

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DE *Ximenia americana* SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum*

Janderson Weydson Lopes Menezes Da Silva¹;

¹Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/1939325935708228>

Brenda Rocha Lima²;

²Centro Universitário Maurício de Nassau (UNINASSAU), Recife, PE.

<http://lattes.cnpq.br/7578031018270111>

Patrycks Willhian de Araújo Ferreira³;

³Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/8603403334776196>

Andréa Regina Alves da Rocha Diniz⁴;

⁴Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/6087172856821014>

Josué Araújo de Lima⁵;

⁵Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/0931636457001447>

Rayane Maria Castro da Silva⁶;

⁶Instituto Keizo Asami (iLika-UFPE), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/3707039654204066>

Ariane Pereira da Costa⁷;

⁷Instituto Keizo Asami (iLika-UFPE), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/2335435910706716>

Igor Soares Gouveia⁸;

⁸Instituto Keizo Asami (iLika-UFPE), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/8150604312901033>

Saulo Cockles Criasanto da Silva⁹;

⁹Instituto Keizo Asami (iLika-UFPE), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/4091489754723852>

Antônio Maurício Alves Neto¹⁰;

¹⁰Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/8856809880695040>

Fábio André Brayner dos Santos¹¹;

¹¹Instituto Keizo Asami (iLika-UFPE), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/7464633588638483>

Luiz Carlos Alves¹².

¹²Instituto Keizo Asami (iLika-UFPE), Recife, Pernambuco.

<http://lattes.cnpq.br/4951638470777523>

RESUMO: A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada causada por espécies do complexo *Leishmania donovani* e tratada principalmente com antimoniais pentavalentes e anfotericina B. Entretanto, os efeitos adversos, a toxicidade e o surgimento de cepas resistentes têm impulsionado a busca por novas alternativas terapêuticas, incluindo compostos de origem vegetal. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana*. Foram realizados ensaios em formas promastigotas de *L. infantum*, análises de citotoxicidade em células hepáticas HepG2 e avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica. O extrato apresentou atividade leishmanicida com IC₅₀ de 222,3 µg/mL, enquanto a citotoxicidade em células HepG2 apresentou CC₅₀ de 305,5 µg/mL e índice de seletividade de 1,37. Em comparação à anfotericina B, o extrato demonstrou menor citotoxicidade para células hepáticas. As análises ultraestruturais revelaram alterações significativas nas promastigotas tratadas, incluindo ruptura de membrana plasmática, degradação citoplasmática, alterações no flagelo e inchaço mitocondrial. Os resultados demonstram que o extrato aquoso da casca de *X. americana* exerce atividade leishmanicida associada a alterações estruturais compatíveis com dano celular, evidenciando a presença de compostos bioativos com potencial antiparasitário e justificando a realização de estudos adicionais para seu aprimoramento e caracterização.

PALAVRAS-CHAVE: *Ximenia americana*. *Leishmania infantum*. Ultraestrutura.

ULTRASTRUCTURE AND LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF THE AQUEOUS BARK EXTRACT OF *Ximenia americana* AGAINST PROMASTIGOTE FORMS OF *Leishmania infantum*

ABSTRACT: Visceral leishmaniasis is a neglected disease caused by species of the *Leishmania donovani* complex and is mainly treated with pentavalent antimonials and amphotericin B. However, adverse effects, toxicity, and the emergence of resistant strains have driven the search for new therapeutic alternatives, including plant-derived compounds. The aim of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of the aqueous bark extract of *Ximenia americana*. Assays were performed using promastigote forms of *Leishmania infantum*, cytotoxicity analyses in HepG2 liver cells, and ultrastructural evaluation by electron microscopy. The extract exhibited leishmanicidal activity with an IC₅₀ value of 222.3 µg/mL, while cytotoxicity assays in HepG2 cells showed a CC₅₀ value of 305.5 µg/mL and a selectivity index of 1.37. Compared with amphotericin B, the extract demonstrated lower cytotoxicity toward liver cells. Ultrastructural analyses revealed significant alterations in treated promastigotes, including plasma membrane disruption, cytoplasmic degradation, flagellar alterations, and mitochondrial swelling. These findings demonstrate that the aqueous bark extract of *X. americana* exerts leishmanicidal activity associated with structural changes consistent with cellular damage, highlighting the presence of bioactive compounds with antiparasitic potential and supporting further studies aimed at their characterization and optimization.

