

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Produtos naturais com potencial
leishmanicida**

Teresa Isabel Miranda Júlio

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2020

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Produtos naturais com potencial leishmanicida

Teresa Isabel Miranda Júlio

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientadora: Professora Auxiliar, Doutora Rita Maria Olivença
Trindade dos Santos Serrano**

2020

Resumo

A Leishmaniose é uma doença provocada por protozoários do género *Leishmania*, transmitida ao ser humano e a outros mamíferos através da picada de flebotomíneos fêmeas infetados. É endémica ao nível das regiões tropicas, subtropicais e no Sul da Europa, mas de modo predominante nos países em desenvolvimento, sendo considerada uma doença negligenciada. A disseminação para outras regiões geográficas é possível, sendo as alterações climáticas associadas ao aquecimento global um dos fatores que pode predispor para que tal ocorra.

A Leishmaniose pode ser classificada como: cutânea, com manifestações clínicas que podem variar desde uma única lesão na pele, até numerosas lesões com ou sem ulceração associada; mucocutânea, em que se constata lesões invasivas e destrutivas da mucosa nasofaríngea, podendo causar desfiguração permanente com prognóstico reservado; visceral, a forma clínica mais grave que afeta o fígado, baço e medula óssea, e que na ausência de tratamento é fatal.

Ainda não existe uma vacina comercializada e o arsenal terapêutico atual assenta principalmente na utilização de derivados antimoniais pentavalentes, anfotericina B e a sua formulação lipossomal, pentamidina, miltefosina e paromomicina. Este reduzido arsenal terapêutico está associado a emergente resistência dos parasitas, eficácia variável, efeitos secundários graves, extensa duração do tratamento, elevados custos e vias de administração que não são práticas, condicionando a adesão terapêutica. É necessário desenvolver alternativas à terapêutica convencional, menos tóxicas e de acesso viável às populações mais afetadas, que são geralmente as mais desfavorecidas economicamente. É neste âmbito que surge a importância do estudo de produtos naturais que apresentem potencial para ultrapassar as limitações da terapêutica atual. Nesta monografia efetuou-se a abordagem de formas clínicas da Leishmaniose, terapêutica convencional e as suas limitações e de produtos naturais de origem vegetal com potencial leishmanicida que representam uma oportunidade enquanto alternativas para o tratamento desta doença. A análise destes produtos naturais de origem vegetal, baseada nos estudos científicos publicados, incidiu sobre as suas propriedades, atividade leishmanicida, mecanismo de ação e toxicidade.

Palavras-chave: Leishmaniose; *Leishmania*; produtos naturais; leishmanicida; origem vegetal

Abstract

Leishmaniasis is a disease provoked by protozoans of genus *Leishmania*, transmitted to humans and other mammals through the bite of infected sandflies females. It is endemic in the tropics, subtropical regions and Southern Europe, but predominantly in developing countries, being considered a neglected disease. Dissemination to other geographic regions is possible, with climate change associated with global warming being one of the factors that can predispose this to occur.

Leishmaniasis can be classified as: cutaneous, with clinical manifestations that can vary from a single lesion on the skin, to numerous lesions with or without associated ulceration; mucocutaneous, in which invasive and destructive lesions of the nasopharyngeal mucosa are found, that can cause permanent disfigurement with a poor prognosis; visceral, the most serious clinical form that affects the liver, spleen and bone marrow, and which in the absence of treatment is fatal.

There is still no commercialized vaccine and the current therapeutic arsenal is based mainly on the use of pentavalent antimonial compounds, amphotericin B and its liposomal formulation, pentamidine, miltefosine and paromomycin. This reduced therapeutic arsenal is associated with the emergence of parasite resistance, variable efficacy, serious side effects, extensive treatment duration, high costs and routes of administration that are not practical, conditioning therapeutic adherence. It is necessary to develop alternatives to conventional therapy, less toxic and with viable access to the most affected populations, which are generally the most economically disadvantaged. It is in this context that the importance of studying natural products that have the potential to overcome the limitations of current therapy arises. This monograph approached the clinical forms of Leishmaniasis, conventional therapy and its limitations, and natural products of plant origin with leishmanicidal potential that represent an opportunity as alternatives for the treatment of this disease. The analysis of these natural products of plant origin, based on published scientific studies, focused on their properties, leishmanicidal activity, mechanism of action and toxicity.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania*; natural products; leishmanicidal; plant origin

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Rita Maria Olivença Trindade dos Santos Serrano pela sua compreensão, disponibilidade e ajuda. Agradeço também à minha família pelo apoio.

Abreviaturas

CC₅₀ – Concentração Citotóxica para 50% das células

CE₅₀ – Concentração Eficaz de 50%

CI₅₀ – Concentração Inibitória de 50%

CDC – Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*

DE₅₀ – Dose Efetiva de 50%

DE₉₀ – Dose Efetiva de 90%

DL₅₀ – Dose Letal de 50%

EGCG - Epigallocatequina-3-galato

IM - Intramuscular

IV – Intravenosa

kg - kilograma

mg - miligrama

mL – mililitro

mM- milimolar

MTT – Ensaio de viabilidade celular

OMS – Organização Mundial da Saúde

SI – Índice de Seletividade, do inglês *Selection Index*

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

µg - Micrograma

µM – Micromolar

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 10 |
| 1.1 Leishmaniose..... | 10 |
| 1.2 Etiologia..... | 10 |
| 1.3 Ciclo de vida do agente etiológico..... | 10 |
| 1.4 Hospedeiros..... | 11 |
| 1.4.1 Vetor..... | 11 |
| 1.4.2 Vertebrados..... | 11 |
| 1.5 Epidemiologia e Fatores de risco..... | 11 |
| 1.6 Importância dos produtos naturais enquanto alternativas terapêuticas..... | 12 |
| 2. Objetivo..... | 14 |
| 3. Materiais e métodos..... | 15 |
| 4. Formas clínicas..... | 16 |
| 4.1. Leishmaniose Cutânea..... | 16 |
| 4.1.1 Leishmaniose Cutânea Localizada..... | 16 |
| 4.1.2 Leishmaniose Cutânea Disseminada..... | 17 |
| 4.1.3 Leishmaniose Cutânea Difusa..... | 17 |
| 4.1.4 Leishmaniose Cutânea Recidiva..... | 17 |
| 4.2 Leishmaniose Mucocutânea..... | 17 |
| 4.3 Leishmaniose Visceral..... | 18 |
| 4.3.1 Leishmaniose Dérmica Pós-kala-azar..... | 18 |
| 4.3.2 Co-infecção Leishmaniose-VIH..... | 19 |
| 5. Tratamento..... | 19 |
| 5.1 Antimoniais pentavalentes..... | 20 |
| 5.2 Anfotericina B..... | 20 |
| 5.3 Miltefosina..... | 21 |
| 5.4 Paromomicina..... | 21 |
| 5.5 Pentamidina..... | 22 |
| 5.6 Outras abordagens terapêuticas..... | 22 |
| 6. Produtos naturais de origem vegetal com potencial leishmanicida..... | 23 |
| 6.1 Aloe barbadense e extrato de <i>Aloe vera</i> | 23 |
| 6.2 Epigallocatequina-3-galato (<i>Camellia sinensis</i>)..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 6.3 Curcumina (<i>Curcuma longa</i>)..... | 25 |
| 6.4 Carifenona A, isouliginosina B e uliginosina B (<i>Hypericum</i>)..... | 26 |
| 6.5 Flavopereirina (<i>Geissospermum vellosii</i>)..... | 27 |
| 6.6 Guaiol e óleo essencial de <i>Aloysia gratissima</i> | 28 |
| 6.7 Fisalinas e extrato de <i>Physalis angulata</i> | 28 |
| 7. Conclusões..... | 30 |
| 8. Referências Bibliográficas..... | 31 |

