
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES VEGETAIS DO CERRADO

Patrícia Carvalho Lima¹, Márcio Galdino dos Santos, Katia da Silva Calabrese, Ana Lucia Abreu Silva e Fernando Almeida

RESUMO

Para identificar as propriedades químicas de plantas do Cerrado, realizou-se um levantamento etnobotânico que resultou na seleção de sete espécies vegetais de acordo com as indicações terapêuticas para antibiótico, anti-inflamatório, analgésico, antiofídico e cicatrizante. Foram testados os extratos hidroalcoólicos das seguintes plantas quanto à sua atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*: *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae), *Vellozia squamata* Pohl. (Velloziaceae), *Vochysia haenkeana* (Spreng.) Mart. (Vochysyaceae), *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae), *Lafoesia pacari* St. Hil. (Lythraceae), *Galactia glaucescens* Kunth. (Leguminosae) e *Plathymenia reticulata* Benth. (Mimosaceae). Feita a triagem para identificação da atividade leishmanicida, calculou-se a concentração inibitória do crescimento (IC₅₀) em relação às culturas não tratadas com os extratos. Nas espécies *L. pacari*, *G. glaucescens* e *P. reticulata*, seus extratos demonstraram IC₅₀ com valores de 14,6 µg/mL, 46,0 µg/mL e 59,5 µg/mL, respectivamente, apresentando maior eficácia em induzir a morte dos parasitos. *T. fagifolia*, *V. squamata* e *V. haenkeana* apresentaram IC₅₀ com valores de 446,1 µg/mL, 305,0 µg/mL e 85,1 µg/mL, respectivamente, demonstrando eficácia moderada. A prospeção fitoquímica evidenciou a presença de flavonoides, triterpenoides, esteroides e taninos que, segundo a literatura, são responsáveis pela atividade leishmanicida. Esses resultados indicam a necessidade de mais estudos para a avaliação da atividade em infecções *in vivo* e do fracionamento das substâncias em busca dos princípios ativos responsáveis pela ação leishmanicida.

DESCRITORES: *Leishmania amazonensis*; plantas; cerrado.

ABSTRACT

Evaluation of the leishmanicidal activity of plant species of the Brazilian savanna

In order to identify chemical properties of plants of the Brazilian savanna (Cerrado) an ethnobotanical survey was performed. Seven plant species were selected according to their indications for antibiotic, anti-inflammatory, analgesic, anti-ophidian and healing properties. The following hydroalcoholic

1 Trabalho de dissertação apresentado ao programa de Mestrado em Ciências do Ambiente (PGCiamb), Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas.

Endereço para correspondência: Universidade Federal do Tocantins, Campus de Palmas, Av. NS 15, Qd 109 Norte, Plano Diretor Norte, Bloco 3, CEP 77001-090, Palmas-TO, Brasil

Recebido para publicação em: 1/10/2013. Revisto em: 31/10/2014. Aceito em: 21/12/2014.

extracts of these plants were tested for activity against promastigotes of *Leishmania amazonensis*: *Terminalia fagifolia* Mart. (Combretaceae), *Vellozia squamata* Pohl. (Velloziaceae), *Vochysia haenkeana* (Spreng.) Mart. (Vochysyaceae), *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae), *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae), *Galactia glauscecens* Kunth. (Leguminosae) and *Plathymentia reticulata* Benth. (Mimosaceae). The growth inhibitory concentration (IC₅₀) of these extracts was calculated in relation to untreated cultures. Higher efficacy in inducing the death of parasites was demonstrated with extracts of *L. pacari*, *G. glauscecens* and *P. reticulata*, which showed IC₅₀ values of 14.6 mg/mL, 46.0 mg/mL and 59.5 mg/mL, respectively. Moderate effectiveness was shown with *T. fagifolia*, *V. squamata* and *V. haenkeana* extracts, with values of 446.1, mg/mL 305.0 mg/mL and 85.1 mg/mL respectively. Phytochemical studies showed the presence of flavonoids, triterpenoids, steroids and tannins that, according to the literature, are responsible for the leishmanicidal activity. These results indicate the need for future studies to evaluate the activity of these extracts against infections *in vivo*, as well as the fractionation of substances, in search of the active components responsible for the leishmanicidal action.