KEYWORDS: *Ximenia*. *Leishmania infantum*. *Leishmania*. Ultrastructure.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada e considerada um grande problema de saúde pública, essa patologia é causada por duas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*: *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*. Sua transmissão ocorre através da picada do inseto infectado, conhecido como flebotomíneo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2025). A *Leishmania infantum* é uma das principais causadoras da leishmaniose visceral em mamíferos (AOUN; BOURATBINE, 2014; SILVA et al., 2025).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2025) cerca de 1 milhão de novos casos surgem anualmente, com mortalidade de até 30 mil óbitos por ano. Foram reportados diversos casos ao redor do mundo, essa doença tem uma prevalência significativa em países subdesenvolvidos por afetar indivíduos em condição de pobreza aumentando a sua susceptibilidade a contrair a doença, e em indivíduos imunodeprimidos (SILVA et al., 2025).

Os indivíduos acometidos pela leishmaniose são tratados com os quimioterápicos da classe dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B, mas devido ao alto custo, longos períodos de administração, efeitos colaterais indesejados como náusea, vômitos e diarreia, pela grande toxicidade desses fármacos, além do aparecimento de cepas apresentando mecanismo de resistência aos tratamentos preconizados. Por conta disso novos fármacos provenientes de fontes naturais e ou sintéticas estão sendo estudados para que possa ser sugerida uma nova abordagem terapêutica para o tratamento das leishmanioses (SHMUELI & BEN-SHIMOL et al., 2024).

A *Ximenia americana* L. faz parte da família *Oleaceae* e encontra-se bem distribuída na África, Índia, Nova Zelândia, América Central e América do Sul (SILVA et al., 2026). Apesar de ser utilizada como um anti-inflamatório na medicina popular, é uma espécie amplamente estudada cientificamente. As plantas assim como as do gênero *Ximenia* possuem a capacidade metabólica de produzir metabólitos primários e secundários, sendo os secundários responsáveis por propriedades que contribuem para sobrevivência da planta e que podem ser utilizados na medicina (SILVA et al., 2026). Desta forma o presente estudo visa avaliar a atividade leishmanicida da *X. americana* frente a *Leishmania infantum*.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*, bem como investigar sua citotoxicidade em células hepáticas e os efeitos ultraestruturais induzidos no parasito.

METODOLOGIA

O extrato aquoso foi obtido a partir da casca seca, que foi moída e transformada em pó. Em seguida, 10g do material foram submetidos à extração com 100mL de água destilada

aquecida a 100°C por 30 minutos. Após filtração, o extrato foi congelado, liofilizado por 48 horas, macerado até virar pó e armazenado em dessecador para posterior utilização em atividades biológicas.

A atividade biológica do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* foi avaliada em formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR/BH46), ajustadas para concentração de 1×10^6 parasitas/mL. As formas promastigotas foram incubadas na presença de concentrações de teste (25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL) do extrato aquoso da casca de *X. americana*, sendo avaliado diariamente em câmara de Neubauer. O IC₅₀, concentração que inibe 50% do crescimento do parasita, foi determinado após 72 horas de cultura, seguindo a metodologia de Silva *et al.* (2025). A análise da citotoxicidade foi realizada em células hepáticas da linhagem HepG2 utilizando o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina). As células foram incubadas na presença das concentrações 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL do extrato, por 72 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura da absorbância por densidade óptica em 570nm utilizando leitor de ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Para a análise ultraestrutural, formas promastigotas de *L. infantum*, controles e tratadas com concentrações da IC₅₀ e 2x IC₅₀ por 72 horas, foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Para microscopia de transmissão, as amostras foram fixadas (glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, desidratadas, infiltradas e emblocadas em resina EPON. Cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio de transmissão TecNai G2 Spirit TEM (FEI). Na microscopia eletrônica de varredura, as formas promastigotas foram fixadas no mesmo fixador da microscopia da transmissão, aderidas em lamínulas revestidas com poly-lysina, lavadas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em séries crescentes de etanol, submetidas à secagem em ponto crítico (Critical Point Dryer HCP-2, Hitachi), metalizadas com 20nm de ouro no metalizador JFC-1100 (Jeol) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL T-200.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciam a atividade do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum*, evidenciando sua ação leishmanicida, observado através das alterações estruturais, observados por microscopia eletrônica.