1. Introdução

1.1. Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença parasitária provocada por protozoários de *Leishmania*, existindo várias espécies que podem causar a infecção. A transmissão ao ser humano ocorre através da picada de vetores flebotomíneos fêmeas infetados. Verifica-se de modo predominante nos países em desenvolvimento, sendo considerada uma doença tropical negligenciada, com significativa morbilidade e mortalidade. (1)

1.2. Etiologia

Relativamente à etiologia da leishmaniose, os agentes responsáveis por esta doença são protozoários que pertencem à família *Trypanosomatidae* e ao género *Leishmania*, existindo 53 espécies, das quais 20 são patogénicas para o ser humano. (2)

Apesar da transmissão ocorrer maioritariamente através dos flebotomíneos fêmeas, algumas espécies de parasitas de *Leishmania* também podem ser transmitidos por outras vias, nomeadamente através de transfusões de sangue, partilha de seringas contaminadas, transmissão congénita e transplante de órgãos. (3,4)

1.3. Ciclo de vida do agente etiológico

O começo do ciclo biológico do parasita ocorre com a picada do flebotomíneo do sexo feminino infetado no hospedeiro vertebrado, aquando a ingestão de sangue, constatando-se a inoculação da forma promastigota, que corresponde à fase infecciosa, presente na probóscide do inseto. Os macrófagos, assim como outras células do sistema mononuclear fagocitário, procedem rapidamente à fagocitose dos promastigotas, que sofrem de seguida diferenciação no interior das células, originando as formas amastigotas. Estas formas intracelulares multiplicam-se e disseminam a infecção para outras células do sistema mononuclear fagocitário. Quanto aos flebotomíneos do sexo feminino que não padecem da infecção, ao efetuarem a refeição de sangue no hospedeiro vertebrado infetado, ingerem células infetadas com amastigotas, que ao

atingirem o intestino, transformam-se em promastigotas, reproduzindo-se sucessivamente por divisão binária, ocorrendo posteriormente a migração para a probóscide. (3)

1.4. Hospedeiros

1.4.1 Vetor

Os vetores naturais dos protozoários de *Leishmania* são flebotomíneos fêmeas, insetos que pertencem à família *Psychodidae* e ao género *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. (5)

1.4.2. Vertebrados

Os hospedeiros vertebrados compreendem, para além dos humanos, vários mamíferos, selvagens e domésticos, sendo os cães os animais mais importantes ao nível da epidemiologia da Leishmaniose. (5,6) Nem todos os humanos ou animais que estão infetados apresentam sintomas e por isso apesar de aparentarem estar saudáveis têm capacidade de potencialmente infetar o flebotomíneo, constituindo reservatórios da doença, sendo que existem mais casos de infeções assintomáticas do que com manifestações clínicas. (7)

1.5. Epidemiologia e fatores de risco

A Leishmaniose afeta populações humanas em todos os continentes, excluindo a Antártida e a Austrália. Verifica-se em cerca de 90 países, ao nível de regiões tropicais, subtropicais e no Sul da Europa. (3) Ocorre predominantemente em África, Ásia e América Latina. (1)

No âmbito do programa global da Leishmaniose para 2018 da OMS, mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral reportados advieram de 7 países: Índia, Brasil, Quênia, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul e Somália. Em relação à leishmaniose cutânea, 85% dos casos reportados

tiveram origem nos seguintes países: Colômbia, Perú, Brasil, Afeganistão, Argélia, Tunísia, Paquistão, Iraque, República Islâmica do Irão, República Árabe da Síria e Bolívia. (1)

Quanto à leishmaniose mucocutânea, praticamente 90% dos casos constata-se nos países Perú, Bolívia e Brasil. (1)

A Leishmaniose afeta predominantemente populações economicamente desfavorecidas e está associada a diversos fatores, nomeadamente condições habitacionais precárias, deficiente nutrição e sistema imunitário debilitado. (1) A sua ocorrência é mais comum nas zonas rurais, mas também se verifica nos subúrbios das cidades. (3)

A prevalência desta doença está significativamente relacionada com fatores ecológicos, destacando-se a deflorestação e alterações climáticas associadas ao aquecimento global, alterações essas que podem conduzir à sua disseminação para outras regiões geográficas. (3,4) A expansão da Leishmaniose também pode ser favorecida por viagens a áreas tropicais e subtropicais, assim como o transporte de cães oriundos de zonas endémicas para zonas não endémicas. (4)

O diagnóstico assim como o tratamento tardio também são relevantes para a propagação da doença uma vez que pessoas e animais infetados não tratados constituem reservatórios para os parasitas e possibilitam a transmissão da doença. (4)

A extensiva utilização de fármacos da medicina humana para tratar a leishmaniose canina pode ser um fator a considerar na emergência de parasitas resistentes. (4)

Em relação a Portugal, os focos endémicos correspondem à Região Metropolitana de Lisboa, península de Setúbal, região do Alto-Douro e Algarve. Verifica-se sobretudo a estados de imunossupressão, nomeadamente infeção pelo VIH, e em crianças. As formas clínicas mais comuns são a cutânea e principalmente a visceral. (7,8,9) As prevalências da Leishmaniose canina e Leishmaniose felina, embora esta menos significativa, têm um papel importante na perpetuação da endemia da Leishmaniose humana. (7,8,4)

1.6. Importância dos produtos naturais enquanto alternativas terapêuticas

A terapêutica farmacológica atual da Leishmaniose está associada a significativa toxicidade, eficácia variável, custos elevados e a emergência de resistência por parte dos parasitas. (10) A procura por alternativas menos tóxicas e de fácil acesso a populações economicamente desfavorecidas, que são de um modo geral mais afetadas pela doença, é

impreterível. É neste contexto que surge a importância de realizar estudos que avaliem o potencial dos produtos naturais enquanto possíveis fontes de substâncias com atividade biológica. (11)

Esta monografia incidiu nas formas clínicas da Leishmaniose, do arsenal terapêutico atual e as suas limitações e na análise de produtos naturais de origem vegetal e do seu potencial reportado em estudos científicos publicados, que podem representar alternativas terapêuticas para a Leishmaniose.

2. Objetivo

O objetivo da presente monografia consiste em proceder a uma revisão bibliográfica que incida maioritariamente em contribuições recentes de artigos científicos sobre produtos naturais, essencialmente de origem vegetal, que possuem atividade leishmanicida, possibilitando assim mostrar o potencial que estes apresentam para o desenvolvimento de novos fármacos no tratamento da leishmaniose.

3. Materiais e métodos

A presente monografia foi redigida com base na revisão de artigos científicos encontrados nas plataformas Pubmed, Google Scholar, PLOS Neglected Tropical Diseases e na consulta das páginas eletrônicas oficiais da OMS, do CDC e da Acta Médica Portuguesa. Na pesquisa foram utilizados descritores como leishmaniose, *Leishmania*, produtos naturais, plantas medicinais, atividade leishmanicida, potencial leishmanicida e anti-Leishmania e os seus correspondentes em inglês. Foram incluídos no estudo os artigos que apresentavam informação pertinente acerca da utilização de plantas medicinais com ação leishmanicida. Excluíram-se os artigos que não eram relativos à doença na espécie humana.

