, n. 5, p. 1541-1554, may, 2021.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J-C.; GAYRAL, P.; DEDET, J-P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dellineaceae). **Phytother Res**, v. 10, p. 1-4, 1996.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic, 1995.

SCHOLZ, E.; RIMPLER, H. Proanthocyanidins from *Krameria triandra* Root. **Planta Med**, v. 55, n. 4, p. 379-384, 1989.

- SILVA, S. A.; CASTRO, J. C. D.; SILVA, T. G. D.; DA-CUNHA, E. V.; BARBOSAFILHO, J. M.; SILVA, M. S. D. Kramentosan, a new trimeric lignan from the roots of *Krameria tomentosa*. **Natural Product Letters**, v. 15, n. 5, p. 323-329, 2001.
- SILVA, B. da; SIOCHETTA, T. M.; BERLEZI, E. M. Plantas medicinais utilizadas para o tratamento de distúrbios associados à menopausa. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 147-161, 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/33914>. Acesso em: 20 jan. 2024.
- SILVA, A. P. da; MEDEIROS, E. B.; GOMES NETTO, J. L. de M.; WANDERLEY, F. S. Estudo Epidemiológico de Leishmaniose Tegumentar Americana em Alagoas, no período de 2010 a 2018. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 2, p. 2351-2364, 2021. Disponível em: https://periodicos.ifal.edu.br/diversitas_journal/article/view/1550/1393. Acesso em: 20 fev. 2024.
- SILVA, E. M. da; SILVA, Érik J. F. da; OLIVEIRA, R. B. de; SILVA, A. F. da. Prospecção no Âmbito da Produção de Antioxidantes Naturais para Inserção no Mercado Alimentício. **Cadernos de Prospecção**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 245–260, 2022. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/nit/article/view/43058>. Acesso em: 12 fev. 2024.
- SILVA, L. W. S.; PAMPONET, L. S. Saberes populares no uso de plantas medicinais: tradição de valor familiar na convergência aos saberes científicos. **Revista REVERSE**, v. 9, fluxo contínuo, p. 325-351, 2022.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed. 2017.
- SIMPSON, B.B. Krameriaceae. **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 49, p. 1-108, 1989.
- SIMPSON, B. B. Krameriaceae. **Flowering Plants Eudicots**, Berlin, p. 208-212, 2007.
- SIMPSON, B.B.; WEEKS, A.; HELFGOTT, D.M. & LARKIN, L.L. Species relationships in *Krameria* (Krameriaceae) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography. **Systematic Botany**, v. 29, p. 97-108, 2004.
- SIMPSON, B. **Krameriaceae**. In: FLORA DO BRASIL. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB140>. Acesso em: 20 jan. 2024.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (SIBBR).

Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020:

Krameria tomentosa A.St.-Hil. 2020. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/333686>. Acesso em: 25 jan. 2024.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONI, V.; CHANDEL, S.; PANDEY, V.; ASSAT, S. Novel Therapeutic Approaches for the Treatment of Leishmaniasis. In: SONI, V.; CHANDEL, S.; PANDEY, V.; ASSAT, S **Biomaterials and Bionanotechnology**: Advances in Pharmaceutical Product Development and Research. Índia: Elsevier, 2019. p. 263-300.

SOUZA, P.C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M.; BOCATE, K. P.; PANAGIO, L. A.; ITO, F. A.; FURLANETO, M. C. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **J Microbiol Methods**, v. 118, p.182-6, nov. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26453946>. Acesso em: 20 fev. 2024.

STOCKERT, J. C.; HOROBIN, R. W.; COLOMBO, L. L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*, v. 120, p. 159-67, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>. Acesso em: 20 fev. 2024.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAPAS, A. R. de et al. Flavonoids as Nutraceuticals : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARD, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUNC, F.; RÜEDI, P. 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 Chemother**, v. 4, p. 1352-1364, 2006.

