



# Efeito leishmanicida *in vitro* do látex de *Croton lechleri* (Euphorbiaceae)

Ana Paula de Azevedo dos Santos<sup>1,3</sup>; Selma Guidorizzi Antônio Pacheco<sup>2</sup>; Carolina Bioni Garcia Teles<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Coordenação de Biologia, Faculdade São Lucas, Porto Velho, RO, Brasil.

<sup>2</sup>Instituição de Ensino Campo Limpo Paulista, Campo Limpo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Saúde, Fiocruz, Porto Velho, RO, Brasil.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é uma infecção causada por uma variedade de espécies de *Leishmania*, é transmitida ao homem por flebotomíneos. Os antimoniais pentavalentes são utilizados na quimioterapia dessa doença; no entanto, esses fármacos provocam uma série de efeitos colaterais, além de apresentar altos índices de toxicidade. Na busca por novos agentes leishmanicidas, avaliamos *in vitro* o extrato do látex de *Croton lechleri* (Sangue de dragão) frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. O extrato foi obtido através da desidratação do látex de *C. lechleri* e diluído em solução 10% de etanol em salina tamponada com fosfato. As promastigotas de *Leishmania* foram cultivadas juntamente com o extrato nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25µg/mL por 72 horas. O extrato apresentou eficácia em todas as concentrações testadas apresentando um IC<sub>50</sub> (concentração inibitória) de 5,04µg/mL para *L. amazonensis* e IC<sub>50</sub> de 9,05µg/mL para *L. guyanensis*. Foi realizada a avaliação citotóxica em células J774 nas mesmas concentrações usadas no ensaio leishmanicida, porém a concentração de 25µg/mL apresentou índice de toxicidade de aproximadamente 50% para a célula hospedeira. Os testes realizados mostraram-se promissores, pois o extrato testado também foi capaz de inibir o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* após ensaio de infecção com células J774.

Palavras-chave: *Croton lechleri*. Atividade leishmanicida. Atividade citotóxica.

## INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada um grande problema de saúde pública encontrando-se entre as doenças endêmicas de maior prevalência mundial atingindo mais de 88 países, tendo em média 12 milhões de casos anuais e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (Desjeux, 2004; Alvar *et al.*, 2012). A leishmaniose é uma infecção causada por parasitas do gênero *Leishmania* que são transmitidos por hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Lainson & Shaw, 1992; Gontijo, 2003; Rangel & Lainson, 2009).

O tratamento baseia-se no uso de antimoniais pentavalentes (Sb+5) como o Glucantime que é o medicamento de primeira escolha no tratamento e indicado em todas as formas clínicas da LTA, por outro lado há outros fármacos disponíveis como a Anfotericina B e Pentamidina. O tratamento ainda é considerado limitado devido ao seu alto custo, administração parenteral e necessidade de internação do paciente, longo período de tratamento, além da alta toxicidade do medicamento. Apesar de apresentar grande prevalência mundial, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses. Por esse motivo a Organização Mundial de Saúde tem estimulado as pesquisas com novos agentes leishmanicida (Croft *et al.*, 2006; López, 2010).

Neste sentido, várias substâncias químicas e extratos de plantas são objeto de diversos estudos com a finalidade de encontrar novos agentes leishmanicidas com menor efeito cardio-hepato-nefrotóxico e ótima biodisponibilidade (Bezerra *et al.*, 2004; Tempone *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013).

O *Croton lechleri* pertence à família Euphorbiaceae e sua distribuição geográfica abrange as Américas, África continental, Madagascar e Antilhas; no Brasil é encontrada em vários estados, sendo que a disseminação da espécie ocorre nos estados do Acre e Rondônia, principalmente ao longo das margens do rio Madeira (Govaerts & Smith, 2000; Azevedo *et al.*, 2008).