4. Formas clínicas

A expressão clínica da Leishmaniose depende da espécie do protozoário, da localização deste ao nível da pele ou em órgãos profundos e ainda do historial clínico do hospedeiro. Considerando as manifestações clínicas, pode ser classificada como visceral, cutânea ou mucocutânea. (5,12)

4.1 Leishmaniose Cutânea

A Leishmaniose cutânea apresenta como subtipos Leishmaniose cutânea localizada, Leishmaniose cutânea disseminada, Leishmaniose cutânea difusa e Leishmaniose cutânea recidiva, sendo os três últimos raros. (3,13)

Pode ser originada por diversas espécies de *Leishmania*, com diferentes manifestações clínicas, que podem variar desde uma única lesão na pele, que pode ter resolução espontânea, até numerosas lesões com ou sem ulceração, que podem ocorrer apenas ao nível da pele ou verificar-se também envolvimento da mucosa, com tratamento difícil. (5)

4.1.1 Leishmaniose Cutânea Localizada

A Leishmaniose cutânea localizada é a apresentação mais comum, cujos agentes causais incluem *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. panamensi* e *L. major*. Caracteriza-se por pápula no local da picada, semanas ou meses depois da exposição, evoluindo para nódulo e ocorrendo posteriormente ulceração lenta. A presença de várias lesões comumente indicam picadas distintas, apesar de ser possível suceder devido a disseminação linfática. Geralmente as lesões são indolores, no entanto, se houver infeção bacteriana presente pode haver dor. A existência de prurido pode ocorrer, apesar de não ser frequente. Não é potencialmente fatal e tem resolução espontânea, que pode demorar meses ou mesmo anos, sendo que origina tipicamente cicatriz atrófica permanente, com conseqüente estigma social e internalizado. (3,13-15)

4.1.2 Leishmaniose Cutânea Disseminada

A Leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada pela presença de dez ou mais lesões que se observam em duas ou mais áreas do corpo, sendo comum afetar a mucosa. (13)

4.1.3 Leishmaniose Cutânea Difusa

A Leishmaniose cutânea difusa tem como agentes etiológicos *L. aethiopica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis*. Nesta forma clínica observa-se lesão inicial não ulcerativa, constatando-se várias pápulas e nódulos extensamente disseminados na pele, podendo afetar também as membranas mucosas, apesar de menos comum. Verifica-se uma significativa infiltração de parasitas na derme e ausência de resposta imunológica celular. Não tem cura espontânea e o tratamento é extremamente difícil. (13,15)

4.1.4 Leishmaniose Cutânea Recidiva

A Leishmaniose recidiva surge após recaída de Leishmaniose cutânea ou reabertura da cicatriz onde se localizava a lesão. Caracteriza-se pelo aparecimento de novas lesões significativamente infiltradas com linfócitos ao redor da antiga cicatriz, que podem gradualmente disseminar-se. (13,15)

4.2 Leishmaniose Mucocutânea

A Leishmaniose mucocutânea tem como agentes causais *L. panamensis*, *L. guyanensis* e predominantemente *L. braziliensis*. Aproximadamente 90% dos indivíduos apresentam cicatriz cutânea sugestiva de história prévia de Leishmaniose cutânea, que pode ter acontecido vários anos antes. É caracterizada por lesões invasivas e destrutivas da mucosa nasofaríngea. Geralmente o início das lesões ocorre ao nível da mucosa nasal e é comum o indivíduo apresentar agravamento de congestão nasal e epistaxis. Verifica-se a disseminação para a mucosa oral, podendo provocar odinofagia. Também pode atingir a faringe e laringe, podendo causar perturbações na fonação. Eventualmente pode suceder destruição dos pilares do palato, amígdalas e úvula. Esta forma clínica é potencialmente mutilante, podendo causar desfiguração permanente, com conseqüente estigma psicossocial, e com um prognóstico muito reservado em

que pode ocorrer o óbito do indivíduo, sendo de extrema importância diagnóstico e tratamento rápidos. (13,15)

4.3 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose visceral, também denominada Kala-azar, tem como agentes causais *L. donovani*, a espécie maioritariamente presente na China, costa oriental de África, Índia e Bangladesh, e *L. infantum*, a principal espécie no Norte de África, América Latina, Médio Oriente e Sul da Europa, sendo a única responsável por esta forma clínica em Portugal. (9, 12)

É considerada uma infeção oportunista que surge geralmente em regiões endémicas em hospedeiros imunossuprimidos, observada principalmente em casos de infeção VIH. (9) Afeta o fígado, baço e medula óssea, e é caracterizada principalmente por esplenomegalia e febre irregular que persiste. (3,13) É também comum verificar-se perda ponderal, hepatomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinémia. (13) Apresenta ainda outras manifestações clínicas em que se incluem anemia, palidez, astenia, trombocitopenia, pigmentação da pele e especificamente em crianças constata-se diarreia crónica e atraso no crescimento. (13,15) A hiperpigmentação cutânea, no subcontinente indiano, conduziu à designação Kala-azar, que significa febre negra. A infeção pode tornar-se sintomática apenas meses depois da exposição ou até mesmo anos quando os indivíduos se tornam imunocomprometidos. (13)

A Leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave e na ausência de tratamento é fatal. Infeções bacterianas secundárias e hemorragia grave despoletada pela trombocitopenia são exemplos de complicações comuns que levam ao óbito. (13-15)

4.3.1 Leishmaniose Dérmica Pós-kala-azar

A Leishmaniose dérmica pós-kala-azar é uma complicação tardia que ocorre depois ou durante o tratamento da leishmaniose visceral em que *L. donovani* se destaca como agente etiológico, na maior parte das vezes. Constata-se raramente em indivíduos infetados com *L. infantum* e quando sucede está de um modo geral associado a estados de imunossupressão. Afeta pessoas em todas as regiões endémicas para *L. donovani*., mas observa-se predominantemente em Bangladesh e Sudão. (13,16)

As manifestações clínicas são lesões ao nível da pele, que podem ser máculas hipopigmentadas ou eritematosas, pápulas, placas ou nódulos, que se verificam acentuadamente na face, em redor da boca, e no tronco, podendo ocorrer a disseminação para todo o corpo. (13) Nesta forma clínica há propagação e persistência dos parasitas na pele, e por isso, indivíduos com estas lesões podem ter um papel relevante enquanto reservatórios da infeção. (3,13)

4.3.2 Co-infeção Leishmaniose-VIH

Uma das maiores dificuldades que existe no controlo e na terapêutica da leishmaniose visceral é a co-infeção com o VIH. O risco de adquirir leishmaniose visceral nas regiões endémicas é aproximadamente 100 a 1000 vezes maior na presença de infeção VIH. Os indivíduos com ambas infeções apresentam maior probabilidade de desenvolvimento de leishmaniose visceral com manifestações clínicas atípicas, assim como alto risco de comprometimento de terapêutica e recidiva da doença parasitária. Por outro lado, a leishmaniose visceral favorece a progressão clínica de SIDA, causando um incremento na mortalidade dos indivíduos infetados por VIH. (9,13,17)

5. Tratamento

O regime terapêutico depende de fatores inerentes ao hospedeiro e ao parasita, nomeadamente a espécie. A área geográfica também influencia a efetividade da estratégia terapêutica escolhida. Grávidas, mulheres a amamentar, crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos necessitam de uma abordagem terapêutica diferente, com ajustes nos fármacos e dosagens. No caso dos indivíduos co-infetados com VIH, é necessário tratamento de maior duração, maior dosagem e pode ser instituída profilaxia secundária. A forma clínica também é importante aquando seleção da estratégia terapêutica a utilizar sendo que, de um modo geral, considera-se que os indivíduos com Leishmaniose mucocutânea ou Leishmaniose visceral precisam de tratamento, porém nem todos os doentes com Leishmaniose cutânea necessitam de ser tratados. (3)

O arsenal terapêutico atual apresenta várias desvantagens, nomeadamente emergente resistência dos parasitas, efeitos secundários graves e adesão reduzida ao tratamento motivada pela extensa duração do mesmo e formas de administração que não são práticas, originando falhas no tratamento e reincidências. (14)