TAUBERT, P. Leguminosae. II. 6. Caesalpinioideae Kramerieae. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. **Die natürlichen Pflanzenfamilien**. W. Engelmann, Leipzig, 1892. 3v.

TEIXEIRA, M. C. et al. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology research**, v. 88, n. 11, p. 963-968, 2002.

THIRUPURASUNDARI, C. J.; PADMINI, R.; DEVARAJ, S. N. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 177, n. 3, p. 190-195, 2009.

TORRES, M. K. da S. **Avaliação do efeito de preparações obtidas de sementes de *Moringa oleifera* e da lectina WSMoL nas vias inflamatórias e de sinalização**

da insulina em modelos de sepse e obesidade. Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva. 2021. 174f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, may, 2017.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Crescimento microbiano. In: TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 156-83.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia**, v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/2083>. Acesso em: 12 fev. 2024.

VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Environmental and socioeconomic risk factors associated with visceral and cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology research**, v. 119, n. 2, p. 365-384, 2020.

VASCONCELOS, J. et al. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v. 7, n. 1, p.1-10, 2009.

VATTEM, D. A.; LIN, Y.-T.; GHAEDIAN, R.; SHETTY, K. Cranberry synergies for dietary management of Helicobacter pylori infections. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1583-1592, 2005.

VERSTEG, N. *et al.* Determinação da citotoxicidade de extratos hidroalcoólicos de plantas da família lamiaceae e fabaceae. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 26., 2017. **Arquivos** [...]. Pelotas: UFPEL, 2017.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 13, n. 3 p. 191-200, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. 2002. Disponível em: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso em: 02 fev. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).. **Leishmaniasis: the disease and its epidemiology**. 2022. Disponível em : <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: 02 fev. 2024.

ZANGGER, H.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cell death in Leishmania induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell Death and Differentiation**, v. 9, p. 1126-1139, 2002.

ZATTA, D. T. et al. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de Pseudomonas aeruginosa e da Toxicidade Aguda das folhas da Jacaranda decurrens. **Latin American Journal of Pharmacy** [S.l.], v. 28, p. 9, 2009.

ZHU, J. J.; XU, Y. Q.; HE, J. H.; YU, H. P.; HUANG, C. J.; GAO, J. M. et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 2, 139-148, 2014.

ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS

Instruções aos autores

O periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências considera para publicação as submissões feitas exclusivamente pelo sistema online de gerenciamento de artigos. Uma vez que seu artigo esteja de acordo com as instruções abaixo, favor acessar o sistema no link <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>.

Por favor, leia estas instruções com atenção e as siga rigorosamente. Desta forma você irá garantir que a avaliação e a publicação de seu artigo sejam o mais eficiente e veloz quanto possível. Os editores reservam-se ao direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Apesar de dispormos de uma página de instruções em português, lembramos que só consideramos para submissão, avaliação e publicação os artigos redigidos de forma **clara e concisa na língua inglesa**.

Objetivo e política editorial

Todos os manuscritos submetidos devem conter pesquisa original que não tenha sido publicada ou esteja sob consideração em outro periódico. O critério primário para aceitação é qualidade científica. Artigos devem evitar o uso excessivo de abreviações ou jargões, além de ser tão inteligíveis quanto possível para o público em geral. Deve ser dada atenção particular às seções Abstract, Introduction e Discussion, as quais devem detalhar a novidade e significância dos dados relatados. Não cumprir com qualquer um dos pontos acima pode causar atraso na publicação ou até mesmo a recusa do artigo.

Textos podem ser publicados em forma de revisão, artigo completo ou como comunicação curta (*short communications*). Os volumes regulares dos AABC são publicados em março, junho, setembro e dezembro.