KEY WORDS: *Leishmania amazonensis*; plants; savanna.

INTRODUÇÃO

As plantas têm acompanhado a humanidade ao longo de sua história, estabelecendo-se uma relação intrínseca seja como fonte de alimento, vestuário, madeira para construção, energia e, principalmente, como medicamento. Cerca de 25% dos medicamentos possuem extratos vegetais em sua composição. Consequentemente, o consumo mundial de plantas medicinais e seus produtos tem resultado em grandes volumes de negócios que, necessariamente, alicerçam-se em estudos científicos detalhados, elaborados com precisão e alta tecnologia que confirmam suas propriedades farmacológicas (30).

A descoberta de propriedades terapêuticas de metabólitos secundários ativos presentes em extratos vegetais tem despertado o interesse pela investigação de novas opções de tratamento da leishmaniose com plantas medicinais. O grande número de experimentos que fazem uso desses extratos contra leishmaniose tem levado a pesquisas de compostos ativos como alcaloides, compostos fenólicos, terpenoides, flavonoides e outros (2, 8).

O bioma Cerrado tem sido em grande parte destruído, dando espaço a construções residenciais, comerciais, ao plantio de soja e ao cultivo de pastagem. No entanto, o Cerrado possui uma das maiores florestas do mundo, estimada em, aproximadamente, sete mil espécies vegetais e faz parte de um cenário de exuberante diversidade biológica e forte influência na cultura das populações que nele vivem (20). Cerca de metade dos 2 milhões de km² originais deste bioma foram transformados em pastagens plantadas, culturas anuais ou tiveram outros tipos de uso (16).

Um dos grandes desafios na conservação do Cerrado é, portanto, demonstrar a importância de sua biodiversidade para o funcionamento dos ecossistemas. As colonizações de áreas urbanas têm aumentado em grande número as queimadas e a destruição das matas, mudando de forma não planejada o meio ambiente. Como consequência, o contato direto do homem com insetos

transmissores de doenças e com animais peçonhentos tem causado problemas e elevado o custo da saúde pública. (14).

Neste contexto, podem-se destacar as doenças parasitárias, presentes em praticamente todo o território brasileiro, cujo tratamento cada vez mais se limita à utilização de medicamentos farmacêuticos. Este é o caso da Leishmaniose, doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo e que afeta mais de 12 milhões de pessoas (33, 10). Causada por protozoários, pode acometer pele, mucosa ou vísceras e se encontra entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo. A terapêutica convencional com base em antimonialis apresenta sérios efeitos colaterais e eficiência limitada (7, 28).

O tratamento desta doença ainda é bastante complexo, visto que o medicamento deve ser administrado por profissionais da saúde e com o paciente hospitalizado (4). No Brasil, é preconizado pelo Ministério da Saúde e baseia-se, principalmente, no antimonial pentavalente (Glucantime), entretanto todos os medicamentos utilizados na terapia possuem efeitos colaterais, entre eles astralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, epigastralgia, plenitude gástrica, pirose, dor local e febre, devidos à sua toxicidade (23, 24).

A incidência de casos de leishmaniose no Brasil tem aumentado nos últimos 20 anos em praticamente todos os estados. Os surtos estão relacionados principalmente com o processo predatório de colonização (19). No ano de 2011, foram confirmados cerca de 19.610 novos casos de leishmaniose tegumentar em todo o País. Em 2012, até o mês de junho foram notificados 8.665 novos casos de leishmaniose tegumentar (21).

A associação entre conhecimento popular de plantas com potencial farmacológico e prospecção fitoquímica visando isolar as moléculas bioativas importantes na produção de novos fitoterápicos tem grande importância na busca por medicamentos que atuem no tratamento da leishmaniose, além de fornecer subsídios para a implantação de políticas públicas para a conservação da biodiversidade do País.