Ainda não existe uma vacina comercializada e a terapêutica farmacológica assenta principalmente na utilização dos seguintes fármacos: derivados antimoniais pentavalentes, anfotericina B e a sua formulação lipossomal, pentamidina, miltefosina e paromomicina. (18-20)

5.1 Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estiblogluconato de sódio, têm sido utilizados amplamente durante várias décadas no tratamento sistémico de todas as formas clínicas de Leishmaniose por via IV ou IM. A sua utilização também tem sido importante em regimes de tratamento local através de injeção intralesional na Leishmaniose cutânea. (13,15)

Dependendo do sistema imunitário do indivíduo e da sensibilidade da espécie do parasita, a taxa de cura pode ser cerca de 80%-100%, porém pode ser afetada por falhas na terapêutica. (21) A administração parental associada a uma longa duração de tratamento pode conduzir a uma fraca adesão terapêutica, que conseqüentemente pode levar ao aumento da resistência dos parasitas, cuja emergência tem sido reportada em várias regiões geográficas endémicas, sendo que no subcontinente indiano estes fármacos já não são utilizados na terapêutica de Leishmaniose, devido à sua ineficácia nesta localização. (5,9,20)

Estes medicamentos podem causar pancreatite aguda, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, podendo induzir arritmias. (11) Outros efeitos secundários descritos incluem dor no local de administração, náuseas, vômitos, dor abdominal, mialgia e artralgia. (15)

5.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico utilizado como antifúngico com atividade leishmanicida que tem uma taxa de cura de aproximadamente 97% na Leishmaniose, administrado por via IV. (20,21) Apresenta boa resposta em doentes imunodeprimidos, porém a ocorrência de recaídas nesta população é elevada. Este fármaco é efetivo inclusive nas formas resistentes a antimoniais pentavalentes. (15)

Uma das suas desvantagens é a reduzida biodisponibilidade oral, não sendo por isso administrada oralmente. (21) Os efeitos secundários incluem arrepios, hipertensão, hipotensão, febre e pode provocar nefrotoxicidade. (5, 20, 21) A formulação lipossomal da anfotericina B,

Ambisome, permitiu diminuir a toxicidade e os efeitos adversos do fármaco e manter elevada eficácia no tratamento de todas as formas de infecção por *Leishmania*. (20, 21) No entanto, o alto custo é um fator limitante da sua utilização nos países em desenvolvimento, onde existe maior necessidade deste medicamento nos regimes terapêuticos, não só por nestes países se verificar a localização da maioria das áreas endêmicas, mas também devido ao aumento da resistência dos parasitas aos antimoniais pentavalentes. (5, 21)

Comparativamente com os antimoniais pentavalentes, a utilização de anfotericina B lipossômica possibilita abordagens terapêuticas com eficácia mais elevada e menor duração, menos dias de internamento hospitalar e redução dos efeitos adversos, nomeadamente da nefrotoxicidade. Contudo, devido aos seus custos, a anfotericina B lipossômica é considerada na terapêutica de Leishmaniose visceral como terapêutica de eleição nos países desenvolvidos que podem suportar os custos que acarreta. (9)

5.3 Miltefosina

A miltefosina, fármaco originalmente desenvolvido enquanto antineoplásico, é atualmente utilizado em alguns regimes terapêuticos de Leishmaniose visceral, Leishmaniose dérmica pós-kala-azar, Leishmaniose mucocutânea e Leishmaniose cutânea. (11, 13) Especialmente interessante para o tratamento da Leishmaniose visceral, constatando-se taxas de cura de cerca de 90%-95% em imunocompetentes. Na co-infecção com VIH, a sua utilização ainda é reduzida, porém existem casos reportados deste medicamento ter sido a única terapêutica eficaz. Contudo, alguns estudos têm indicado que nem todas as espécies do parasita são igualmente suscetíveis à sua ação e a existência de resistência por parte do protozoário. (18, 21) A desvantagem mais importante que acarreta é o seu potencial teratogénico, que limita a sua utilização. (9, 18, 21) A sua utilização está associada a reações adversas gastrointestinais nomeadamente náusea, dor abdominal e diarreia. (21) Apresenta como principais vantagens a administração por via oral e um custo mais acessível do que a anfotericina B lipossômica. (9)

5.4 Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que pode ser incluído na estratégia terapêutica de indivíduos com Leishmaniose visceral, Leishmaniose cutânea e Leishmaniose dérmica pós-Kala-azar. (13, 21) A sua utilização tem como vantagem permitir simultaneamente o tratamento de coinfeções bacterianas. Pode originar nefrotoxicidade e ototoxicidade. (11)

Apresenta também como desvantagens má absorção e requerer administração por via IM. (20) No entanto, foram desenvolvidas formulações tópicas, para terapêutica da Leishmaniose cutânea, cuja eficácia demonstrou ser variável consoante a espécie do parasita presente. (11)

5.5 Pentamidina

A pentamidina é um fármaco que pode ser utilizado em alguns regimes terapêuticos sistêmicos para casos de Leishmaniose mucocutânea, Leishmaniose cutânea e Leishmaniose visceral, com uma eficácia que apresenta valores entre 70%-100%. (13, 21) No entanto, acarreta elevada toxicidade gastro-intestinal e cardíaca, o que limita o seu uso na abordagem terapêutica. (21) É administrada por via IM profunda ou via IV e os efeitos secundários incluem dor e abcesso no local de administração, hipotensão, hipoglicemia, hiperglicemia, síncope, náuseas e vômitos. Foram reportados casos de desenvolvimento de Diabetes Mellitus. (11,21)

5.6 Outras abordagens terapêuticas

Determinados casos de Leishmaniose cutânea podem ser considerados para regimes terapêuticos locais, nomeadamente termoterapia, crioterapia com nitrogénio líquido, formulações tópicas de paromomicina e administração de injeção intralesional de estibuclonato de sódio. (3)

A combinação de crioterapia e antimoniais pentavalentes apresenta taxas de curas superiores comparativamente a qualquer um destes dois tratamentos isoladamente. (13)

A utilização de antifúngicos, tais como itraconazol e cetoconazol, combinado ou não com crioterapia, também é uma possível abordagem terapêutica, tendo-se verificado boa resposta em casos cujo agente etiológico é *L. mexicana*. (15)

A estratégia de termoterapia enquanto tratamento baseia-se na sensibilidade ao calor dos amastigotas, tendo já sido reportadas taxas de cura elevadas em infeções causadas por *L. tropica* e *L. major*. Porém, não se tem verificado replicação dos resultados de forma consistente. (13)

6. Produtos naturais de origem vegetal com potencial leishmanicida

Diversos compostos de origem natural com potencial leishmanicida são reportados em múltiplos estudos, incluindo quinolonas, alcaloides, iridoides, terpenoides, compostos fenólicos e outros metabolitos. (22) Vários extratos de plantas com atividade leishmanicida também têm sido estudados, podendo a utilização destes ter como vantagens a presença de diferentes substâncias que juntas ultrapassam a atividade do composto ativo isolado, verificando-se um efeito sinérgico. (11)

Foram selecionados alguns produtos naturais de origem vegetal com potencial terapêutico interessante, que são de seguida apresentados.