Tipos de artigos

Revisões

Revisões são publicadas apenas por **meio de convite**, tendo ainda que passar pelo processo de revisão por pares. Contudo, uma proposta de revisão pode ser enviada por e-mail para a Assessoria de publicações (aabc@abc.org.br). O e-mail deve conter os tópicos e autores da revisão proposta, bem como o abstract, área dos AABC na qual o artigo se encaixa e a justificativa pela qual este tópico seria de particular interesse à área.

Os AABC permitem que os autores depositem preprints de seus artigos em servidores de preprint tais como, mas não limitados a, ArXiv.org e bioRxiv.org. Contudo, autores devem atualizar os registros informando que o artigo foi aceito/publicado pelos AABC.

Cartas ao editor

Cartas ao editor (*Letters to the Editor*) estarão sujeitas à edição e revisão, não podendo conter material que tenha sido submetido ou publicado em outro periódico. Cartas que venham a se referir a um artigo publicado nos AABC não podem exceder 250 palavras (não contando com referências) e devem ser recebidas em até 4 semanas após a publicação online do artigo. Cartas não relacionadas a um artigo publicados pelos AABC não podem exceder 500 palavras (não contando com referências). Uma carta não pode ter mais de dez referências, além de uma figura ou tabela.

Articles

Sempre que possível, artigos devem estar subdivididos nas seguintes partes: **1.** Página de rosto; **2.** Abstract (em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); **3.** Introduction; **4.** Materials and Methods; **5.** Results; **6.** Discussion; **7.** Acknowledgments, se aplicável; **8.** Author contributions (se o artigo tiver mais de um autor); **9.** References; **10.** Legendas de figuras e tabelas, se aplicável. Artigos de algumas áreas, como por exemplo Ciências Matemáticas, devem seguir seu format padrão. Em alguns casos, pode ser aconselhável omitir a seção (4) e juntar as partes (5) e (6). Quando aplicável, a seção Materials and Methods deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em seres humanos ou as normas seguidas para tratamentos experimentais em animais.

Short

communications

Short communications procuram relatar uma **importante e concisa contribuição para pesquisa**, a qual progrediu para o estágio em que os resultados devem ser tornados públicos para outros pesquisadores do mesmo campo. Uma short communication também deve possuir Abstract (100 palavras ou menos, neste caso), uma pequena introdução (até 200 palavras) e não pode exceder 1500 palavras. Tabelas e Figuras podem ser incluídas no texto, mas este deve ser proporcionalmente reduzido. Este tipo de publicação nos AABC deve conter contribuições extremamente relevantes, sendo um tipo de artigo com alta competição.

Após recebimento e primeira triagem editorial, artigos serão avaliados por pelo menos dois revisores, sendo eles de instituições educacionais e/ou de pesquisa tanto nacionais quanto internacionais, desde que comprovada sua produção científica. Após possíveis correções e sugestões, o artigo pode ser aceito ou recusado, considerando os pareceres recebidos.

Nós utilizamos o programa integrado Crossref Similarity Check para detectar possíveis plágios.

Os AABC não possuem taxas de submissão, avaliação e publicação de artigos.

Preparação de manuscritos

Todas as seções do manuscrito devem possuir espaçamento duplo. Após o aceite, nenhuma mudança será feita no artigo, de modo que as provas de prelo precisem apenas de correções em erros tipográficos. Lembramos que o envio de artigos é feito exclusivamente pelos autores através do nosso sistema de gerenciamento de artigos.

Tamanho do artigo

Os artigos podem ser de qualquer tamanho necessário para a apresentação e discussão concisa dos dados, mas mantendo-se conciso e cuidadosamente preparado tanto em termos de impacto quanto de legibilidade. No entanto, artigos não devem exceder 50 páginas, incluindo todos os itens (figuras, tabelas, referências, etc.), a menos que possua autorização prévia do Editor-Chefe.