Esta pesquisa visou à caracterização fitoquímica e à avaliação da capacidade leishmanicida do extrato hidroalcoólico de sete espécies vegetais do Cerrado, buscando identificar as classes de constituintes químicos presentes nos extratos vegetais, bem como a atividade destes contra as formas promastigotas de *L. amazonensis in vitro*

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção das espécies vegetais

A escolha das espécies selecionadas para a realização do presente trabalho se baseou em um levantamento etnobotânico, priorizando-se as espécies

encontradas no Cerrado tocantinense, segundo as indicações como anti-inflamatório, antirreumático, antibiótico, analgésico, antiofídico e cicatrizante.

Coleta do material botânico

As plantas foram coletadas no mês de junho de 2011, em uma área identificada como Jacó, localizada a 5 km do Setor Novo Planalto no município de Porto Nacional- TO. Identificadas as plantas, foram confeccionadas as exsiccatas que, em seguida, foram depositadas no Herbário HTO da Universidade Federal do Tocantins com os números de registros: *T. fagifolia* (4.208), *V. squamata* (10.489), *V. haenkeana* (10.490), *S. guianensis* (10.491), *L. pacari* (10.492), *G. glaucenses* (10.494) e *P. reticulata* (10.495).

Preparação do extrato bruto

O material vegetal coletado foi acondicionado separadamente em sacos de papel identificados e levado à estufa para secagem, mantendo-se uma temperatura média de 60°C durante sete dias. O material já seco foi triturado em moinho de facas (Marconi, Mod. MA-340/A) e acondicionado num recipiente de vidro (3L), posteriormente preenchido com etanol 70%, o que permitiu a solubilização dos princípios ativos. O método de preparação de extrato hidroalcoólico (etanol/água 70/30, v/v) é análogo ao das tinturas realizadas na cultura popular, nas quais se misturam partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas (5). Após 72 horas, a solução foi filtrada e concentrada em Evaporador Rotativo (Marconi, Mod. MA120-TH). Obtido o extrato bruto, este material foi liofilizado (Liotop/ Mod. L101) por, aproximadamente, 24 horas, obtendo-se, então, um extrato do tipo pó.

Para o teste de compostos contra *Leishmania*, os extratos vegetais foram diluídos no meio de cultivo do parasito. De acordo com a polaridade da amostra, a substância em teste foi dissolvida diretamente em dimetilsofóxido (DMSO).

Os extratos foram pesados e submetidos à diluição seriada em DMSO. Após as diluições, foram obtidas as seguintes concentrações dos extratos vegetais: 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,81 µg/mL, 3,90 µg/mL, 1,95 34 µg/mL e 0,97 µg/mL.

Preparo da placa

Utilizou-se placa estéril de 96 poços. Os poços das extremidades foram preenchidos com 200 µL de água estéril. Neste trabalho, foi utilizada como droga de referência a Anfotericina B. Nos poços para controle, não foi adicionado ST ou droga de referência, apenas 100 µL de meio e, posteriormente, 100 µL de cultura em triplicata. Nos poços brancos, somente 200 µL de meio em triplicata.

Em seguida, realizou-se a contagem da cultura de formas promastigotas entre 2 e 4 dias de passagem. Utilizou-se a cultura na concentração de 100 parasitos

por mL. Após o preparo da cultura, pipetou-se 100 µL desta em cada poço, exceto nos poços brancos. Por fim, manteve-se a placa, com 200 µL em cada poço, em estufa BOD a 24°C durante o período de teste (24, 48 ou 72 horas).

Verificação da atividade leishmanicida

Após o período de tratamento, cada poço foi observado em microscópio invertido, classificando-se os parasitos de acordo com a motilidade flagelar:

- + parasitos ativos no meio
- ± alguns poucos parasitos ativos no fundo do poço
- nenhum parasito ativo

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) foram mantidas em meio LIBHIT, segundo Gonçalves da Costa et al. (1981), suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina (100 U/mL), a 26°C em estufa BOD. Para garantir a característica de infectividade, foram utilizadas somente culturas de promastigotas com, no máximo, dez passagens *in vitro* (12).