6.1. Aloe barbendol e extrato de *Aloe vera*

A espécie *Aloe vera* é uma das várias espécies do género *Aloe*, pertencente à família Liliaceae. É possível encontrar o género *Aloe* na maioria das regiões geográficas. *Aloe vera* é uma planta medicinal versátil que possui várias propriedades de interesse terapêutico, nomeadamente antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, hipolipidémica e hipoglicémica, que advêm, maioritariamente, do gel que se encontra no interior das folhas e de um amplo espetro de substâncias com atividade biológica. (23)

Tariq et al. (2019) efetuaram um estudo em que determinaram a atividade leishmanicida *in vitro* de diferentes frações da folha de *Aloe vera* em relação a uma estirpe de *L. tropica*. Verificou-se potencial leishmanicida em quatro frações em que se incluíam uma cromona, um derivado de antraquinona, uma antrona e o ácido cinâmico, destacando-se especialmente a fração correspondente ao composto Aloe barbendol, uma antrona, que causou 95% de mortalidade dos parasitas. Esta fração foi também a que apresentou menor valor de DL₅₀ de 0,5305 ug/mL. (23)

Dutta et al. (2008) realizaram um estudo em que identificaram no exsudado das folhas de *Aloe vera*, cianidinas, proantocianidinas, triterpenos, alcaloides, saponinas e taninos. Sabe-se que as saponinas são tóxicas para os monócitos e nesse contexto decidiram fazer o estudo da toxicidade do exsudado da folha de *Aloe vera*, em que verificaram que após um mês de

administração oral do mesmo, numa dose máxima até 250 mg/kg, não houveram alterações ao nível do fígado ou rins dos camundongos albinos em comparação com os não infetados. (24)

Estudaram também, em relação a quatro estirpes de *L. donovani*, a atividade leishmanicida do extrato das folhas de *Aloe vera* que demonstrou ser ativo contra amastigotas (CI₅₀ de 3,1-11,4 ug/mL), causando a morte destas formas intracelulares ao promover a produção de óxido nítrico nos macrófagos infetados. Constatou-se ainda que tanto a administração oral como a subcutânea foram eficazes, destacando-se a dose de 15 mg/kg durante 5 dias em camundongos albinos, que diminuiu o número de parasitas em 94,8% no fígado, 95% no baço e 86,8% na medula óssea. (24)

6.2. Epigallocatequina-3-galato (*Camellia sinensis*)

Camellia sinensis, vulgarmente conhecida por planta do chá, é uma árvore de pequeno porte, da família Theaceae, com origem na Ásia. As suas folhas podem ser estabilizadas após recolha, dando origem à denominação de chá verde, ou podem sofrer fermentação e dependendo das condições deste processo, institui-se a designação de chá branco, oolong ou chá preto. As folhas do chá verde apresentam várias propriedades de interesse terapêutico, sendo a maioria destas associada à presença de catequinas, que pertencem aos flavonoides. Há uma que se destaca em especial, por ser a mais abundante e devido à sua atividade biológica, a epigallocatequina-3-galato (EGCG). O interesse terapêutico reside não só nas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas e na atividade hipolipidémica, mas também nos efeitos antimicrobianos, que foram reportados até à data em relação a várias bactérias, certos fungos, alguns vírus e também protozoários. (25-27)

Inacio JD et al. (2019) demonstraram a atividade leishmanicida de EGCG, *in vitro* e *in vivo*, em relação a *L. infantum*. O valor obtido de CE₅₀ de 2,6 µM indicou uma boa atividade deste composto contra amastigotas atingindo 97,7% de inibição na dose mais elevada (48 µM), com CC₅₀ de 436,3 µM e um SI de 167,8, o que demonstra ausência de toxicidade. O composto apresentou menor CE₅₀ e maior SI do que a miltefosina, e portanto, uma atividade leishmanicida maior do que o fármaco. *In vivo*, efetuaram a administração oral de EGCG em camundongos, com doses de 12,5 mg/kg/dia, 25 mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia, tendo-se verificado que quanto maior a dose, maior a supressão parasitária ao nível do fígado. Obtiveram-se os valores de DE₅₀ de 12,4 mg/kg/dia e DE₉₀ de 21,5 mg/kg/dia. (28)

Num outro estudo de Inacio JD et al. (2012), no âmbito de determinarem o mecanismo de ação de EGCG, verificaram que este composto promoveu o colapso da mitocôndria dos promastigotas de *L. amazonensis*. (29)

6.3 Curcumina (*Curcuma longa*)

Curcuma longa é uma espécie da família Zingiberaceae, de origem asiática, cujo rizoma possui um componente ativo designado curcumina, um composto fenólico. A curcumina apresenta vários efeitos de interesse terapêutico, nomeadamente antioxidante, anti-inflamatório, anticarcinogénico, antimicrobiano e antiprotosoário. (30,31)

Aqelee et al. (2019) realizaram um estudo *in vitro* com promastigotas de uma estirpe de *L. major* de modo a averiguar se a curcumina apresentava atividade leishmanicida. A observação dos resultados obtidos com a utilização de corante de Giemsa, azul de tripano e teste MTT, ao longo das horas, permitiu constatar que com o aumento da concentração de curcumina, aumentaram as alterações da morfologia do flagelo e da degradação do formato da célula, tendo-se verificado um efeito dose-tempo dependente. Demonstrou-se que a curcumina inibiu o desenvolvimento e causou a morte dos promastigotas. (31)

Brajendra et al. (2017) desenvolveram uma formulação oral de nanopartículas com curcumina e averiguaram *in vitro* e *in vivo* a atividade leishmanicida da administração desta formulação e de uma formulação oral de nanopartículas com curcumina e com miltefosina. Ambas exibiram um efeito leishmanicida significativo, sem toxicidade renal ou hepática associada. No entanto, verificou-se que a formulação que combinou a curcumina com miltefosina apresentou efeito sinérgico *in vitro*, tanto ao nível dos amastigotas como dos promastigotas. *In vivo*, esta formulação com a curcumina e miltefosina, para além de um aumento no efeito leishmanicida, também promoveu a proliferação de linfócitos e o incremento da atividade fagocitária. (32)

Momin et al. (2019) criaram um sistema de distribuição de curcumina auto-emulsionante, que denominaram de cu-SEDDS, de modo a ultrapassar a baixa solubilidade em água, difícil dissolução e reduzida biodisponibilidade da curcumina. Testaram a atividade leishmanicida desta formulação em relação a *L. tropica*, tendo-se obtido CI_{50} de 0,19-0,37 $\mu\text{g/mL}$ contra amastigotas e CI_{50} de 0,19-0,36 $\mu\text{g/mL}$ contra promastigotas. Os resultados da curcumina sem a formulação referida foram 24,60 $\mu\text{g/mL}$ contra amastigotas e 22,50 $\mu\text{g/mL}$ contra promastigotas. Averiguaram também a concentração mínima inibitória desta formulação

contra várias bactérias que apresentou valores que variaram entre 48-62 µg/mL, o que demonstrou o potencial da sua administração tópica na Leishmaniose cutânea, não só pela sua atividade leishmanicida, mas também pelo seu efeito antibacteriano, útil no tratamento de infecções secundárias bacterianas. Avaliaram a citotoxicidade em sangue humano, e verificaram que a formulação originou apenas 1-2% de hemólise dos glóbulos vermelhos. Procederam à avaliação do potencial da formulação se espalhar, tendo-se observado a sua dispersão no tecido danificado, permitindo a curcumina atingir os tecidos e células adjacentes. (33)

6.4 Carifenona A, isouliginosina B e uliginosina B (*Hypericum*)

As plantas do género *Hypericum*, que engloba várias espécies, da família Hypericaceae, encontram-se disseminadas pela Ásia, Europa, Estados Unidos e norte de África. *Hypericum* é denominado vulgarmente por Hipericão ou Erva de São João, e apresenta vários efeitos de interesse terapêutico, nomeadamente antifúngico, antiviral e antiparasitário. (34,35)

Dagnino et al. (2018) realizaram um estudo em que averiguaram o efeito leishmanicida de uma benzofenona, carifenona A, e dois acilfloroglucinóis, isouliginosina B e uliginosina B, isolados a partir de espécies de *Hypericum*, em relação a uma estirpe de *L. amazonensis*. Os compostos uliginosina B e carifenona A foram isolados de *Hypericum carinatum* e o composto isouliginosina B de *Hypericum andinum*. Os três compostos demonstraram ser ativos contra promastigotas, sendo que a carifenona A apresentou CI₅₀ de 10,5 µM, a uliginosina B CI₅₀ de 11,3 µM e a isouliginosina B CI₅₀ de 17,5 µM. (35)