Página de rosto

A página de rosto do artigo deve apresentar os seguintes itens: **1.** Título do artigo com até 150 caracteres, sem abreviações e com a tentativa de manter o interesse amplo da comunidade científica; **2.** Nomes completos de todos os autores. Utilize números sobrescritos para indicar a filiação de cada autor. **3.** Endereços profissionais e ORCID de todos os autores, incluindo instituição, departamento, rua, número, CEP, cidade, estado e país; **4.** Key words (de 4 a 6 em ordem alfabética e separadas por vírgulas); **5.** Running title (versão resumida – e não abreviada - do título com até 50 caracteres, incluindo espaços); **6.** Seção dos AABC à qual o artigo pertence; **7.** Nome, endereço, telefone e e-mail do autor para correspondência, a quem serão enviadas as mensagens mais relevantes do processo de avaliação. Este autor ou autora deve ser indicado com um asterisco após seu nome.

Não cumprir com qualquer dos requisitos acima fará com que o artigo seja devolvido (*unsubmitted*) para correções.

Abstract

O abstract deve conter até 200 palavras e apresentar as principais descobertas do artigo, incluindo uma breve introdução, os objetivos do trabalho e uma conclusão baseada nas presentes descobertas. Caso os autores estejam submetendo uma revisão convidada/autorizada, o abstract deve abordar o principal tema da revisão e explicitar a contribuição de tal revisão à área. O abstract não deve possuir títulos nem citações/referências.

Texto do manuscrito

Todo o texto deve ser escrito com espaçamento duplo utilizando a fonte Times New Roman tamanho 12 ou equivalente, desde que mantida a legibilidade. Por favor, organize seu texto nas seguintes partes sempre que

possível: **1.** Página de rosto; **2.** Abstract (em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); **3.** Introduction; **4.** Materials and Methods; **5.** Results; **6.** Discussion; **7.** Acknowledgments, se aplicável; **8.** Author contributions (se o artigo tiver mais de um autor); **9.** References; **10.** Legendas de figuras e tabelas, se aplicável.

Artigos de algumas áreas, como por exemplo Ciências Matemáticas, devem seguir seu formato padrão. Em alguns casos, pode ser aconselhável omitir a seção (4) e juntar as partes (5) e (6). Quando aplicável, a seção Materials and Methods deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em seres humanos ou as normas seguidas para tratamentos experimentais em animais.

Todos os procedimentos devem ser detalhadamente descritos. Utilize inglês norte-americano para escrever o texto. Nomenclaturas da área de Química devem ser fornecidos de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Cepas de organismos também devem estar identificadas. Informe nomes de fornecedores de reagentes e/ou equipamentos. Utilize unidades e símbolos de acordo com o Bureau International des Poids et Mesures (SI) sempre que possível.

Acknowledgments

Devem ser incluídos ao fim do texto, antes das referências. Agradecimentos pessoais devem preceder nomes de instituições e agências. De forma ideal, notas de rodapé devem ser evitadas, mas, quando necessário, devem estar numeradas. Agradecimentos a financiamentos, subsídios, bolsas de estudo e dívidas com outros colegas, bem como menções à origem do artigo (como uma tese, por exemplo), devem estar nesta seção. Favor incluir o nome completo da agência de fomento, país e número do projeto (se aplicável).

Abreviações

Devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto por abreviações padrão e oficiais. Unidades e seus símbolos devem estar em conformidade com as aprovadas pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Legendas de figuras

Esta informação deve ser fornecida ao fim do manuscrito, após as referências. Todas as figuras devem conter legenda. A legenda deve possuir uma sentença introdutória que descreve as principais descobertas. Todas as divisões na figura devem ser identificadas com letras minúsculas, quando aplicável (1a, 2a, 2b, 3c, 3d, etc.). Quando for o caso da utilização de barras de erro, favor informar se um número que vem após o símbolo $\pm$ é um Standard Error Of Mean (SEM) ou standard deviation of mean (SD). Deve ser informado na legenda se o resultado apresentado representa N experimentos individuais.