A atividade antiparasitária do extrato foi determinada a partir do cálculo do IC₅₀, sendo observado que a concentração de 222.3 µg/mL para *L. infantum* apresentou ação leishmanicida. Esse dado indica que, embora o extrato apresente atividade sobre o parasito, sua atividade mostra-se inferior à do fármaco de referência. Além da atividade antiparasitária, foi avaliada a citotoxicidade do extrato em células hepáticas da linhagem HepG2. O extrato apresentou CC₅₀ de 305.40 µg/mL, enquanto a Anfotericina B apresentou

CC₅₀ de 67.41 µg/mL, evidenciando maior toxicidade do fármaco em comparação ao extrato. A análise do índice de seletividade demonstrou que a Anfotericina B apresentou valores significativamente superior (IS_{HepG2} de 1685.2), enquanto o extrato apresentou IS_{HepG2} >1, conforme apresentado na Tabela 1. Esses resultados permitem observar a relação entre atividade leishmanicida e toxicidade celular, considerando os parâmetros IC₅₀ e CC₅₀ obtidos experimentalmente.

Tabela 1: Ação do extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* sobre promastigotas de *L. infantum* e células hepáticas.

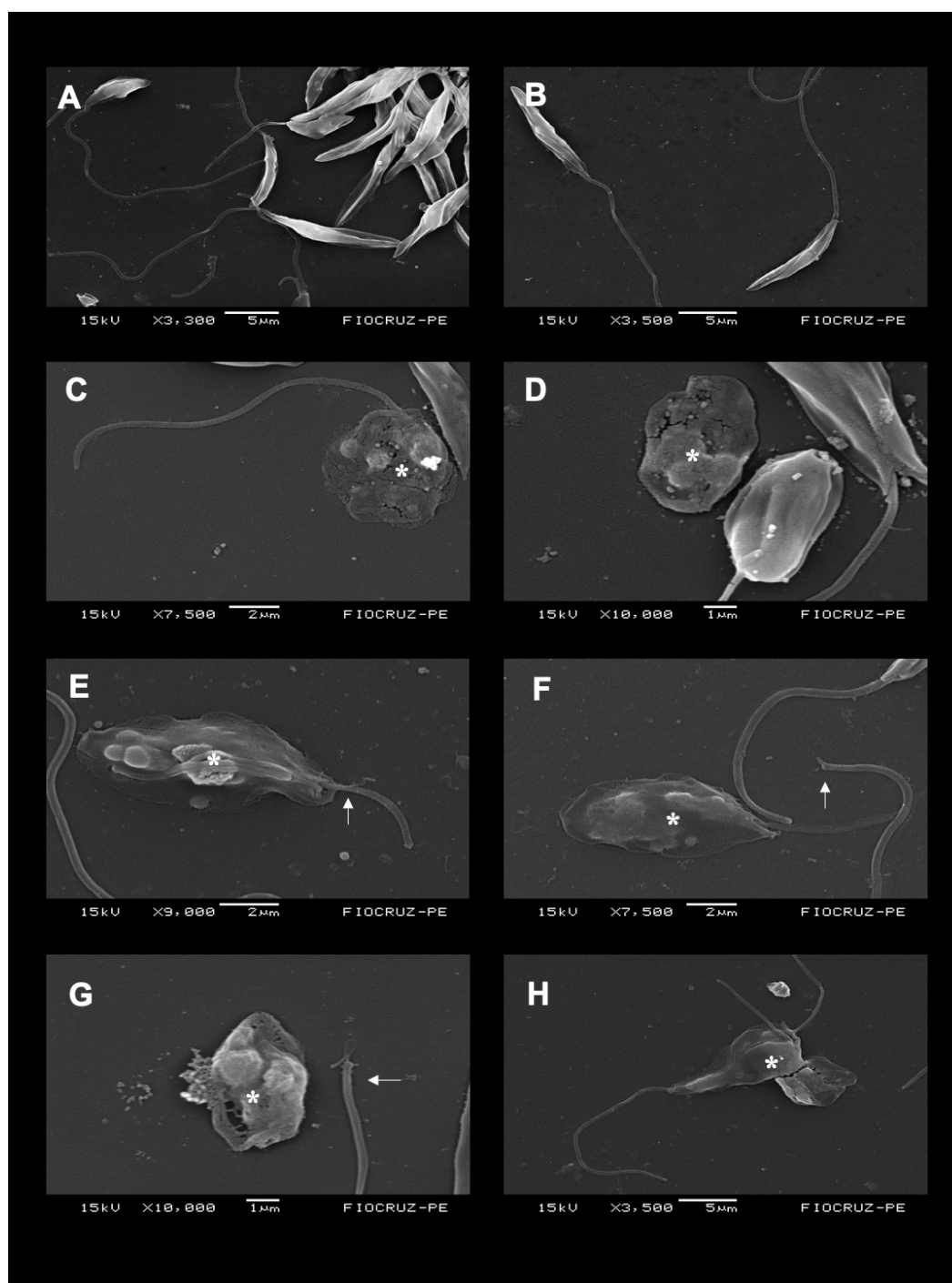
	µg/mL		
	IC ₅₀	CC _{50(HepG2)}	IS _{HepG2}
<i>X. americana</i>	222.3	305.40	1.37
Anfotericina B	0.04	67.41	1685.2