Em relação a formas amastigotas, também se verificou que os três compostos são ativos, sendo que apresentaram as seguintes % de mortalidade de amastigotas: 46% no caso da carifenona A com concentração de 20 µM; 100% no caso da uliginosina B com concentração ≥10 µM; 100% no caso de isouliginosina com concentração ≥ 5 µM. Constataram também que a associação de carifenona A com uliginosina B com concentração de 5 µM originou 72% de mortalidade dos amastigotas, e as combinações entre carifenona A e isouliginosina B e isouliginosina B com uliginosina B provocaram 100% de mortalidade de amastigotas, ambas com concentração de 5 µM. Estes resultados demonstraram que as associações dos compostos exibiam maior potencial leishmanicida do que individualmente. (35)

Observaram ainda que os três compostos induziram alterações ao nível da membrana, do flagelo e da forma dos promastigotas. Promoveram também a hiperpolarização mitocondrial dos promastigotas. (35)

Verificaram também que os três compostos exibem baixa citotoxicidade, tendo sido testado a hemólise, que foi reduzida, e elevada seletividade em relação aos parasitas, com resultados de SI da carifenona A de 15,2, uliginosina B de 20,8 e isouliginosina B de 10,5. (35)

6.5 Flavopereirina (*Geissospermum vellosii*)

Geissospermum vellosii é uma árvore da família Apocynaceae que tem origem no Brasil, com predominância ao nível da Amazônia. Esta árvore produz látex e os seus extratos têm alguns efeitos terapêuticos, nomeadamente antimalárico, antimicrobiano, antinociceptivo, anticolinesterase, anticancerígeno e hipotensivo. O seu potencial terapêutico resulta da presença de um alcaloide denominado por flavopereirina. (36)

Da Silva et al. (2019) procederam à avaliação *in vitro* da ação da flavopereirina em promastigotas de *L. amazonensis*, tendo obtido como resultados de CI_{50} 0,23 g/mL às 24h, 2,34 g/mL às 48h e 0,15 g/mL às 72h. Estes valores demonstram que a flavopereirina é ativa contra promastigotas. Comparando com os resultados da anfotericina B, CI_{50} 0,42 g/mL às 24h, 1,79 g/mL às 48h e 0,35 g/mL às 72h, observa-se que o CI_{50} da flavopereirina às 24h é menor do que o da anfotericina B. Não foi só neste parâmetro que a flavopereirina obteve melhores resultados que o controlo positivo, no SI também, tendo-se constatado SI de 976,2 às 24h, 228,2 às 48h e 4993,2 às 72h enquanto que a anfotericina B apresentou SI de 655,5 às 24h, 326,6 às 48h e 1811,7 às 72h. Verifica-se então que este alcaloide é mais seletivo do que a anfotericina B, às 24h e às 72h. Para além da reduzida toxicidade que demonstrou, flavopereirina também apresentou propriedades favoráveis em relação à biodisponibilidade, sem nenhuma violação da regra dos cinco de Lipinski, tendo sido efetuados estudos *in silico*. (37)

Na análise do docking molecular, constatou-se que a flavopereirina interagiu com o resíduo Tyr-499. Este resíduo efetua o reconhecimento dos substratos da oligopeptidase B, uma proteína citosólica pertencente à família de serino-proteases, com extrema importância para a sobrevivência dos parasitas, uma vez que estão envolvidas em vários processos fisiológicos, nomeadamente na assimilação de aminoácidos, com resultante produção de proteínas, e na degradação do tecido conjuntivo do hospedeiro, favorecendo assim a invasão e propagação do protozoário. A interação que se verificou ao nível do docking molecular demonstra um possível mecanismo de inibição, que pode impedir os substratos de atingirem o sítio catalítico. (37,38)

6.6 Guaiol e óleo essencial de *Aloysia gratissima*

Aloysia gratissima, vulgarmente designada por lavanda do Brasil, pertence à família Verbenaceae, sendo possível encontrá-la no Norte e Sul da América. Apresenta atividade microbida contra alguns vírus, leveduras e bactérias. No óleo essencial desta planta o sesquiterpeno maioritário é um composto denominado guaiol, um álcool que apresenta efeitos anticancerígenos e antibacterianos. Os óleos essenciais são misturas naturais e complexas de substâncias adquiridas através de distintas partes das plantas e usualmente a sua constituição consiste em sesquiterpenos e monoterpenos. (39,40)

Garcia et al. (2018) realizaram um estudo em que averiguaram a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Aloysia gratissima* e de guaiol, em relação a *L. amazonensis*. O óleo essencial demonstrou ser ativo contra promastigotas, com um CI_{50} de 25 $\mu\text{g/mL}$ e altamente ativo contra amastigotas com um CI_{50} de 0,16 $\mu\text{g/mL}$. O guaiol apresentou um CI_{50} de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ relativamente a amastigotas, revelando-se altamente ativo contra estas formas intracelulares. Os resultados indicam que os efeitos do óleo essencial se devem ao guaiol fazer parte da sua composição, embora a ação de outros sesquiterpenos não possa ser totalmente excluída. (40)

Verificaram que o óleo essencial não provocou modificações na produção de óxido nítrico nos macrófagos, porém observaram alterações ao nível da matriz mitocondrial, da membrana plasmática e do cinetoplasto provocadas pelo óleo essencial e pelo guaiol, o que sugere que ambos atuam diretamente nos protozoários. (40)

Quanto à toxicidade, tanto o óleo essencial como o guaiol demonstraram ser seguros para macrófagos até 100 $\mu\text{g/mL}$, não afetando a viabilidade destas células. Constataram ainda, posteriormente ao tratamento com o óleo essencial, um incremento de aproximadamente 50% da capacidade fagocitária dos macrófagos. (40)

6.7 Fisalinas e extrato de *Physalis angulata*

Physalis angulata é uma planta da família Solanaceae difundida em vários países localizados em áreas tropicais e subtropicais, amplamente utilizada empiricamente para fins terapêuticos, nomeadamente para tratar dermatite, asma, hepatite e como agente anti-inflamatório. Possui na sua constituição flavonoides, glucocorticoides, vitanolidos e fisalinas. As fisalinas são secoesteroides com atividade antiprotozoária reportada em relação a

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, e a *Plasmodium* sp, agente causal da Malária. (41, 42)

Da Silva et al. (2015) procederam à análise *in vitro* do efeito leishmanicida de um extrato aquoso das raízes de *Physalis angulata*, em relação a *L. amazonensis*, e determinaram a presença de fisalinas A, B, D, E, F, G e H. Os resultados obtidos foram IC₅₀ de 43,4 µg/mL para amastigotas e 39,5 µg/mL para promastigotas, sendo o extrato ativo contra ambas as formas do parasita. Verificaram que a inibição do desenvolvimento dos promastigotas estava associada a várias modificações ao nível da morfologia, nomeadamente duplicação do flagelo e forma redonda da célula. Não se constataram efeitos citotóxicos na cultura de células utilizada. (41)

Guimarães et al. (2009) avaliaram a atividade leishmanicida da fisalinas B, D e F *in vitro* em relação a amastigotas da *L. major* e *L. amazonensis* e da fisalina F *in vivo* com camundongos infetados com *L. amazonensis*. No estudo *in vitro*, a fisalina D não apresentou atividade leishmanicida, mas as fisalinas B e F demonstraram ser ativas contra as amastigotas, com valores de IC₅₀ de 0,21 mM e 0,18 mM, respetivamente, não se verificando toxicidade ao nível dos macrófagos. No estudo *in vivo*, efetuaram a administração tópica da fisalina F, que demonstrou diminuir significativamente o tamanho da lesão, assim como o número de parasitas. (42)

As fisalinas para além do efeito leishmanicida demonstrado têm propriedades anti-inflamatórias, o que constitui uma vantagem importante na sua potencial utilização no tratamento das lesões da Leishmaniose cutânea. (42)

Conclusões

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, no entanto, deve ser uma preocupação mundial, uma vez que a disseminação para outras regiões geográficas onde ainda não é endêmica é possível, sendo as alterações climáticas associadas ao aquecimento global um dos fatores que pode predispor para que tal ocorra.

