

Citotoxicidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW Cytotoxic and antiparasitic activity of *Lygodium venustum* SW

Morais-Braga, Maria Flaviana B.¹; Souza, Teógenes .M.¹; Santos, Karla K.A.¹; Andrade, Jacqueline C.¹; Guedes, Gláucia M.M.¹; Tintino, Saulo R.¹; Souza, Celestina E.S.¹; Costa, José G.M.²; Saraiva, Antônio A.F.³; Coutinho, Henrique.D.M.^{1*}

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, ²Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, ³Laboratório de Paleontologia da Universidade Regional do Cariri, Crato, Brasil.

*hdmcoutinho@gmail.com

Recibido: 2 de agosto de 2012
Aceptado: 12 de marzo de 2013

Abstract. Infectious and parasitic diseases like leishmaniasis and Chagas disease have spreading recent decades to places not observed before. They are considered neglected by desolating poor countries and marginalized pharmacologically. There are not many options for the treatment and these drugs have shown significant toxicity contributing to the appearance of several side effects. Research on natural products has been shown to be an interesting alternative to the search for new drugs. *Lygodium venustum* is a cosmopolitan fern with latescence habit found on the Chapada do Araripe, considered by some American populations as a medicinal plant for the treatment of skin diseases, infections, fungal infections and trichomoniasis. This study evaluated its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*, as well as its cytotoxicity through trials *in vitro*. We tested the ethanolic extract and hexane fraction obtained from the leaves of *L. venustum* at different concentrations. For *in vitro* tests of *T. cruzi*, we used the clone CL-B5 and for *L. brasiliensis* we used promastigotes. The cytotoxicity assay was performed with strains of fibroblasts. *L. venustum* showed no antiparasitic activity clinically relevant in the form of crude ethanolic extractor as the hexane fraction against *Leishmania*. The hexane fraction showed an intermediate activity against *T. cruzi*, but the concentration of moderate effect has maximum cytotoxicity becoming unfeasible for clinical application. However, the cytotoxicity presented may be useful in research on antineoplastic activity in tumor cells.

Keywords: Fern; Leishmanicidal activity, Trypanocidal activity, Hexane fraction.

Resumo. Doenças parasitárias infecciosas como leishmaniose e doença de Chagas tem se difundido nas últimas décadas a locais onde antes não se observava sua ocorrência. São consideradas negligenciadas por assolarem países pobres e serem marginalizadas farmacologicamente. O tratamento não apresenta muitas opções de fármacos e estes demonstram relevante toxicidade contribuindo para o aparecimento de diversos efeitos colaterais. A pesquisa com produtos naturais tem se mostrado uma interessante alternativa para a procura por novos fármacos. *Lygodium venustum* é uma samambaia cosmopolita de hábito lianescente encontrada na encosta na Chapada do Araripe, considerada por algumas populações americanas como planta medicinal para o tratamento de dermatoses, infecções, micoses e tricomoníases. Neste estudo foi avaliada sua atividade antiparasitária contra *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma cruzi*, bem como sua citotoxicidade através de ensaios *n vitro*. Foram testadas a fração hexânica e o extrato etanólico obtido das folhas de *Lygodium venustum* em diferentes concentrações. Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 e para *Leishmania brasiliensis* foram utilizadas formas promastigotas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com linhagens de fibroblastos. *L. venustum* não apresentou atividade antiparasitária clinicamente relevante na forma de extrato etanólico bruto nem como fração hexânica contra *Leishmania*. A fração hexânica apresentou uma atividade intermediária contra *T. cruzi*, porém a concentração de efeito moderado possui citotoxicidade máxima tornando-se inviável para aplicação clínica. Entretanto, a citotoxicidade apresentada poderá ser útil em pesquisas sobre atividade antineoplásica em células tumorais.

Palavras-chave: Samambaia; Atividade leishmanicida; Atividade tripanocida. Fração hexânica.

INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas que acometem primordialmente os países em desenvolvimento tem sido a causa de morte de milhões de pessoas em todo o mundo. Estas doenças são negli-

genciadas e têm afligido a humanidade desde tempos imemoráveis e afetam principalmente comunidades marginalizadas, sem influência política, em áreas remotas, zonas de conflitos ou favelas urbanas onde há pouco ou ne-

nhum acesso à saúde ou outros serviços. A alta morbidade das doenças afeta a frequência escolar, o desenvolvimento cognitivo, o crescimento e a produtividade em geral (WHO 2003). Entre as doenças consideradas negligenciadas podemos citar a Doença de Chagas e Leishmaniose.

Ações vêm sendo realizadas no sentido de estabelecer metas por tempo limitado para o controle de algumas destas doenças mesmo diante de dificuldades como recursos financeiros limitados, falta de pessoal treinado e fraqueza ou carência de infraestrutura de saúde para alcançar as populações afetadas (WHO 2003). Além dos entraves impostos por estas situações, ainda há uma grande desafio que é chamar a atenção da indústria farmacêutica, diante do reduzido potencial de retorno lucrativo. Dessa forma, o conhecimento produzido pelas pesquisas não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas (Ministério da Saúde 2010). Portanto, além de estigmatizadas socialmente, as pessoas afetadas por estas doenças se vêm também marginalizadas farmacologicamente. A leishmaniose é uma doença prevalente em 88 países, em 4 continentes, estimando-se que cause 1,6 milhões de novos casos anualmente, dos quais cerca de 500.000 sejam visceral e 1,1 milhões cutânea ou mucocutânea (WHO 2010). Os agentes causadores dessa doença são parasitas unicelulares heteroxênicos do gênero *Leishmania* que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida: promastigota, quando estão infectando o inseto vetor e amastigota quando estão infectando o homem (Magill 1995; Michalick 2005).

Apresenta diversos tipos de manifestações clínicas e se dividem em dois grupos principais: a forma tegumentar, que pode ser cutânea localizada, que se caracteriza por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas; cutânea difusa, com lesões nodulares persistentes, no corpo inteiro; e mucocutânea ou cutâneo mucosa, que afeta de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato; e as formas viscerais, que se caracteriza pelo aumento no volume do fígado e baço, anemia, perda de peso e febre, e que, se não tratada a tempo, pode ser fatal (Grevelink e Lerner 1996; Herwaldt 1999; Hepburn 2000).

Apesar de sua alta toxicidade, os antimonial pentavalentes têm sido utilizados como dro-

gas de primeira escolha para tratamento da Leishmaniose. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosina são drogas de interesse por representarem novas alternativas terapêuticas, porém apresentam grandes problemas como efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação (Pereira *et al.* 2011). A Organização Mundial de Saúde (WHO 2010) recomenda que a leishmaniose visceral – que tem potencial de desenvolver resistência a drogas – seja tratada com combinação de medicamentos ao invés de monoterapia. Porém, desde 2009 foi recomendado que anfotericina B lipossomal seja utilizada como estratégia provisória até que as combinações possam ser implementadas.

A doença de Chagas é uma zoonose causada por *Trypanosoma cruzi*, que continua a persistir na Região das Américas, entretanto com a introdução de medidas de controle de vetores e transfusão de sangue mais segura, diminuiu-se o risco de transmissão e com isto, o número estimado de pessoas infectadas caiu de aproximadamente 20 milhões em 1981 para cerca de 10 milhões em 2009. Porém, devido a mobilidade da população ser cada vez maior, tem ocorrido o movimento da doença para áreas antes consideradas não-endêmicas, representando um desafio sério de saúde pública (WHO 2010).

As formas de transmissão de maior importância epidemiológica são a vetorial através de insetos hematófagos, os triatomíneos (barbeiros), a transfusional, a congênita e a oral (Coura *et al.* 2007). O *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo, envolvendo três formas evolutivas (tripomastigota, epimastigota e amastigota) e várias espécies de triatomíneos e de mamíferos, silvestres e domésticos, que atuam respectivamente, como vetores e reservatórios do parasito (Lana e Tafuri, 2005).