Autor correspondente: Carolina Bioni Garcia Teles - Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Saúde, Fiocruz Rondônia, Porto Velho- RO, Brasil - Rua da Beira, 7671 BR 364 Km 3,5 Lagoa - CEP.76812-245. E-mail: carolinateles@fiocruz.br

Essa espécie é usada como planta medicinal por povos indígenas na Amazônia, e também tem sido alvo de estudos fitoterápicos por apresentar alcalóides ativos, os quais são secretados pelo órgão folicular. A casca produz um látex denso e por essa característica é conhecida popularmente como sangue de dragão, sangue de grado ou sangue de drago (Cai *et al.*, 1991). Do látex foram isolados compostos químicos como o alcalóide taspine, que apresenta atividade cicatrizante, antibiótica, anti-inflamatória e antitumoral, e por apresentar essas propriedades é usado empiricamente para fins terapêuticos no tratamento de várias enfermidades (Pollito & Tomazello, 2007; Campos, 2009; Rossi *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2013). Devido as suas propriedades biológicas, é alvo de estudos quanto ao seu potencial antifúngico (Franco *et al.*, 2013), antibacteriano, antiviral (Jones, 2003; Ortiz *et al.*, 2003) e antiparasitário (Yapu *et al.*, 2008). Estudos buscando avaliar ação leishmanicida do látex de *C. lechleri* ainda são escassos (Satalaya *et al.*, 2009).

Visto que os fármacos disponíveis para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar apresentam evidências de ineficácia terapêutica, casos de múltipla resistência ao medicamento, além da ausência de vacinas disponíveis à doença; o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida do extrato do látex do *C. lechleri* frente a formas promastigotas *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

O látex de *C. lechleri* utilizado neste trabalho foi cedido pelo Horto de Plantas Medicinais da Comunidade Santa Marcelina, localizado na BR 364 km 19, saída para Cuiabá, no município de Porto Velho-RO.

### Preparação do extrato do látex de *Croton lechleri*

Cinco a dez mL do látex bruto foram colocadas em placas de Petri estéreis e armazenadas em temperatura ambiente para processo de secagem e desidratação. Após a desidratação foi obtido um pó, posteriormente foi feita a pesagem do material e os resíduos secos foram diluídos em solução 10% de etanol P.A. (SIGMA) em solução tamponada de fosfato (PBS pH 7,4) em concentração final de 1 mg/mL.

### Manutenção do Parasita

As culturas das formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) foram mantidas a 24°C em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) previamente inativado (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Gibco), 20 nM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico; Gibco) e 50 µg/mL de Gentamicina. Antes de cada experimento foi observado a viabilidade e motilidade flagelar dos parasitas em microscópio ótico no aumento de 400X.

### Atividade leishmanicida frente a formas promastigotas

Os parasitas foram mantidos em meio de cultura e no período de crescimento exponencial de 5x10<sup>5</sup> células/mL foram depositadas em tubos de 1,5mL, incubadas a 24°C com o extrato de *C. lechleri* previamente obtido, por 72h nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25µg/mL. A atividade leishmanicida do extrato foi avaliada pela inibição de crescimento das formas promastigotas, após 72h de incubação pela contagem total de parasitas vivos. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico. Os resultados foram expressos como concentração inibitória de 50% crescimento (IC<sub>50</sub>). Em paralelo foram realizados os controles negativo sem tratamento, positivo com 5µg/mL de Pentamidina (Sigma) e de etanol (EtOH) a 0,04% v/v (volume de etanol utilizado na maior concentração testada - 25µg/mL) para verificação da eficácia do ensaio (Lima *et al.*, 2011).

### Determinação da citotoxicidade em células de linhagens J774

Macrófagos de linhagem J774 foram plaqueados a concentração de 2x10<sup>4</sup> células/poço em placas de 96 poços. O extrato de *C. lechleri* foi testado nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25µg/mL por 24h. A viabilidade celular foi determinada pela técnica colorimétrica de MTT, a qual envolve a conversão do sal de tetrazólio (MTT) à cristais de formazana. Para tanto 10µL de solução MTT (5mg/mL em PBS) foi incubado a 37°C em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> por 2h. Após o período de incubação, 100µL de DMSO foi adicionado em cada poço, e incubou-se por mais 1h em temperatura ambiente. A densidade óptica foi determinada utilizando leitor de microplacas (Sunrise - Tecan), com comprimento de onda de 570nm. Em paralelo foi realizado o controle negativo sem tratamento e o controle com EtOH nas mesmas condições do ensaio anterior com promastigotas (EtOH a 0,04% v/v, maior concentração testada - 25µg/mL) (Teles *et al.*, 2011).

Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade através da fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Absorbância teste}}{\text{Absorbância controle}} \times 100$$

### Infecção de células de linhagem J774 e sobrevivência do parasita

Células de linhagem J774 foram semeadas a 2x10<sup>4</sup> células/poço em microplacas de 24 poços. As células foram cultivadas em meio RPMI completo por 18h a 37°C em estufa 5% de CO<sub>2</sub>. A infecção com promastigotas de *L. amazonensis* foi feita na proporção de 20:1 e em seguida incubadas por 18h a 37°C. As células infectadas foram tratadas com o extrato de *C. lechleri* nas concentrações 6,25 e 12,5µg/mL e incubadas por 24h. Após esse período o meio de cultura foi trocado, adicionando-se 1mL de meio

Tabela 1. Atividade leishmanicida do extrato do látex de *Croton lechleri* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* cultivadas por 72 horas.

	<i>C. lechleri</i>			C+EtOH 0,04%	Pentamidina 5µg/ml	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	6,25µg/mL	12,5µg/mL	25µg/mL			
<i>L. amazonensis</i>	61%±0,77	87%±2,17	99,9%±0,08	7,36%±1,06	99,2%±1,79	5,04
<i>L. guyanensis</i>	7,5%±8,40	97,3%±1,46	98,4%±0,67	11,7%±4,6	95%±0,01	9,05

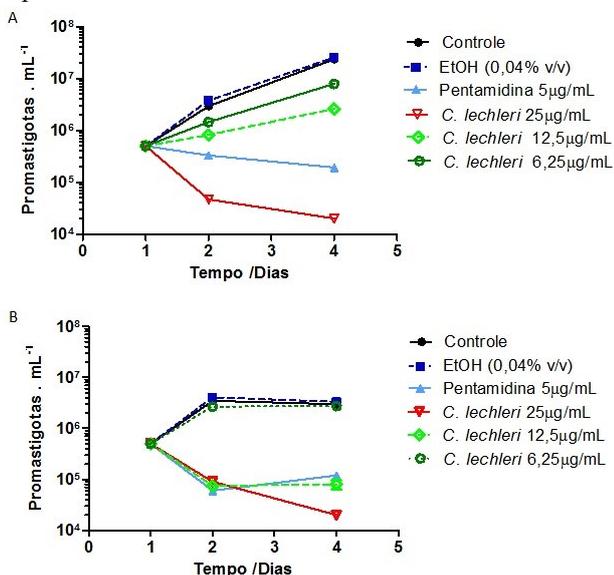
Os resultados expressos em porcentagem representam o índice de Inibição de Crescimento (IC).

C+EtOH= Controle + etanol

±= Desvio padrão

IC<sub>50</sub>= Inibição do crescimento de 50% dos parasitos

Figura 1: Atividade leishmanicida do extrato do látex de *Croton lechleri* contra as formas promastigotas de *Leishmanias*. (A) *Leishmania amazonensis*, (B) *Leishmania guyanensis*. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados em datas diferentes.



Schneider (Sigma) suplementado com 10% de SFB e então incubou-se a 24°C por 96h.

A troca pelo meio Schneider com pH baixo, mantido a 24°C mimetiza a condição natural do intestino do flebotomíneo, que é adequado ao crescimento de promastigotas, e elimina os macrófagos das culturas. Dessa forma, as amastigotas que sobreviveram ao tratamento no interior da célula hospedeira, passarão pelo processo de diferenciação para formas promastigotas que podem ser visualizadas e contadas no microscópio óptico (nº de promastigotas visualizadas equivale ao nº de amastigotas sobreviventes).

Para verificar a presença dos parasitas na forma promastigota foram realizadas contagens no 1º e 4º dia após a troca do meio (adaptado de Khouri *et al.*, 2010). O Glucantime, droga de primeira escolha para o tratamento da Leishmaniose, também foi testada neste ensaio na concentração de 100µg/mL, que corresponde a níveis aproximados no plasma de humanos tratados com este medicamento (Martinez-Rojano *et al.*, 2008).