Até à data, não existe uma vacina comercializada para a Leishmaniose humana e o arsenal terapêutico disponível apresenta várias limitações, sendo as mais importantes a emergência de resistência dos parasitas, os efeitos secundários graves reportados, a extensa duração do tratamento, os elevados custos e as vias de administração que não são práticas, podendo condicionar a adesão terapêutica e, conseqüentemente, comprometer a eficácia, e originar recidivas.

A análise de vários artigos científicos que incidiram sobre produtos naturais de origem vegetal com atividade leishmanicida permitiu compreender o potencial terapêutico que estes apresentam e possibilitou a seleção de alguns com resultados particularmente interessantes que podem representar uma oportunidade para o desenvolvimento de alternativas à terapêutica convencional.

Aquando a análise dos estudos foi possível identificar que muitos dos estudos são *in vitro*, sendo crucial a realização de estudos *in vivo* e que vários estudos não identificam os mecanismos de ação dos compostos. Estas lacunas devem ser colmatadas num futuro breve para que a estratégia de procura de compostos leishmanicidas em espécies vegetais seja viável.

É urgente o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, sendo importante não negligenciar a vasta informação que já existe acerca de vários produtos naturais identificados com efeito leishmanicida e que os estudos dos que apresentam maior potencial terapêutico tenham prosseguimento, de modo a que se possa proceder futuramente ao desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes, que ultrapassem as limitações do atual arsenal terapêutico.

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. [cited 2020 Feb 06]. Available from: <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>
2. Akhouni M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2020 Feb 17]; 10(3): e0004349. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004349>
3. Centers for Disease Control and Prevention: Parasites-Leishmaniasis [Internet]. [updated 2018 Jul 24; cited 2020 Feb 13]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>
4. Oryan A, Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2016; Oct [cited 2020 Feb 23]; 9(10):925-932. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27794384-worldwide-risk-factors-in-leishmaniasis/>
5. Santos BM, Bezerra-Souza A, Aragaki S, Rodrigues E, Umehara E, Ghilardi Lago JH, et al. Ethnopharmacology Study of Plants from Atlantic Forest with Leishmanicidal Activity. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2019 Feb 5 [cited 2020 Feb 10]; 2019(8780914). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6379840/>
6. Rodrigues IA, Mazotto AM, Cardoso V, Alves RL, Amaral AC, Silva JR, et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015 Oct 11 [cited 2020 Feb 02]; 2015(835910). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26538837-natural-products-insights-into-leishmaniasis-inflammatory-response/>
7. Campino L, Maia C. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Med Port* [Internet]. 2010 Oct [cited 2020 Feb 15]; 23(5): 859-864. Available from: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/715>
8. Maia C, Campino L. Leishmaniose em Portugal no início do século XXI. *Anais do IHMT* [Internet]. 2014 Dec 30 [cited 2020 Feb 15]; 13(2014): 25-28. Available from: <https://anaisihmt.com/index.php/ihmt/article/view/167>

9. Marques N, Cabral S, Sá R, Coelho F, Oliveira J, Saraiva da Cunha JG, et al. Visceral leishmaniasis and HIV infection in the HAART era. *Acta Med Port* [Internet]. 2007 Nov [cited 2020 Feb 15]; 20(4): 291-298. Available from:

<https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/873/547>

10. Phakeovilay C, Bourgeade-Delmas S, Perio P, Valentin A, Chassagne F, Deharo E, et al. Antileishmanial Compounds Isolated from *Psidium guajava* L. Using a Metabolomic Approach. *Molecules* [Internet]. 2019 Dec 11 [cited 2020 Feb 02]; 24(24):4536. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31835791-antileishmanial-compounds-isolated-from-psidium-guajava-l-using-a-metabolomic-approach/>

11. Oliveira LF, Gilbert B, Villas Bôas GK. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Fitos* [Internet]. 2013 [cited 2020 Feb 9]; 8(1):1-72. Available from: <http://157.86.224.28/index.php/revista-fitos/article/view/192>

12. Campino L, Bajanca R, Franca I, Pratlong F, Dedet JP, Fiadeiro T. Cutaneous leishmaniasis in Portugal due to *Leishmania infantum* MON-1. *Acta Med Port* [Internet]. 2005 Dec [cited 2020 Feb 19]; 18(6):475-477. Available from: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1062/730>

13. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet* [Internet]. 2018 Sep 15 [cited 2020 Feb 5]; 392(10151):951-970. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30126638-leishmaniasis/?from_term=sakib+burza&from_pos=1

14. Deiva S, Ferguson L, Rateb ME, Williams R, Brucoli F. 2-furyl(phenyl)methanol isolated from *Atractilis gummifera* rhizome exhibits anti-leishmanial activity. *Fitoterapia* [Internet]. 2020 Jan [cited 2020 Feb 2]; 140(104420). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733344-2-furylphenylmethanol-isolated-from-atractilis-gummifera-rhizome-exhibits-anti-leishmanial-activity/>

15. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res* [Internet]. 2017 May 26 [cited 2020 02 Feb]; 6(750). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5464238/>

16. WHO. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a manual for case management and control [Internet]. Kolkata, Índia: 2013 [cited 2020 Feb 24]. Report No:

WHO/HTM/NTD/IDM/2013.1.Available from:
https://www.who.int/neglected_diseases/resources/9789241505215/en/

17.Cipriano P, Miranda AC, Antunes I, Mansinho K. Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients: The Challenge of Relapse and Treatment Failure. *Acta Med Port* [Internet]. 2017 Jun [cited 2020 Feb 24];30(6):443-448. Available from:
<https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/8291>

18.Afrin F, Chouhan G, Islamuddin M, Want MY, Ozbak HA, Hemeg HA. *Cinnamomum cassia* exhibits antileishmanial activity against *Leishmania donovani* infection *in vitro* and *in vivo*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 May 9 [cited 2020 02 Feb];13(5):e0007227. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007227>

19.Yousaf R, Khan MA, Ullah N, Khan I, Hayat O, Shehzad MA, et al. Biosynthesis of anti-leishmanial natural products in callus cultures of *Artemisia scoparia*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 3]; 47(1):1122-1131. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30942629-biosynthesis-of-anti-leishmanial-natural-products-in-callus-cultures-of-artemisia-scoparia/?from_term=natural+anti-leishmanial+activity&from_pos=2

20.Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem* [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 2];18(1):26–41. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28443518-limitations-of-current-therapeutic-options-possible-drug-targets-and-scope-of-natural-products-in-control-of-leishmaniasis/>

21.Passero LFD, Cruz LA, Santos-Gomes G, Rodrigues E, Laurenti MD, Lago JHG. Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 2];18(15):1275–1286. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30277153-conventional-versus-natural-alternative-treatments-for-leishmaniasis-a-review/>

22.Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2014[cited 2020 Feb 3];22(1):18-45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24355247-natural-product-based-leads-to-fight-against->

leishmaniasis/?from_single_result=Natural+product+based+leads+to+fight+against+leishmaniasis