As doenças endêmicas parasitárias representam um grave problema médico, social e humano e sua prevenção, controle e tratamento representam um grande desafio mundial (Dias *et al.* 2009). Atualmente, os dois medicamentos usados para o tratamento são benzonidazol e nifurtimox, sendo que este último é contra-indicado em pacientes com antecedentes psiquiátricos ou distúrbios neurológicos (WHO 2010), tendo sido abolido em alguns países. Portanto, pesquisas por novos fármacos antiparasitários para o combate da leishmaniose e da doença de Chagas são urgentes e necessárias.

Neste trabalho, iremos verificar o potencial

leishmanicida e tripanocida, bem como a citotoxicidade de uma samambaia lianescente, *Lygodium venustum*, cujo uso popular tem sido relatado para o tratamento de dermatoses, infecções, micoses e tricomoníases (Duke 2008).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *L. venustum* foram coletadas em Crato, estado do Ceará, Brasil em maio de 2010. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva e depositado no Herbário Cariense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional do Cariri URCA, com o número 5569 HCDAL.

Preparação do extrato etanólico e fração hexânica das folhas de *L. venustum*

Folhas frescas de *L. venustum* (211,18 g) foram submersas em etanol 92% em temperatura ambiente durante 72 h. O extrato obtido foi filtrado e concentrado a vácuo em rotaevaporador a 60°C e 760 mmHg de temperatura e pressão, respectivamente, obtendo-se 12,42 g de extrato bruto. O fracionamento foi realizado tomando-se metade do extrato bruto, obtendo-se a fração hexânica com rendimento de 0,22 g. Foram diluídos 0,01 mg do extrato e da fração em dimetilsulfóxido (DMSO) para realização dos testes.

Linhagens celulares utilizadas

Para estudos *in vitro* de *T. cruzi*, cepas de parasito CL-B5 (clone CL-B5) foram usados. Os parasitos estavelmente transfectados com o gene β -galactosidase de *Escherichia coli* (LacZ) foram gentilmente cedidos pelo Dr. F. Buckner por meio do Instituto Comemorativo Gorgas (Panamá). Os epimastigotas foram cultivados a 28°C em infusão de fígado triptose (LIT) com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina como descrito anteriormente e colhidas durante a fase de crescimento exponencial.

Para o estudo da atividade leishmanicida *in vitro*, foi utilizado formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) a 26°C em Schneider's (meio para inseto) suplementado à 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana normal (v/v) mais penicilina e estreptomicina.

A linhagem de células utilizada no teste de citotoxicidade foi a de fibroblastos de mamífero NCTC clone 929. As células foram cultivadas

em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado a 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor (30 minutos a 56°C), penicilina G (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml). Para os experimentos, as células na fase pré-confluência foram colhidas com tripsina. Culturas de células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% umidificado CO₂.

Ensaio de susceptibilidade para as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*

O ensaio de rastreamento foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços (Sartstedt, Inc.) com culturas que não atingiram a fase estacionária, como descrito por Vega *et al* (2005). Epimastigotas foram semeadas a 1×10^5 por mililitro em 200 μ l, as placas foram então incubadas com os extratos a 28°C por 72 horas, momento em que 50 μ l de solução CPRG foram adicionados para dar a concentração final de 200 μ M, as placas foram incubadas a 37°C por mais 6 h adicionais e então lidas a 595 nm em espectrofotômetro. O Nifurtimox foi utilizado como droga de referência. Cada concentração foi testada em triplicata. Cada experimento foi realizado duas vezes separadamente. O percentual de inibição (%AE) foi calculado como segue: $\%AE = [(AE_AEB)/(AC_ACB)] \times 100$, onde AE = absorvância do grupo experimental; AEB = branco de compostos; AC = grupo controle de absorvância; ACB = branco de meio de cultura. As soluções dos extratos a ser analisado foram preparadas em dimetilsulfóxido, com a concentração final uma mistura água/DMSO jamais excedendo 0,2% do solvente final.