Legenda: IC₅₀ (Concentração Inibitória a 50%), CC₅₀ (Concentração Citotóxica a 50%), IS (Índice de Seletividade) e HepG2 (Linhagem de Células Hepáticas).

Fonte: Autor, 2019

A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura demonstrou diferenças marcantes entre promastigotas tratadas e não tratadas. No grupo controle, as células apresentaram morfologia preservada, com formato fusiforme típico e integridade do corpo celular e do flagelo (Figuras 6A-B). Em contraste, as promastigotas tratadas com Anfotericina B na concentração de 0.04 µg/mL apresentaram alterações estruturais evidentes, incluindo ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figuras 1C-D). As promastigotas tratadas com o extrato aquoso da casca de *X. americana*, nas concentrações correspondentes a 1x IC₅₀ (222.3 µg/mL) e 2x IC₅₀ (444.6 µg/mL), apresentaram alterações morfológicas semelhantes às observadas no tratamento com Anfotericina B. Foram observadas mudanças na forma do corpo celular, ruptura de membrana e extravasamento celular, alterações no flagelo foram frequentemente identificadas, incluindo encurtamento e, em alguns casos, perda total dessa estrutura, conforme ilustrado nas Figuras 1E-H.

Figura 1: Eletromicrografias de varredura de promastigotas de *Leishmania infantum* não tratada e tratadas com o extrato aquoso da casca de *Ximenia americana* e Anfotericina B.



