

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
AGÊNCIA DE INOVAÇÃO, EMPREENDEDORISMO, PESQUISA,
PÓS-GRADUAÇÃO E INTERNACIONALIZAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO
MESTRADO ACADÊMICO

Joana Neres Ferreira Assenço

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand

São Luís- MA

2022

JOANA NERES FERREIRA ASSENÇO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Saúde do
Adulto da Universidade Federal do
Maranhão para obtenção do Grau de Mestre
em Saúde do Adulto.

Orientadora: Dra. Mayara Cristina
Pinto da Silva

São Luís- MA

2022

JOANA NERES FERREIRA ASSENÇO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Saúde do
Adulto da Universidade Federal do
Maranhão para obtenção do Grau de Mestre
em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública,
considerou o candidato qualificado em:

Prof. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva
Universidade Federal do Maranhão

Izabel Cristina Portela Bogéa Serra.
Universidade Ceuma

Prof. Dr. Richard Pereira Dutra
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Dayanne da Silva Freitas (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

Ficha catalográfica

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Neres Ferreira Assenço, Joana.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand / Joana
Neres Ferreira Assenço. - 2022.

70 p.

Orientador(a): Mayara Cristina Pinto da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
UFMA, 2022.

1. Anacardiaceae. 2. Biossegurança. 3. Óleo
essencial. 4. Potencial biológico. I. Pinto da Silva,
Mayara Cristina. II. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, por estar sempre ao meu lado nessa
jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus colegas do Laboratório de Imunofisiologia e Laboratório de Patologia e Imunoparasitologia, principalmente Aline Santana Figueredo, Josivan Régis Farias, Arthur André Castro da Costa, Luís Douglas Miranda Silva, Luana Caroline Santos Pinheiro e Caroline Martins de Jesus.

Aos professores do Laboratório de Química de Produtos Naturais, principalmente a Prof.^a Dra. Cláudia Quintino da Rocha. Em especial a minha orientadora Prof.^a Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva que contribuiu para meu crescimento intelectual e pessoal nessa jornada.

Por fim, agradeço a minha família pelo apoio e incentivo em toda minha jornada acadêmica, principalmente aos meus pais Florentino Assenço Alves Filho e Juciléa Neres Ferreira.

RESUMO

Lithraea brasiliensis Marchand., popularmente conhecida como "aroeira-brava", é uma espécie distribuída na América do Sul sendo encontrada na Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai, pertencente à família Anacardiaceae. Apesar de pertencer a uma família conhecida por conter diversas espécies vegetais com atividades biológicas, existem poucos trabalhos publicados na literatura sobre a composição química e potencial biológico da espécie. Assim, o presente trabalho realizou uma caracterização química e avaliou o potencial biológico, a partir de testes anti-*Leishmania*, antioxidante, potencial citotóxico (*in vitro*) e toxicidade (*in vivo*) do óleo essencial extraído dos frutos de *Lithraea brasiliensis*. Por meio da análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS), foram identificados trinta e dois constituintes químicos, dentre eles β -mirceno, ácido 4-octanoico éster metílico e nerolidol. Na avaliação do potencial antioxidante, o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* (OLB) não apresentou atividade antioxidante em nenhuma das concentrações avaliadas, quando comparado ao padrão quercetina. OLB mostrou atividade anti-*Leishmania*. Na avaliação da atividade anti-promastigota, o OLB apresentou concentração inibitória mínima (IC50) de 80,5 $\mu\text{g/mL}$ para *Leishmania amazonensis* e 93,51 $\mu\text{g/mL}$ para *Leishmania infantum*. O ensaio citotóxico em eritrócitos de carneiro ($\mu\text{g/mL}$) e em células de linhagem RAW, expressou correlação de resultados, em que o tratamento com OLB apresentou-se como dose-dependente, quanto maior a concentração, maior a toxicidade, para células RAW o OLB tinha uma concentração inibitória mínima (IC50) de 962,8 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da toxicidade aguda com larvas de *Tenebrio molitor* (g/Kg), o OLB apresentou toxicidade nas duas maiores doses utilizadas, com a diminuição da dose administrada não houve toxicidade. Assim, concluímos que o óleo essencial dos frutos de *Lithraea brasiliensis* possui potencial biológico, demonstrando atividade anti-protozoária para *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, evidenciando um perfil de biossegurança, a partir de modelos *in vitro* e alternativos de citotoxicidade celular *in vivo* utilizando invertebrados. Esses resultados nos direcionam para futuras investigações em outros alvos biológicos uma vez que existem poucos estudos relacionados a esta espécie.

Palavras-chave: Anacardiaceae. Óleo essencial. Potencial biológico. Biossegurança.