Para avaliação da atividade contra promastigotas, 100 µL de cultura de promastigotas de *L. amazonensis* na fase log (1×10^6 parasitos/mL) foram cultivados em meio LIBHT e, em seguida, pipetados em cada poço da placa. Nos poços com cultura, foram adicionados 100 µL da solução dos extratos nas concentrações de 240, 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75 e 1,75 µg/mL e incubados em estufa BOD a 26°C. Mantiveram-se poços somente com o parasito como controle. A viabilidade das formas promastigotas foi mensurada no final de 72 horas por meio da contagem dos parasitos em Câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos pela concentração inibitória do crescimento do parasito em 50% (IC₅₀).

Contagem em Câmara de Neubauer

Após o período de tratamento dos parasitos com os extratos, realizou-se a contagem em cada poço do número de parasitos vivos. Os dados foram normalizados segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ inibição de crescimento} = \frac{\text{N}^\circ \text{ parasitos do poço controle}}{\text{N}^\circ \text{ de parasitos do poço}}$$

A normalização destes dados foi utilizada para análise estatística e cálculo do IC₅₀ da Solução Teste.

Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como média ± desvio padrão. Para as variáveis com distribuição paramétrica, foi utilizada a análise de variância

(ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. As análises foram feitas com o *software* Graph Pad Prism 5.0.4 (Graph Pad Software Inc.). Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Prospecção fitoquímica

Para análise das principais classes químicas de metabólitos especiais, amostras dos extratos foram submetidas à análise fitoquímica preliminar (6, 18).

No preparo das amostras, utilizaram-se aproximadamente 100 mg dos extratos vegetais, os quais foram solubilizados em 5mL de MeOH e usados para identificação de antraquinonas, flavonoides, triterpenoides e esteroides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos, antocianidinas e chalconas.

RESULTADOS

Os extratos hidroalcoólicos foram primeiramente submetidos à triagem para identificação da atividade leishmanicida e das concentrações capazes de inibir 100% das formas promastigotas de *L. amazonensis* em um período de 24 horas. As espécies *L. pacari*, *V. squamata* e *T. fagifolia* apresentaram melhores resultados com 75µg/mL de toxicidade contra os parasitos. *V. haenkeana*, *P. reticulata* e *G. glaucensces* apresentaram toxicidade em 125µg/mL, já a espécie *S. guianensis* apresentou uma toxicidade maior que 500 µg/mL, contudo nem a maior concentração usada de *S. guianensis* foi capaz de inibir 100% dos parasitos.

Considerando o resultado obtido na triagem, foi realizado o ensaio da atividade Leishmanicida somente com as espécies *L. pacari*, *V. squamata*, *T. fagifolia*, *V. haenkeana*, *P. reticulata* e *G. glaucensces*. A Tabela 1 resume estes resultados.

Tabela 1. Concentração inibitória de 50% dos extratos hidroalcoólicos de seis espécies vegetais e Anfotericina B em formas promastigotas de *L. amazonensis*

Nome científico	Farmacógeno/Extrato	Atividade Leishmanicida IC (µg/mL)
<i>Terminalia fagifolia</i>	Entrecasca/EH	446,1 ± 0,386
<i>Vellozia squamata</i>	Caule/EH	305,0 ± 0,029
<i>Vochysia haenkeana</i>	Entrecasca/EH	85,1 ± 0,058
<i>Lafoensia pacari</i>	Entrecasca/EH	14,6 ± 0,007
<i>Galactia glaucensces</i>	Folha/EH	46,0 ± 0,323
<i>Plathyenia reticulata</i>	Entrecasca/EH	59,5 ± 0,392
Anfotericina B	Droga de referência	15,2 ± 0,358

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

P. reticulata, pertencente à família Leguminosae e conhecida popularmente como vinhático, possui como componentes químicos taninos e flavonoides.

Existem registros relacionando as características químicas da *P. reticulata* com atividade anti-inflamatória, bem como a descrição de dois diterpenos cassânicos (11, 17). Porém, não existem relatos sobre a atividade Leishmanicida desta espécie. No presente trabalho, *P. reticulata* demonstrou um valor considerado expressivo – 59,5 µg/mL, o que a classifica como uma planta promissora.

A espécie *V. haenkeana* vem sendo utilizada principalmente no preparo de xarope indicado para a resolução de males como a bronquite, a tosse insistente e a própria coqueluche. A parte mais utilizada é a casca do caule (27) desta planta, que apresentou IC₅₀ 85,1 µg/mL, valor mediano entre as seis espécies estudadas.