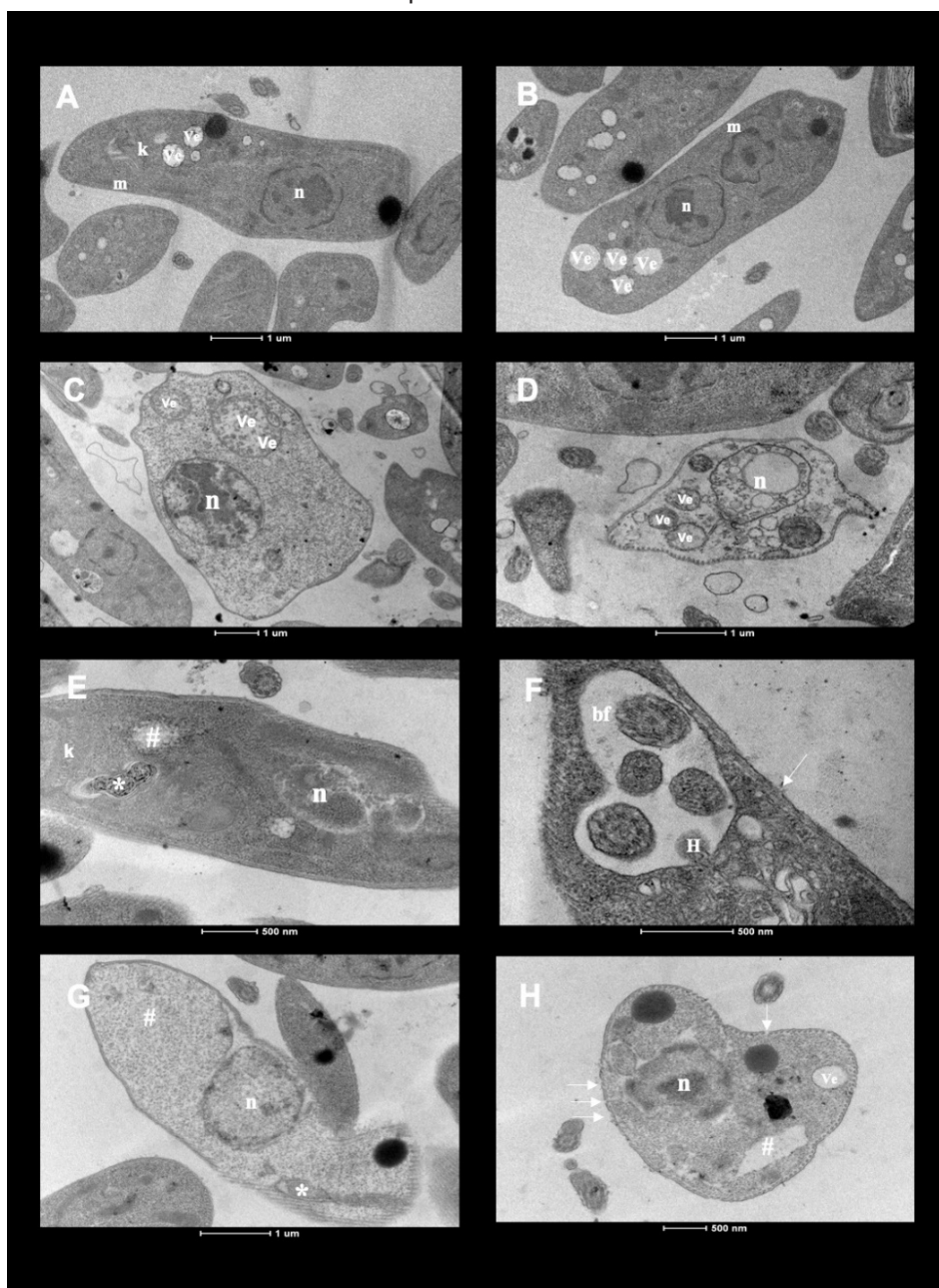
Legenda: (A-B) promastigotas controle (meio Schneider), (C-D) Promastigotas tratadas com a Anfotericina B 1x IC 50 (0.04µg/mL), apresentando perda da integridade celular (*) (D), (E-F) Promastigotas tratadas com 1x IC 50 (222.3µg/mL) do extrato aquoso da casca de *X. americana* exibindo perda de conteúdo celular (*) e encurtamento (E) e perda do flagelo (F) indicados pela seta branca, (G-H) promastigotas tratadas com 2x IC 50 (444.6µg/mL) do extrato aquoso da casca de *X. americana* apresentando perda do flagelo indicado pela seta branca e perda do conteúdo celular (*).

Fonte: Autor, 2020

A microscopia eletrônica de transmissão permitiu uma análise mais detalhada das alterações intracelulares. As promastigotas não tratadas apresentaram núcleo e organelas bem preservados, mantendo a organização estrutural característica da célula (Figuras 2A-B).