Ensaio de suscetibilidade para formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*

O ensaio foi realizado seguindo um método anteriormente descrito (Mikus e Steverding 2000 com modificações). Formas promastigotas ($2,5 \times 10^5$ parasitas/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços de plástico. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO). Diferentes diluições dos compostos de até 200 ml de volume final foram adicionados. Após 48 h a 26 °C, 20 ml de solução de resazurina foi adicionado e a oxidação-redução foi quantificada a 570 a 595 nm Cada concentração foi testada em triplicata. Em cada ensaio foi utilizado como controle drogas de referência. As porcentagens antipromastigotas (%AP) foram calculadas. A eficácia de cada composto foi determinada.

Ensaio de citotoxicidade

O procedimento para a medição de viabilidade celular foi avaliada com resazurina por método colorimétrico descrito anteriormente (Rólon *et al.* 2006). Fibroblastos NCTC929 foram semeados (5×10^4 células/ poço) em placas de microdiluição de fundo chato de 96 poços com 100 μ l de meio RPMI 1640. Deixou-se que as células pavimentassem as placas por 24 h a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi substituído por diferentes concentrações das drogas em 200 μ l de meio e, em seguida, foram incubados por mais 24 h. Controles de crescimento também foram incluídos. Posteriormente, um volume de 20 μ l da solução 2 mM de resazurina foi adicionado e as placas foram devolvidas à incubadora por outras 3 h para avaliar a viabilidade celular. A redução da resazurina foi determinada por medida de absorvância do comprimento de onda a 490nm e 595nm. Cada concentração foi testada três vezes. Meio e drogas controle foram usados em cada teste como brancos. A citotoxicidade de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de citotoxicidade (C%). A atividade tripanocida e a citotoxicidade foram testadas paralelamente, enquanto que a atividade leishmanicida foi testada somente nas concentrações em que não foram tóxicas às células de mamíferos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas a citotoxicidade de *Lygodium venustum* utilizando fibroblastos de mamíferos e a bioatividade antiparasitária contra as formas epimastigota de *T. cruzi* e promastigota de *L. brasiliensis*.

A forma epimastigota de *T. cruzi* apresenta-se de forma alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior. Podemos identificá-la como sendo a forma de replicação que se observa no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) localizada na porção posterior do intestino e em cultura em meio líquido (Chagas 1909; Rey 2001; Lana e Tafuri 2005). A forma promastigota de *Leishmania* possui flagelo único, núcleo no terço médio da célula e cinetoplasto em posição anterior (Michalick 2005). Estas formas presentes no hospedeiro invertebrado são englobadas por macrófagos de hospedeiros vertebrados (Michalick 2005).

De acordo com Castilhos (2008), estudos envolvendo *Leishmania spp* apresentam o foco na forma extracelular do parasito, conhecido

como promastigota, ao invés da forma amastigota, devido à facilidade de cultura *in vitro* e de não envolver outra cultura de células como macrófagos, por exemplo. Dessa forma, entende-se que o mesmo se pode dizer do *T. cruzi* e a forma epimastigota, ensaiada nesta pesquisa. Fibroblastos são células encontradas no tecido conjuntivo de mamíferos. Estas células têm sido geralmente escolhidas para realização de testes de citotoxicidade porque são de fácil manutenção e produzem resultados que apresentam alta correlação com os biológicos e ainda por estarem presentes em ferimentos, sendo o principal tipo de célula presente na regeneração (Ratner *et al.* 2004).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (Forbes e Forbes, 1994). Nesse sentido, os resultados podem fornecer informações valiosas para a triagem de produtos naturais que apresentem condições de serem considerados como prováveis candidatos a fármacos.