Tabelas

Cada tabela deve possuir um pequeno título acima da mesma. Notas abaixo da tabelas também pode ser utilizadas. Tabelas devem ser citadas no artigo em algarismos romanos (Table I, Table II, Tables IV and V, etc.).

Tabelas devem ser submetidas separadamente em arquivos editáveis, preferencialmente .doc ou .docx.

Figuras

Só serão aceitas figuras de alta qualidade (mínimo de 300 dpi). Todas as ilustrações serão consideradas figuras, incluindo desenhos, gráficos, mapas, fotografias, esquemas, etc. Seu posicionamento tentativo deve ser indicado, assim como todas as figuras devem ser citadas com seu respectivo número ao longo do texto. Figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: **1.** Desenhos e ilustrações devem estar em formato .PS/.EPS ou .CDR (PostScript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; **2.** Imagens ou figuras em escala de cinza devem estar em formato .TIF e nunca inseridas no texto; **3.** Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; **4.** Figuras devem, a princípio, ser submetidas no tamanho em que espera-se que estejam publicadas no periódico, ou seja, largura de 8cm (uma coluna) ou 16,2cm (duas colunas), com a altura máxima de cada figura e respectiva legenda sendo menor ou igual a 22cm.

As legendas das figuras devem ser enviadas com espaçamento duplo em página separada. Cada dimensão linear dos menores caracteres e símbolos não pode ser menor que 2mm após redução. Figuras coloridas são aceitas tanto como figuras em preto e branco. No entanto, 5 figuras em p/b são sem custo aos autores, enquanto cada figura colorida na versão impressa será cobrada dos autores, com a comunicação sendo feita durante a fase de produção (após o processo de avaliação). De modo a padronizar a contagem e cobrança de figuras preto e branco, tabelas que ocupem dois terços da página ou que tenham mais que 12 colunas ou 24 colunas serão consideradas figuras p/b. Manuscritos de Matemática, Física ou Química podem ser redigidos em TEX, AMS-TEX ou LaTeX, desde que o arquivo .BIB seja enviado junto. Manuscritos sem fórmulas podem ser enviados em .RTF ou doc/docx para Windows.

Referências

Os autores são responsáveis pela exatidão das referências, bem como suas respectivas citações. Artigos publicados ou ainda 'In press' podem ser incluídos. Comunicações pessoais (Smith, personal communication) devem ser autorizadas por escritos pelos envolvidos. Referências a teses, abstracts de encontros (não publicados em jornais indexados) e manuscritos em preparação ou apenas submetidos, mas não ainda aceitos, devem ser citados no texto no formato (Smith et al., unpublished data) e NÃO devem ser incluídos na lista de referências.

Referências devem ser citadas no texto no formato a seguir sem a aspa simples, 'Smith 2004', 'Smith & Wesson 2005' ou, quando há 3 ou mais autores, 'Smith et al. 2006'. Quando houver dois ou mais artigos cujo nome do primeiro autor e ano de publicação são idênticos, as referências devem ser diferenciadas por letras minúsculas, como em 'Smith 2004a', 'Smith 2004b', etc.

As referências devem ser listadas alfabeticamente de acordo com o nome do primeiro autor, sempre na ordem SOBRENOME XY, sendo X e Y as iniciais. Se há mais de 10 autores na referência, usar SOBRENOME XY ET AL., sem listar os demais autores. Referências devem conter também o título do artigo. Os nomes dos periódicos devem estar abreviados sem itálico, pontos ou vírgulas. Para as abreviações corretas, verifique listas das maiores bases de dados nas quais o periódico está indexado, ou consulte a World List

of Scientific Periodicals. A abreviação a ser usada em referências dos Anais da Academia Brasileira de Ciências é **An Acad Bras Cienc**. Os seguintes exemplos devem servir de guias para sua lista de referências em nossa revista:

REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P & LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R & CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

KNOWLES RG & MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

PINTO ID & SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Livros e capítulos de livros

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W & BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.