### Análise estatística

Os ensaios foram realizados em quadruplicata e em duas ocasiões diferentes. A análise de regressão linear simples foi utilizada para estimar a relação entre a concentração e o percentual de inibição. Para tanto o software Minitab14 (Minitab Inc.) foi usado na determinação da concentração inibitória do crescimento parasitário (IC<sub>50</sub>), os dados foram analisados no programa Software Graphad PRISM 5.0. Diferenças estatísticas foram determinadas por Student-Newman-Keuls ao nível de significância de p<0,05.

### RESULTADOS

Ficou evidenciado que em todas as concentrações testadas ocorreu atividade leishmanicida para a espécie de *L. amazonensis*, enquanto para *L. guyanensis* foi observada a inibição de crescimento somente das concentrações mais altas (12,5 e 25 µg/mL). O extrato exerce efeito em 24h de tratamento, na concentração de 25µg/mL, em que é possível observar inibição do crescimento de 98% para *L. amazonensis* e 97,4% para *L. guyanensis* (Figura 1). Análise do tratamento em 72h demonstrou efeito leishmanicida de até 99,9% para *L. amazonensis* (Tabela 1). Em todas as concentrações testadas para *L. amazonensis* houve diferença estatística (F=195,7; p<0,05) entre o grupo tratado e o controle sem tratamento, enquanto que para *L. guyanensis* observou-se diferença significativa em relação ao controle (F=32,9; p<0,05) entre as concentrações de 12,5 e 25µg/mL.

O controle positivo somente com etanol (EtOH) na proporção de 0,04%v/v usado para solubilização do extrato não apresentou citotoxicidade estatisticamente significativa. O extrato de *C. lechleri* foi mais efetivo contra *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> 5,04µg/mL) do que *L. guyanensis* (IC<sub>50</sub> 9,05µg/mL).

Quanto à análise de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem J774 observou-se que somente a concentração 25µg/mL foi capaz de matar aproximadamente 50% das células (Figura 2). As concentrações de 6,25 e 12,5µg/mL do extrato não apresentaram efeito citotóxico relevante quando comparadas com o controle.

A partir da inibição das formas promastigotas do extrato do látex de *C. lechleri*, foram realizados testes preliminares para avaliar a atividade do extrato na sobrevivência de *L. amazonensis* em células J774. Os

Figura 2: Avaliação citotóxica do extrato do látex de *Croton lechleri* em diferentes concentrações em macrófagos de linhagem J774. EtOH= Controle + etanol.

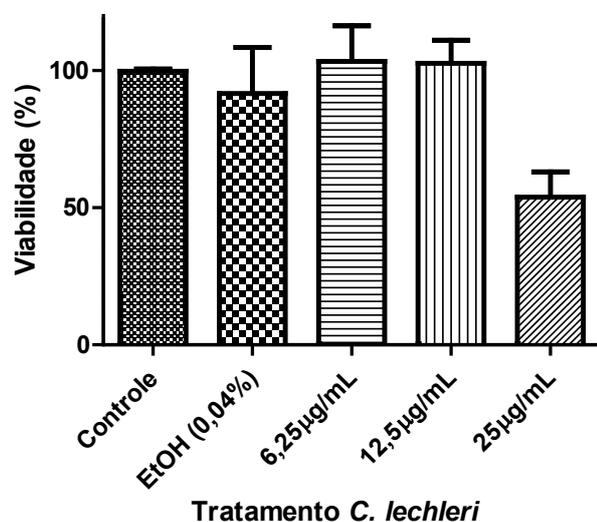
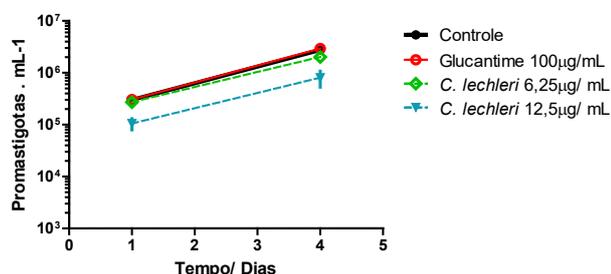


Figura 3: Efeito inibitório do látex de *Croton lechleri* na diferenciação de amastigotas para promastigotas de *Leishmania amazonensis* após infecção em células J774. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados em datas diferentes.