A canela d'ema, *V. squamata*, neste estudo apresentou um IC₅₀ de 305,0 µg/mL, considerado elevado quando relacionado à droga de referência, contudo não apresentou atividade leishmanicida satisfatória.

T. fagifolia demonstrou IC₅₀ de 446,1 µg/mL, revelando, assim, uma baixa atividade leishmanicida. As plantas pertencentes ao gênero Terminalia são ricas em triterpenos pentacíclicos e seus derivados glicosilados, flavonoides, taninos e outros compostos aromáticos (1).

A espécie *G. glaucensces*, que apresentou IC₅₀ de 46 µg/mL, tem atividade leishmanicida moderada. A ausência de estudos sobre esta espécie não permite a comparação deste resultado com a literatura.

L. pacari apresentou uma atividade leishmanicida significativa, com IC₅₀ de 14,26 µg/mL, o que confirma sua eficácia. O Gráfico 1 mostra a comparação deste resultado com os descritos na literatura.

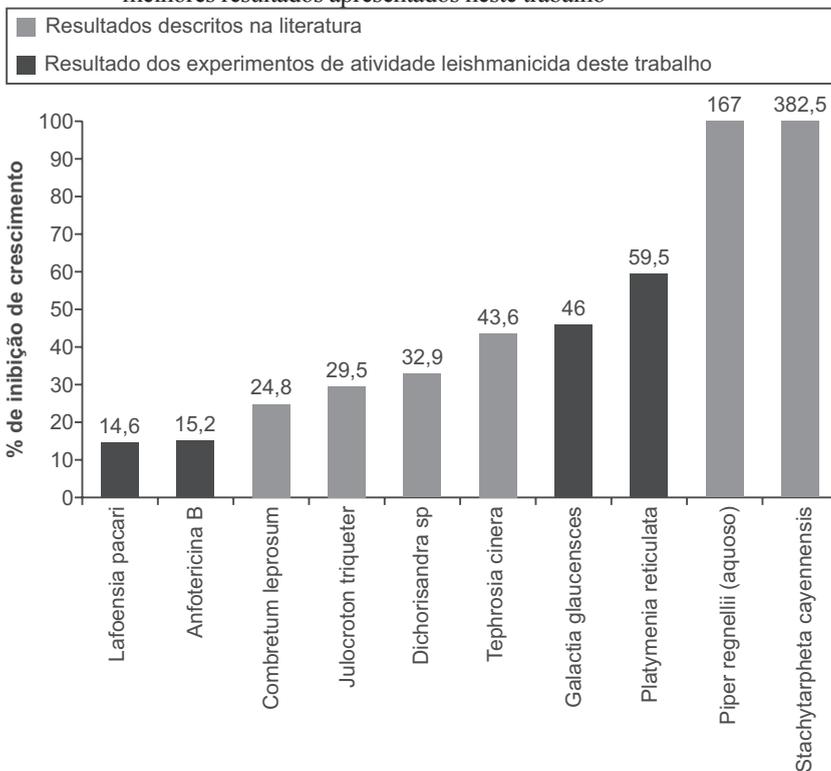
A prospecção fitoquímica qualitativa foi realizada somente para as seis espécies que apresentaram os valores mais expressivos na atividade leishmanicida. A análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (29). As reações químicas de caracterização (precipitação e coloração) estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Prospecção fitoquímica das classes de produtos naturais pertencentes aos extratos hidroalcoólicos liofilizados das sete espécies vegetais em estudo

	<i>Lafoensia pacari</i>	<i>Plathymenia reticulata</i>	<i>Terminalia fagifolia</i>	<i>Vochysia haenkeana</i>	<i>Vellozia squamata</i>	<i>Galactia glaucensces</i>
Antraquinonas	+	-	+	+	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	+	+
Triterpenoides	-	+	+	+	-	+
Esteróides	+	+	-	+	+	+
Saponinas	+	-	+	+	+	+
Cumarinas	+	-	+	-	+	-
Compostos Fenólicos	+	+	+	-	-	+
Taninos	+	+	+	+	-	+
Antocianidinas	-	-	-	-	-	-
Chalconas	-	-	-	-	-	+

(+) Presença (-) Ausência

Gráfico 1. Comparação entre os valores de IC₅₀ encontrados na literatura e os três melhores resultados apresentados neste trabalho



% inibição de crescimento dos parasitos.