23. Tariq H, Zia M, Ihsan-Ul-Haq, Muahammad SA, Khan SA, Fatima N, et al. . Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, and Protein Kinase Inhibition Potential in *Aloe vera* L. Biomed Res Int [Internet]. 2019 Jul 28 [cited 2020 Feb 2];2019(6478187). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31467904-antioxidant-antimicrobial-cytotoxic-and-protein-kinase-inhibition-potential-in-aloe-vera-l/>

24. Dutta A, Sarkar D, Gurib-Fakim A, Mandal C, Chatterjee M. *In vitro* and *in vivo* activity of *Aloe vera* leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. Parasitol Res [Internet]. 2008 [cited 2020 Mar 3];102(6):1235–1242. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18266009-in-vitro-and-in-vivo-activity-of-aloe-vera-leaf-exudate-in-experimental-visceral-leishmaniasis/?from_term=aloe+vera+leishmaniasis&from_pos=4

25. Duarte MR, Menarim DO. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. Rev. Bras. Farmacogn, [Internet]. 2006 Dec [cited 2020 Mar 4]; 16(4):545-551. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000400018&lng=en

26. Saeed M, Naveed M, Arif M, Kakar MU, Manzoor R, El-Hack ME et al. Green tea (*Camellia sinensis*) and l-theanine: Medicinal values and beneficial applications in humans-A comprehensive review. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017 [cited 2020 Mar 4]; 95:1260-1275. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28938517-green-tea-camellia-sinensis-and-l-theanine-medicinal-values-and-beneficial-applications-in-humans-a-comprehensive-review/?from_term=Camellia+Sinensis%2C+Theaceae+&from_pos=2

27. Imperatori F, Barlozzari G, Scardigli A, Romani A, Macrì G, Polinori N et al. Leishmanicidal activity of green tea leaves and pomegranate peel extracts on *L. infantum*. Nat Prod Res [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 4];33(24):3465-3471. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29863902-leishmanicidal-activity-of-green-tea-leaves-and-pomegranate-peel-extracts-on-l-infantum/>

28. Inacio JD, Fonseca MS, Almeida-Amaral EE. (-)-Epigallocatechin 3-*O*-Gallate as a New Approach for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. J Nat Prod [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 2];82(9):2664-2667. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31503486--epigallocatechin-3-o-gallate-as-a-new-approach-for-the-treatment-of-visceral-leishmaniasis/>

29. Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RF, Almeida-Amaral EE. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol* [Internet]. 2012 [cited 2020 Feb 2];132(2):151–155. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22735546-mitochondrial-damage-contribute-to-epigallocatechin-3-gallate-induced-death-in-leishmania-amazonensis/>
30. Freire-González RA, Vistel-Vigo M. Phytochemical characterization of *Curcuma longa* L. *Rev Club Quim* [Internet]. 2015 Apr [cited 2020 Mar 4];27(1):9-18. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2224-54212015000100001&script=sci_arttext&tlng=en
31. Aqeel G, Shayan P, Ebrahimzadeh E, Mohebbi M, Khalili S. Determination of the Effective Dose of Curcumin alone and in Combination with Antimicrobial Peptide CM11 on Promastigote Forms of Iranian Strain of *L. major* (MRHO / IR / 75 / ER). *Arch Razi Inst* [Internet]. 2019 Dec [cited 2020 Feb 2];74(4):413–422. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31939258-determination-of-the-effective-dose-of-curcumin-alone-and-in-combination-with-antimicrobial-peptide-cm11-on-promastigote-forms-of-iranian-strain-of-l-major-mrho-ir-75-er/>
32. Tiwari B, Pahuja R, Kumar P, Rath SK, Gupta KC, Goyal N. Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Feb 3 [cited 2020 Mar 4];61(3):e01169-16. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28031196-nanotized-curcumin-and-miltefosine-a-potential-combination-for-treatment-of-experimental-visceral-leishmaniasis/?from_term=curcumin+leishmaniasis&from_pos=2
33. Khan M, Ali M, Shah W, Shah A, Yasinzai MM. Curcumin-loaded self-emulsifying drug delivery system (cu-SEDDS): a promising approach for the control of primary pathogen and secondary bacterial infections in cutaneous leishmaniasis. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Mar 4];103(18):7481–7490. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31300853-curcumin-loaded-self-emulsifying-drug-delivery-system-cu-sedds-a-promising-approach-for-the-control-of-primary-pathogen-and-secondary-bacterial-infections-in-cutaneous-leishmaniasis/?from_term=curcumin+leishmaniasis&from_pos=4
34. Alves AC, Moraes DC, De Freitas GB, Almeida DJ. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. *Rev. bras. plantas med.* [Internet].

2014 Sep [cited 2020 Mar 5];16(3):593-606. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000300017&lng=en

35. Dagnino AP, Mesquita CS, Dorneles GP, Teixeira VO, Barros FM, Ccana-Ccapatinta GV et al. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species trigger mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. *Parasitology* [Internet]. 2018 [cited 2020 Mar 5];145(9):1199-1209. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29482667-phloroglucinol-derivatives-from-hypericum-species-trigger-mitochondrial-dysfunction-in-leishmania-amazonensis/>

36. Camargo MR, Amorim RC, Silva LF, Carneiro AL, Vital MJ, Pohlit AM. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum* Allemão species (Apocynaceae Juss). *Fitos* [Internet]. 2013 [cited 2020 Mar 7];8(2):73-160. Available from: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/188>

37. da Silva e Silva JV, Cordovil Brigido HP, Oliveira de Albuquerque KC, Carvalho JM, Reis JF, Faria LV et al. Flavopereirine-Na Alkaloid Derived from *Geissospermum vellosii*-Presentes Leishmanicidal Activity *In Vitro*. *Molecules* [Internet]. 2019 Feb 21 [cited 2020 Mar 7];24(4):785. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30795632-flavopereirine-an-alkaloid-derived-from-geissospermum-vellosii-presents-leishmanicidal-activity-in-vitro/>

38. Silva-Lopez, RE. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quím. Nova* [Internet]. 2010 [cited 2020 Mar 7];33(7):1541-1548. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000700022

39. O'Leary N, Lu-Irving P, Moroni P, Siedo S. Taxonomic Revision of *Aloysia* (Verbenaceae, Lantaneae) in South America. *Ann Mo Bot Gard* [Internet]. 2016 Apr 27 [cited 2020 Mar 6];101(3):568-609. Available from: <https://bioone.org/journals/annals-of-the-missouri-botanical-garden/volume-101/issue-3/2013015/Taxonomic-Revision-of-Aloysia-Verbenaceae-Lantaneae-In-South-America1/10.3417/2013015.short>

40. Garcia MCF, Soares DC, Santana RC, Saraiva EM, Siani AC, Ramos MF et al. The *in vitro* antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology* [Internet]. 2018 [cited 2020 Mar 6];145(9):1219-1227. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29352826-the-in-vitro-antileishmanial-activity-of-essential-oil-from-aloyisia-gratissima-and-guaiol-its-major-sesquiterpene-against-leishmania-amazonensis/>

41. da Silva RR, da Silva BJ, Rodrigues AP, Farias LR, da Silva MN, Alves DT et al. *In vitro* biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania*

(Leishmania) amazonensis. BMC Complement Altern Med [Internet]. 2015 Jul 24 [cited 2020 Mar 6];15:249. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26205771-in-vitro-biological-action-of-aqueous-extract-from-roots-of-physalis-angulata-against-leishmania-leishmania-amazonensis/>

42. Guimarães ET, Lima MS, Santos LA, Ribeiro IM, Tomassini TB, dos Santos RR et al. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2009 [cited 2020 Mar 6];64(1):84-87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19454526-activity-of-physalins-purified-from-physalis-angulata-in-in-vitro-and-in-vivo-models-of-cutaneous-leishmaniasis/>