resultados obtidos no quarto dia de contagem mostraram que na concentração de 6,25µg/mL ocorre inibição de crescimento de 27% ( $\pm 3,7$ ), enquanto que para concentração de 12,5µg/mL o índice é 65,4% ( $\pm 6,8$ ) (Figura 3). Somente o tratamento com 100µg/mL de Glucantime não provocou morte significativa dos parasitas em relação ao controle sem tratamento ( $F=20,75$ ;  $p<0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A busca por novos fármacos e o uso de plantas medicinais no tratamento de lesões ulceradas de LTA, como também em ensaios *in vitro* é alvo de muitos estudos nos últimos anos (Verdi *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2008; Teles *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013). A pesquisa por novos fármacos passa por várias etapas de testes que se inicia com ensaios *in vitro* da atividade antiparasitária e de citotoxicidade; esses testes são importantes, pois permitem

obter parâmetros para serem usados em ensaios *in vivo* (Croft *et al.*, 2006).

Baseando-se nas considerações dos ensaios leishmanicida e citotoxicidade, este é o primeiro relato do látex de *C. lechleri* em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. O extrato na concentração de 12,5µg/mL apresenta potencial inibitório de 87% para *L. amazonensis* e 97,3% para *L. guyanensis*. Estudos realizados por Satalaya *et al.* (2009) demonstram a ação leishmanicida do extrato aquoso e etanólico da folha do *C. lechleri* em promastigotas de *Leishmania*, exibindo  $IC_{50}$  83,8 µg/mL para a espécie *L. braziliensis*,  $IC_{50}$  80,4 µg/mL para *L. donovani*, enquanto que para *L. amazonensis* foi inativo.

Quando comparado com ensaio de citotoxicidade a concentração de 25µg/mL apresenta percentual de morte de aproximadamente 50% frente às células J774. Fão *et al.* (2012) comparou análise mutagênica do extrato da seiva (casca) de *C. lechleri* em várias concentrações, por meio do teste de micronúcleo em *Allium cepa*, o mesmo relata que em concentrações maiores (2% do extrato da seiva) apresenta altos índices mutagênicos. Rossi *et al.* (2003) avaliou a atividade de proteção do *C. lechleri* contra mutagênicidade através de sua atividade biológica; por apresentar efeitos citotóxicos frente a células cancerígenas o látex vem sendo usado em ensaios clínicos (Castro *et al.*, 2012).

Avaliando a ação do extrato do látex de *C. lechleri* sobre o desenvolvimento da *L. amazonensis* em célula hospedeira, os resultados mostram que 24h de tratamento na concentração de 12,5µg/mL houve inibição significativa de 65,4% sobre a diferenciação de formas amastigotas para promastigotas (Figura 3).

O potencial imunomodulador e anti-inflamatório do látex de *C. lechleri* já relatado na literatura (Risco *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2013) aliado ao efeito anti-*Leishmania* encontrado nesse estudo, são fatores favoráveis e importantes a serem considerados numa cicatrização de lesão cutânea da leishmaniose. Comparando os dados obtidos entre o extrato e o Glucantime (cuja concentração testada é proporcional a níveis plasmáticos desse fármaco durante o tratamento), observa-se que o extrato na concentração de 6,25µg/mL tem ação mais efetiva que a concentração de 100µg/mL do Glucantime, pouco ainda se entende sobre o mecanismo de ação desse fármaco (Croft *et al.*, 2006). O efeito não citotóxico do Glucantime frente as formas amastigotas observada nesse estudo sugere que o antimônio pentavalente não foi convertido em antimônio trivalente pelas células de linhagem J774 em tempo e quantidades suficientes capaz de interferir na morte do parasito. A ineficiência desse fármaco nos testes *in vitro* poderia ser explicada também pelo fato desse fármaco ser descrito como imunomodulador, sendo sua eficiência muitas vezes dependente da ativação macrofágica, produção de NO e reativos intermediários de oxigênio (ROIs) (Croft & Coombs, 2003). Para alguns autores esse fármaco apresenta ação leishmanicida *in vitro* na concentração de 300µg/mL

(Vila Nova, 2008; Amaral, 2011), esse dado pode explicar em parte a necessidade de um tratamento contínuo, por período prolongado com índices de cura muito variáveis de acordo com o Ministério da Saúde.