Por outro lado, o tratamento com Anfotericina B na concentração correspondente ao IC_{50} resultou em intensa degradação celular, evidenciada por condensação da cromatina, ruptura de membranas, presença de vesículas e extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figuras 2C-D). De forma semelhante, o tratamento com o extrato na concentração de 222.3 $\mu\text{g/mL}$ ($1 \times IC_{50}$) promoveu alterações significativas na estrutura celular, incluindo degradação de componentes como núcleo e mitocôndria, além de ruptura da membrana plasmática e presença de inclusões eletrondensas na bolsa flagelar (Figuras 2E-F). Em concentrações mais elevadas ($2 \times IC_{50}$), observou-se intensificação desses danos, com aumento da degradação citoplasmática e maior comprometimento da integridade da membrana celular (Figuras 2G-H).

Figura 2: Eletromicrografias de promastigotas de *Leishmania infantum* não tratada e tratadas com Anfotericina B e extrato aquoso da casca de *Ximenia americana*



Legenda: (A-B) promastigotas não tratada apresentando as estruturas como núcleo (n), organelas como cinetoplasto (k), mitocôndria (m) e vacúolo (Ve). (C-D) Promastigotas tratadas com a Anfotericina B com o IC_{50} ($0.04\mu\text{g/mL}$), apresentando (*) inchaço mitocondrial. (E-F) Promastigotas tratadas com $1 \times IC_{50}$ ($222.3\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso da casca de *X. americana* indicando degradação do citoplasma da célula (#) (E) e presença inclusões eletrondensas (H) que se acumularam no interior da bolsa flagelar (bf) e ruptura da membrana plasmática (#) (F). (G-H) Promastigotas tratadas com $2 \times IC_{50}$ ($444.6\mu\text{g/mL}$) do extrato aquoso da casca de *X. americana* apresentando aumento da degradação do citoplasma da célula (#) (G) e ruptura da membrana plasmática (seta) (H).

Fonte: Autor, 2020

A necessidade de novas alternativas terapêuticas seguras e eficazes para o tratamento das leishmanioses tem se intensificado após o aparecimento de cepas resistentes aos antimoniais pentavalentes, o que restringiu o seu uso (KHODABANDEH *et al.*, 2019). A utilização de fármacos como anfotericina B que apresentam alta toxicidade e efeitos colaterais, reforça a importância da busca por novas substâncias com potencial terapêutico (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). O reino vegetal tem se destacado como fonte de compostos bioativos, sendo amplamente explorado na busca por novos quimioterápicos (DAR *et al.*, 2023). Nesse contexto, como a *Ximenia americana* apresenta relatos de atividade biológica associada aos seus metabólitos secundários (MAIKAI, 2008), ele apresentasse potencial para uma nova candidata terapêutica para a leishmaniose.

No presente estudo, o extrato aquoso da casca de *X. americana* apresentou atividade leishmanicida frente a promastigotas de *Leishmania infantum*, com IC_{50} de 222.3 $\mu\text{g/mL}$. Esse efeito pode estar relacionado à presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos. Resultados semelhantes foram descritos por Silva *et al.* (2026), enquanto outros estudos indicam que compostos vegetais podem induzir alterações metabólicas no parasita, levando à morte celular (MACHADO *et al.*, 2019), como observado no nosso estudo.

A citotoxicidade em células hepáticas (HepG2) demonstrou CC_{50} de 305.40 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato, enquanto a anfotericina B apresentou CC_{50} de 67.41 $\mu\text{g/mL}$. Apesar da menor citotoxicidade do extrato, a anfotericina B apresentou maior índice de seletividade, evidenciando melhor relação entre atividade leishmanicida e toxicidade celular. Os resultados de seletividade observados poderão ser aprimorados por meio da otimização das estratégias de obtenção de compostos bioativos de origem vegetal. O refinamento dos métodos de extração, purificação e isolamento tende a favorecer a obtenção de metabólitos com maior pureza e potencial biológico, o que pode refletir em melhores índices de seletividade e eficácia em investigações futuras (SILVA *et al.*, 2025).