DISCUSSÃO

Bezerra et al. (2006) avaliaram o efeito de dez extratos de plantas medicinais em culturas de promastigotas de *L. amazonensis*. Os extratos hidroalcoólicos de *Julocroton triqueter* (Lam.) Didr. var. *triqueter* (Euphorbiaceae), *Dichorisandra* sp (Commelinaceae) e *Tephrosia cinera* (L) Pers. (Fabaceae) apresentaram maior eficácia, com IC₅₀ de 29,5 µg/mL, 32,9µg/mL e 43,6µg/mL, respectivamente (3).

Em estudos realizados por Nakamura et al. (2006), foram avaliadas as atividades dos extratos brutos e suas frações, obtidos de folhas de *Piper regnellii* var *pallescens*, sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio Warren a 28°C durante 72 horas. O efeito das frações, aquosa e acetato etila, apresentou maior atividade com IC₅₀ de 167 µg/mL e 30 µg/mL, respectivamente. Outro exemplo é o da espécie vegetal *Stachytarpheta cayennensis* (25). Ao testar a atividade de seu extrato hidroalcoólico, observou-se um IC₅₀ de 382,5 µg/mL para

a *L. amazonenses*, valor considerado elevado se comparado com o teste realizado para *L. braziliensis*, cujo IC₅₀ foi de 73,7 µg/mL (22).

Teles et al. (2011) testaram o extrato etanólico dos frutos de *Combretum leprosum* Mart. quanto à sua atividade tóxica contra promastigotas de *L. amazonensis*, o extrato foi ativo e apresentou IC₅₀ de 24,8µg/ml (32).

A prospecção fitoquímica destes extratos revelou, nas espécies com melhor atividade leishmanicida – *L. pacari*, *G. glaucensces*, *P. reticulata* e *V. haenkeana*, principalmente a presença de flavonoides, triterpenoides, esteroides e taninos. Na espécie *L. pacari*, já havia sido confirmada a presença de esteroides e triterpenoides, em alta concentração nas folhas, bem como de taninos e fenóis simples (15, 31). Entretanto, em virtude da utilização apenas da entrecasca no presente estudo, não foram identificados os triterpenos, o que demonstra a existência de maior ou menor concentração de classes de metabolitos secundários em diferentes partes da planta.

Estudos de rotas biossintéticas demonstraram como precursor o squaleno, um triterpeno oriundo do pirofosfato de farnesila, para os esteroides e saponinas, o que reforça a existência de triterpenos na espécie *L. pacari* (9).

A estação de coleta da planta é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a composição dos constituintes ativos não são constantes durante o ano. De acordo com Gobbo-Neto (2007), os outros fatores que podem influenciar o conteúdo de metabolitos secundários são: ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, devendo-se considerar também a idade da planta (13).

Ncube et al. (2010), estudando a variação sazonal do conteúdo de taninos condensados de plantas medicinais da África do Sul, observaram que os bulbos e folhas de *Tulbaghia violácea* e *Hypoxis hemerocallidea* e as folhas de *Merwillia plumbea* exibiram maiores concentrações durante o inverno, enquanto bulbos e folhas de *Drimia robusta*, durante a primavera. Já os bulbos de *M. plumbea* apresentaram os maiores valores dos referidos taninos durante o verão (26).

Assim, evidencia-se a importância de mais estudos e possíveis fracionamentos destes extratos na busca por metabolitos secundários com maior atividade leishmanicida e menor citotoxicidade.

Apenas o extrato hidroalcoólico da espécie *L. pacari* manteve ou confirmou o resultado da triagem com os testes *in vitro*.

Na prospecção fitoquímica, foi evidenciada a presença de flavonoides, triterpenoides, esteroides e taninos que, segundo a literatura, são responsáveis pela atividade leishmanicida.