Os resultados dos testes *in vitro* deste trabalho indicam que o extrato do látex de *C. lechleri* vem a ser um bom candidato como fonte alternativa de produtos naturais e uma nova proposta como tratamento fitoterápico. Os dados contribuem na busca por uma nova alternativa no tratamento contra a Leishmaniose Tegumentar Americana.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade São Lucas pela bolsa de Iniciação Científica (PIC). Ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Saúde – FIOCRUZ/RO, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

## ABSTRACT

*In vitro leishmanicidal effect of Croton lechleri latex*

**Cutaneous Leishmaniasis is an infection caused by a several species of *Leishmania*, is transmitted to humans by phlebotomine sandflies. Pentavalent antimonial compounds are used in the chemotherapy of this disease; however, these drugs cause several collateral effects, besides presenting high levels of toxicity. The search for new antiLeishmanial agents, we assessed *in vitro* the extract of *Croton lechleri* latex (Blood Dragon) against the promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis*. The extract was obtained by dehydration *C. lechleri* latex mass and the solution was diluted with 10% ethanol in phosphate buffered saline solution. The *Leishmania* promastigotes were grown with the extract following concentrations 6.25; 12.5 and 25µg/mL for 72 hours. The extract showed efficacy in all concentrations tested showing an IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration) of 5.04 µg/mL for *L. amazonensis* and IC<sub>50</sub> of 9.05 µg/mL for *L. guyanensis*. Cytotoxic evaluation was performed in J774 cells at the same concentrations used in the leishmanicidal assay, but the concentration of 25µg/mL showed toxicity index of approximately 50% for the host cell. Tests carried out proved promising, since the extracts tested was also able to inhibit the *L. amazonensis* promastigotes growth after infection assay with J774 cells.**

Keywords: *Croton lechleri*. Leishmanicidal Activity. Cytotoxic activity.

## REFERÊNCIAS

Almeida MFO, Melo ACR, Pinheiro MLB, Silva JRA, Souza ADL. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Quim Nova*. 2011;34,(7):1182-7.

Amaral AE. Avaliação dos efeitos de complexos polissacarídeos-oxovanádio (IV/V) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *Leishmania in vitro*. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, UFP; 2011.

Alvar J, Ve'lez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boerl M, WHO *Leishmaniasis* Control Team. *Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence*. *Plos One*. 2012;7(5):e35671.

Bezerra RJS, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Rev Bras Ciênc Farm*.

2004;40(2):141-8.

Azevedo KAA, Lima Á, Leite A, Melo T, Costa J, Pereira MA, Campos CA, Lima A. Guia Para a Extração de Sangue de Grado (*Croton lechleri* MÜLL. ARG.): recomendações técnicas para a extração de látex de sangue de grado (sangue de dragão). Rio Branco-AC: USAID/IPAM, 28p. 2008.

Cai Y, Evans F, Roberts M, Phillipson JD, Zenk M, Gleba Y. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*. 1991;30:2033-40.

Castro AAJ, Sánchez EO, Domínguez F, Toledo GL, Chávez M, Tello AJO, Carrancá AG. Antitumor effect of *Croton lechleri* Müll. Arg (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2012;140:438-42.

Campos MS. Avaliação da Biocompatibilidade da Seiva do *Croton lechleri* (sangue de dragão) em Tecido Subcutâneo de Ratos. [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP; 2009.

Croft SL, Karin S, Yardley V. Current scenario of drug development for *Leishmaniasis*. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):399-410.

Croft SL, Coombs, GH. *Leishmaniasis*: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003;19(11):502-8.

Desjeux P. *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305-18.

Fão F, Zan RA, Brondani FMM, Ramos LJ, Meneguetti DUO. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. *Rev. Saúde Biol*. 2012;7(1):91-8.

Franco AP, Peres AR, Souza MFP, Queiroz MS, Assis JMF. Ação de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos simbiotes das formigas cortadeiras. *Eng Amb Esp Sant Pinhal*. 2013;10(1):103-13.

Gil ES, Paula JR, Nascimento FRF, Bezerra JCB. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2008;29(3):223-30.