Leishmaniose e doença de Chagas são doenças cujo tratamento é feito com medicamentos considerados tóxicos, além disso, este tratamento tem sido dificultado pelo desenvolvimento da resistência pelos parasitos. A quimioresistência está muito presente em alguns países onde o fármaco não é mais utilizado com eficiência e novos estudos tiveram que ser conduzidos para o entendimento dos mecanismos de ação e compreensão da quimioresistência (Boibessot *et al.* 2002). Em busca de novos fármacos, pesquisas de produtos naturais com bioatividade antiparasitária e ausência ou uma baixa citotoxicidade vem sendo realizadas (Luize *et al.* 2005; Mesquita *et al.* 2005; Rojas *et al.* 2010).

Nos testes realizados, a citotoxicidade e a atividade tripanocida foram realizadas concomitantemente, observando-se o efeito do produto natural na medida em que se diminuía a sua toxicidade em fibroblastos (Tabela 1). De uma maneira geral, tanto o extrato como a fração foram extremamente tóxicos na concentração mais elevada do produto (1000 μ g/ml), sendo que a fração hexânica continuou demonstrando toxicidade máxima até a concentração de 250 μ g/ml. Na concentração em que não houve citotoxicidade, o efeito antiepigastigota foi irrelevante. O extrato demonstrou uma toxicidade menor se compararmos extrato e fração na concentração de 500 μ g/ml, entretanto o efeito

sobre formas epimastigotas foi abaixo de 50%. Diante dos resultados da citotoxicidade é que foram realizados os testes de suscetibilidade para a forma promastigota. Nenhuma atividade foi demonstrada pelo extrato e a fração hexânica demonstrou um efeito extremamente baixo (Tabela 2).

Segundo hipóteses mais recentes, metabólitos secundários de plantas seriam formados com a função de defender a espécie de predadores. Por isso, não é surpreendente que muitas plantas acumulem substâncias de elevada toxicidade. As substâncias tóxicas em uma planta podem estar limitadas a uma estação do ano ou a certas condições ambientais, ou ainda a certas variedades ou cultivares (Simões *et al.* 2010). Estudos mostram que o mecanismo de ação da citotoxicidade está relacionado à capacidade destas plantas de induzir apoptose celular (Block *et al.* 2004). Este foi o primeiro relato sobre a citotoxicidade da samambaia *Lygodium venustum*. A avaliação de sua bioatividade antiparasitária contra *T. cruzi* e *L. brasiliensis* também é pioneira na família Lygodiaceae.

CONCLUSÕES

L. venustum não apresentou atividade antiparasitária clinicamente relevante na forma de extrato etanólico bruto nem como fração hexânica contra *Leishmania*. A fração hexânica apresentou uma atividade intermediária contra *T. cruzi*, porém a concentração de efeito moderado possui citotoxicidade máxima tornando-se inviável para aplicação clínica. Os compostos químicos presentes no produto natural foram incapazes de afetar as formas de protozoários em concentrações de baixa toxicidade. Portanto, para o caso do *T. cruzi*, as concentrações em que demonstraram atividade moderada foram tóxicas sobre as células fibroblásticas e para o caso da *L. brasiliensis* os produtos naturais não foram ativos nas concentrações não tóxicas. Entretanto, a citotoxicidade apresentada poderá ser estudada sobre diferentes tipos de células, como por exemplo, com linhagens de células tumorais, com a finalidade de avaliar seu potencial como fonte promissora de metabólitos secundários anticancerígenos.

Tabela 1. Citotoxicidade e atividade antiepimastigota de extrato e fração de *Lygodium venustum*.

Produto natural	Conc. (µg/ml)	%C	± %DS	Conc.(µg/ml)	%AE	± %DS
EELV	1000	100	0,04	1000	25,45	2,98
	500	10,8	14,88	500	33,94	11,88
FHLV	1000	100	1,78	1000	63,14	2,93
	500	100	11,19	500	42,04	8,05
	250	100	10,84	62,5	5,01	9,05
	125	74,1	2,94	31,25	5,72	5,68
	62,5	0	4,66	15,62	2,87	3,71

EELV: Extrato etanólico de *Lygodium venustum*; FHLV: Fração hexânica de *L. venustum*; %C: percentual de citotoxicidade; %AE: percentual de atividade antiepimastigota

Tabela 2. Atividade antipromastigota de extrato e fração de *Lygodium venustum*.