Estes resultados indicam a necessidade de mais estudos para a avaliação do caráter citotóxico dos extratos, da atividade em infecções *in vivo*, bem como do fracionamento na busca por substâncias responsáveis pela ação leishmanicida encontrada nos extratos. A indicação das quatro classes de metabolitos secundários pode orientar este trabalho no sentido do isolamento destas moléculas e,

principalmente, na identificação de sua estrutura química, imprescindível no estudo do mecanismo de ação fisiológica.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia (LIP) do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, ao Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Tocantins e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Aratújo DS, Chaves MH. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. *Quim Nova* 28: 996-999, 2005.
2. Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM, Uliana SRB. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother* 63: 643-649, 2009.
3. Bergman BR, Costa SS, Moraes VLG. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. *Brazilian Journal Association for the Advancement of Science* 49: 95-402, 1997.
4. Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM, Amaral FMM, Rebelo JMM, Guerra RNM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 16: 631-637, 2006.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
6. Cechinel-Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova* 21: 99-105, 1998.
7. Costa AF. *Farmacognosia*. Fundação Calouste Guibenkian, Lisboa, 1982. p. 1032.
8. Croft S, Coombs G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 19: 502- 505, 2003.
9. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 27: 305-318, 2004.
10. Dewick PM. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 1997. p. 201-202.
11. Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol* 22: 4-6, 2006.
12. Fernandes AT. Atividade farmacológica dos extratos obtidos da *Plathymenia reticulata* Benth (leguminosae). [Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas pela Universidade de Campinas], 2002.
13. Gonçalves da Costa SC, Lagrange PH. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistant to infection by *Trypanosoma cruzi* in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 367-381, 1981.
14. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova* 30: 374-381, 2007.
15. Guarin Neto G, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot Bras* 17: 561-584. 2003.
16. Honda NK, Garcez FR, Garcez WS, Conceição CA. Estudo Químico de Plantas de Mato Grosso do Sul I: Triagem fitoquímica. *Revista Científica e Cultural da UFMS* 1: 37-46, 1990.

17. Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado Brasileiro. Megadiversidade. Vol. 1, Julho de 2005. Disponível em: falta Acesso em 20 de agosto de 2012.
18. Leal SR, Lima MA, Silveira ER. Cassane diterpenes from *Plathymenia reticulata*. *J Braz Chem Soc* 14: 120-125, 2003.
19. Matos FJA. *Introdução à fitoquímica experimental*, EUFC, Fortaleza, Brasil. 1997.
20. Marzochi MCA. Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104, 1992.
21. Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva Júnior MC, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE. Flora vascular do Cerrado. In: Sano S e Almeida S (eds.). *Cerrado, Ambiente e flora*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –Embrapa - Cerrados, Planaltina, Brasil, 1998.
22. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Sistema de Informação de Agravos de Notificação /SINAN, 2012.
23. Moreira RCR, Costa GC, Lopes TC, Bezerra JL, Guerra RNM, Rebelo JMM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Costa JML. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae) *Rev Bras Farmacogn* 17: 59-63, 2007.
24. Ministério da Saúde. FUNASA. Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral. In: *Situação de prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil*. Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2002.
25. Ministério da Saúde /Guia de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA. In: Guia de Vigilância Epidemiológica, Fundação Nacional de Saúde. Brasília, 1998.
26. Nakamura CV, Santos AO, Vendrametto MC, Luize OS, Dias Filho BP, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.)C. DC. var. *pallescens*(C. DC.) Yunck. *Rev Bras Farmacogn* 16: 61-66, 2006.
27. Ncube B, Finnie JF, Staden JV. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. *South African Journal of Botany* 77: 387-396, 2011.
28. Neto GG. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. *Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental* 17: 71-89, 2006.
29. Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC, Andrade Júnior HF, Tempone AG. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quím Nova* 26: 550-553, 2003.
30. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2001.
31. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2007.
32. Tamashiro Filho P. *Avaliação da atividade antiúlcerao extrato bruto metanólico de Lajoensia pacari St.Hil.(mangava brava)*. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Ambiente) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 1999.
33. Teles CBG, Moreira LS, Silva AAE, Facundo VA, Zuliani JP, Stábéli RG, Silva-Jardim I. Falta o nome do artigo. *J Braz Chem Soc* 22: 936, 2011.