A análise ultra estrutural revelou que promastigotas não tratadas apresentaram morfologia preservada, enquanto as tratadas com o extrato e com a anfotericina B apresentaram alterações como perda da integridade da membrana, alterações na forma celular e no flagelo. Essas alterações também foram associadas a processos de morte celular em estudos anteriores (MACHADO *et al.*, 2019). Na microscopia eletrônica de transmissão, as células tratadas apresentaram degradação citoplasmática, inchaço mitocondrial e presença de inclusões eletrondensas na bolsa flagelar (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Os achados indicam que o extrato atua sobre promastigotas de *Leishmania infantum*, promovendo alterações estruturais e apresentando menor citotoxicidade em células hepáticas quando comparado à anfotericina B, evidenciando um perfil biológico promissor para futuras investigações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos indicam que o extrato aquoso da casca de *X. americana*, na concentração avaliada, atua sobre formas promastigotas de *L. infantum*, promovendo

alterações estruturais associadas a dano celular. Embora a atividade observada tenha ocorrido em concentrações relativamente elevadas ($IC_{50} = 222,3 \mu\text{g/mL}$), os resultados evidenciam a presença de compostos bioativos com potencial antiparasitário, justificando a realização de estudos complementares voltados ao isolamento, caracterização e otimização desses constituintes, bem como à investigação de seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. L. B. et al. **Bioactive compounds and antioxidant potential of fruit from *Ximenia americana* L. Bark**. Amsterdam, Netherlands: Food Chemistry, v. 192, p. 597–605, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.129.
- AOUN, K.; BOURATBINE, A. **Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review**. Paris, France: Parasite, v. 21, p. 14, 2014. DOI: 10.1051/parasite/2014014.
- DAR, R. A. et al. **Exploring the diverse bioactive compounds from medicinal plants: a review**. Jammu and Kashmir, India: Journal of Phytopharmacology, v. 12, n. 3, p. 189–195, 2023. DOI: não informado.
- GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. **Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?** Auckland, New Zealand: Drug Design, Development and Therapy, v. 12, p. 25–40, 2018. DOI: 10.2147/DDDT.S146521.
- KHODABANDEH, M. et al. **Treatment of resistant visceral leishmaniasis with interferon gamma in combination with liposomal amphotericin B and allopurinol**. Amsterdam, Netherlands: Parasitology International, v. 70, p. 25–29, 2019. DOI: 10.1016/j.parint.2019.101934.
- MACHADO, M. et al. ***Lavandula luisieri* and *Lavandula viridis* Essential Oils as Upcoming Anti-Protozoal Agents: A Key Focus on Leishmaniasis**. Basel, Switzerland: Applied Sciences, v. 9, n. 15, p. 3056, 2019. DOI: 10.3390/app9153056.
- MAIKAI, V. A.; KOBO, P. I.; ADAUDI, A. O. **Acute toxicity studies of aqueous stem bark extract of *Ximenia americana***. Nairobi, Kenya: African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 10, p. 1600–1603, 2008. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/D3472917490>.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- SHMUELI, M.; BEN-SHIMOL, S. **Review of Leishmaniasis Treatment: Can We See the Forest Through the Trees?** Basel, Switzerland: Pharmacy, v. 12, n. 1, p. 30, 2024. DOI: 10.3390/pharmacy12010030.
- SILVA, B. A. F. et al. ***Ximenia americana* L. From Popular Use to Anti-Inflammatory Activities: A Comprehensive Review**. Hoboken, New Jersey, USA: Food Frontiers, v. 7, n. 2, p. e70228, 2026. DOI: 10.1002/fft2.70228.
- SILVA, J. W. L. M. et al. **In Vitro and Ultrastructural Evaluation of the Cytotoxic and Antileishmanial Activities of Thiosemicarbazone Compounds Against Promastigotes**

and Axenic Amastigotes of *Leishmania infantum*. Basel, Switzerland: Tropical Medicine and Infectious Disease, v. 10, n. 11, p. 325, 2025. DOI: 10.3390/tropicalmed10110325.