Produto natural	Conc. (µg/ml)	%AP	± %DS
EELV	500	0,00	0,65
FHLV	62,5	2,61	1,86

EELV: Extrato etanólico de *Lygodium venustum*; FHLV: Fração hexânica de *L. venustum*; %AP percentual de atividade antipromastigota

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Block S., Gerkens, P., Peulen O., Jolois O., Mingeot-Leclercq M.P., De Pauw-Gillet M.C., Quetin-Leclercq J. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. *Anticancer Res.* 2005;25:363-368.
- Boibessot I., Turner C.M., Watson D.G., Goldie E., Connel G., McIntosh A., Grant M.H., Skellern G.G. Metabolism and distribution of phenanthridine trypanocides in *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop.* 2002; 84: 219-228.
- Castilhos P. Efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Uberlândia: Universidade federal de Uberlândia, 2008.
- Chagas C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1: 159-218.
- Coura J.R., Junqueira A.C.V., Carvalho-Moreira C.J., Borges-Pereira J., Albajar, P.V. Uma visão sistêmica da endemia chagásica. In: Silveira, A.C., editor. *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral.* Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud/Fundación Mundo Sano, 2007.
- Dias L.C., Dessoay M.A. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quím Nova.* 2009;32:2444-2457.
- Duke J.A. *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America.* New York: CRC Press Taylor & Francis group, 2008.
- Forbes V.E., Forbes T.L. *Ecotoxicology in theory and practice.* Londres: Chapman and Hall, 1994.
- Grevelink S.A., Lerner E.A. *Leishmaniasis.* *J Am Acad Dermatol.* 1996;34:257-272.
- Hepburn N.C. Cutaneous *Leishmaniasis.* *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:363-370.
- Herwaldt B.L. *Leishmaniasis.* *Lancet.* 1999;354:1191-1199.
- Lana M., Tafuri W.L. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. In: Neves, D.P. et al. *Parasitologia Humana.* São Paulo: Atheneu, 2005.
- Luize O.S., Tiunan T.S., Morello L.G., Maza P.K., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B.P., Cortez D.A.G., Mello J.C.P. Nakamura C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Ci Farma.* 2005; 41: 85-94.
- Magill A.J. Epidemiology of *Leishmaniasis.* *Dermatologia Clin.* 1995;13:5055-5023.
- Mesquita M.L., Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. Anti-*Leishmanial* and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 783-787.
- Michalick, M.S.M. Gênero *Leishmania*. En: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O.; Linardi, P.M., *Parasitologia humana.* 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005.
- Mikus J., Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using dye Alamar Blue®. *Parasitol Int.* 2000;48:259-265.
- Ministério da Saúde - Brasil. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. Texto de difusão técnico-científico do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Pú.* 2010;44:200-202.
- Pereira I.O., Sacramento L.V.S., Marques M.J. *Leishmanioses: "o estado da arte".* *Rev Univ Vale do Rio Verde.* 2011; 9:220-238.
- Ratner B., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 2nd Edition, New York: Elsevier Academic Press, 2004.
- Rey L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.* Terceira edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- Rojas J., Solís H., Palacios, O. Evaluación *in vitro* de La actividad anti *Trypanosoma cruzi*

de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *An Fac Med.* 2010;71:161-165.

Rolón M., Seco E., Vega C, Nogal J.J., Escario J.A., Gomez-Barrio A. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28:104-109.

Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Sexta edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

Vega C., Rolon M., Martínez-Fernandez A.R., Escario J.A., Gomez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma*

cruzi epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res.* 2005;95:296-298.

World Health Organization. International Workshop, Intensified control of neglected diseases, Summary Report. 2011 Dezembro [consulta em 15 de dezembro de 2011] Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_CEE_2004.45.pdf>.

World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2011 Dezembro [consulta em 15 de dezembro de 2011]. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf> .