- Govaerts R, Frodin DG, Smith AR. World Checklist and 185 bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae). Kew, Richmond (London): Royal Botanic Gardens; 2000. v.1-4.
- Gontijo B, Carvalho ML. American cutaneous *Leishmaniasis*. Soc Bras Med Trop. 2003;36:71-80.
- Jones K. Review of sangre de drago (*Croton lechleri*) - a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections and wounds: traditional uses to clinical research. J Altern Complement Med. 2003;9(6):877-96
- Lainson R, Shaw JJ. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. J Braz Assoc Adv Sci. 1992;(44):94-106.
- Lima ÉR, Moreira LS, Facundo VA, Silva-Jardim I, Teles CBG. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microorganismos. Saber Científico, (Porto Velho). 2011;3(1):53-69.
- López RES. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Quim Nova. 2010;(33):1541-8.
- Lopes TV, Félix SR, Schons SV, Nobre MO. Dragon's blood (*Croton lechleri* Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. Rev Bras Hig Sani Ani. 2013;07(2):167-91.
- Martinez-Rojano H, Mancilla-Ramirez J, Quinonez-Diaz L, Galindo-Sevilla N. Activity of hydroxyurea against *Leishmania mexicana*. Antimicrob. Agentes Chemother. 2008;(52):3642-7.
- Khouri R, Novais F, Santana G, Oliveira CI, Santos MAV, Barral A, Barra-Neto M, Van JW. DETC induces *Leishmania* parasites killing in human *in vitro* and murine *in vivo* models: A promising therapeutic alternative in *Leishmaniasis*. Plos One. 2010;5(12): 94-143.
- Ortiz TJH, Capcha MR, Palomino CEJ, Aguilar OJ. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. Rev Med Hered. 2003;14(2):81-8.
- Pollito ZPA, Tomazello FM. Espécies lenhosas do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Estado do Acre. Rev Bras Bioci. 2007;5(2):177-9.
- Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous *Leishmaniasis* in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):937-54.
- Risco E, Ghia F, Vila R, Iglesias J, Alvarez E, Canigual S. Immunomodulatory activity and chemical characterization of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. Planta Med. 2003;69(9):785-794.
- Rossi D, Bruni R, Bianchi N, Chiarabelli C, Gambari R, Medici A, Lista A, Paganetto G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* Muell. Arg. latex. Phytomedicine. 2003;10:139-44.
- Rossi D, Guerrini A, Maietti S, Bruni R, Paganetto G, Poli F, Scalvenzi L, Radice M, Saro K, Sacchetti G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) stems bark essential oil: A new functional food ingredient. Food Chem. 2011;126:837-48.
- Santos KKA, Rolón M, Vega C, Arias AR, Costa JGM, Coutinho HDM. Atividade leishmanicida *in vitro* de *Eugenia uniflora* e *Momordicacharantia*. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2013;34(1):47-50.
- Satalaya JR, Rojas UJ, Ríos B, Grandez M, Rengifo E, Grace R, Gutierrez D, Gimenez A, Flores N. Actividad antiparasitaria de plantas medicinales de La Amazonía Peruana. Biofarbo. 2009;17(2):23-31
- Teles CBG, Moreira LS, Silva AAE, Facundo VA, Zuliani JP, Stábeli RG, Silva-Jardim I. Activity of the Lupane Isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* Promastigotes. J Braz Chem Soc. 2011;22(5):936-42.
- Tempone AG, Borborema SET, Andrade Jr HF, Gualda NCA, Yogi A, Carvalho CS, Bachiega D, Lupo FN. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. Phytomedicine. 2005;12(5):382-390.
- Yapu DG, Mozombite DS, Salgado ER, Turba AG. Evaluación de la actividad antiplasmódica *in vitro* de extractos de *Euterpe oleracea*, *Myrciariadubia* y *Croton lechleri*. Biofarbo. 2008;16:16-20.
- Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. Quim Nova. 2005;28: 85-94.
- Vila Nova NS. Ação leishmanicida de alcalóides e acetogeninas extraídas de annonaceae do estado do Ceará. [Dissertação]. Ceará: Universidade Estadual do Ceará: UECE; 2008.

Recebido em 17 de junho de 2014

Aceito em 08 de agosto de 2014