ABSTRACT

Lithraea brasiliensis Marchand., popularly known as "aroeira-brava", is a species distributed in South America being found in Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay, belonging to the Anacardiaceae family. Despite belonging to a family known to contain several plant species with biological activities, there are few works published in the literature on the chemical composition and biological potential of. Thus, the work presented carried out a chemical characterization and evaluated the biological potential, from anti-*Leishmania*, antioxidant, cytotoxic potential (*in vitro*) and toxicity (*in vivo*) of the essential oil extracted from the fruits of *Lithraea brasiliensis*. Through the essential analysis by Mass Spectrometry Coupled Chromatography (GC-MS), thirty-two chemical components were elaborated, among them β -myrcene, 4-octanoic acid methyl ester and nerolidol. In the antioxidant activity, the essential oil of *Lithraea brasiliensis* (OLB) showed antioxidant in none of the potential diseases, when compared to the quercetin standard. OLB showed anti-*Leishmania* activity. In the evaluation of anti-promastigote activity, OLB showed a minimum inhibitory concentration (IC₅₀) of 80.5 $\mu\text{g/mL}$ for *Leishmania amazonensis* and 93.51 $\mu\text{g/mL}$ for *Leishmania infantum*. The cytotoxic assay in sheep erythrocytes ($\mu\text{g/mL}$) and in RAW cells, expressed or derived from results, in which the treatment with OLB was dose-dependent, the higher the concentration, the higher the toxicity, for RAW cells the OLB had a minimum inhibitory concentration (IC₅₀) of 962.8 $\mu\text{g/mL}$. In the acute toxicity with larvae of *Tenebrio molitor* (g/Kg) the OLB presented toxic evaluation in the two highest doses used, with the dose of the dose there was no toxicity. Thus, we conclude that the essential oil of *Lithraea brasiliensis* fruits has biological potential, demonstrating anti-protozoal activity against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*, evidencing a biosafety profile, from *in vitro* and *in vivo* cellular cytotoxicity alternatives using invertebrates. These results direct us to research on other biological targets since there are studies related to this species.

Key words: Anacardiaceae. Essential oil. Biological potential. Biosecurity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Plantas medicinais	13
2.2 Família Anacardiaceae.....	14
2.3 <i>Lithraea brasiliensis</i> Marchand	14
2.4 Leishmanioses.....	16
3 OBJETIVOS	24
3.1 GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS.....	24
4 Capítulo 01	25
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
2.1 Aquisição dos frutos de <i>Lithraea brasiliensis</i>	28
2.2 Caracterização química do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	28
2.3 Atividade anti- <i>Leishmania in vitro</i>	28
2.3.1 Parasitas.....	28
2.3.2 Atividade anti-promastigota.....	29
2.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	29
2.4.1 Método de sequestro do radical livre DPPH.....	29
2.4.2 Método de sequestro do radical livre ABTS.....	30
2.5 Teste de hemólise com eritrócitos de carneiro.....	30
2.6 Ensaio de citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	31
2.7 Ensaio de toxicidade aguda <i>in vivo</i> com larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	32
2.7.1 Aquisição e manutenção das larvas de <i>T. molitor</i>	32

2.7.2 Avaliação da toxicidade aguda em larvas de <i>T. molitor</i>	32
2.8 Análise estatística.....	33
3 RESULTADOS.....	34
3.1 Avaliação da caracterização química do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	34
3.2 Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de <i>L. brasiliensis</i>	37
3.1.2 Avaliação da atividade em promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	37
3.2.2 Avaliação da atividade em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	38
3.3 Avaliação do potencial antioxidante do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	39
3.4 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i>	40
3.4.1 Ensaio de hemólise com hemácias de carneiro.....	40
3.4.2 Ensaio de citotoxicidade em células RAW.....	41
3.5 Avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de <i>Lithraea brasiliensis</i> em larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	42
4 DISCUSSÃO.....	44
5 CONCLUSÃO.....	54
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7 REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Devido a rica biodiversidade da flora brasileira, estudos que fomentem a descoberta de novas propriedades terapêuticas fundamentam a bioprospecção, que consiste em conhecer determinado recurso biológico visando conhecer suas características bioquímicas, bem como o patrimônio genético das espécies e/ou substâncias derivadas (óleos, gomas, látex, etc.) que possam conferir utilização comercial para a indústria química, farmacêutica, cosmética e/ou alimentar (BERLINCK, 2012).

Considerando que desde os primórdios das civilizações, plantas são usadas para fins medicinais, a pesquisa de espécies vegetais de produtos naturais apresenta grande potencial para descoberta de substâncias ou produtos de grande interesse para a sociedade, principalmente para o desenvolvimento de novos medicamentos pelas diversas atividades biológicas que as espécies podem apresentar (ASTOLFI FILHO, SILVA, BIGI, 2014).

O estímulo ao uso desses fitoterápicos tem como objetivo prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças com o custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde quando comparados aqueles obtidos por síntese química que possuem o custo mais elevado por conta as tecnologias envolvidas. A transformação de uma planta em um medicamento deve, obviamente, preservar a integridade química e farmacológica do vegetal garantindo sua ação biológica e sua segurança na utilização, além, de valorizar seu potencial terapêutico. Para garantir isso, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos a aspectos botânicos, fitoquímico, farmacológicos, toxicológicos e outros fatores (MIGUEL, MIGUEL, 1999).

Com o crescente aumento de doenças resistentes aos medicamentos convencionais e também a dificuldade da população ao acesso aos mesmos, há a necessidade de novas drogas terapêuticas como para o tratamento de leishmaniose. A leishmaniose, de modo geral, é caracterizada como uma doença infecto-parasitária, negligenciada e de grande importância para saúde pública (OMS, 2019). Ela ainda é caracterizada por duas formas clínicas onde a leishmaniose visceral (LV) é conhecida popularmente como Calazar e possui como principal característica hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia (VERONESI, 2005); e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) que é caracterizado pelo aparecimento de úlceras ou nódulos por todo o corpo podendo afetar a mucosa, e possui 4 subtipos (VASCONCELOS et al., 2018).

Em relação aos aspectos epidemiológicos segundo o DATASUS, em 2018 o Brasil confirmou 3.466 casos novos de leishmaniose visceral, sendo que a região Nordeste concentra o maior número de casos, com 50,1%, seguida do Norte e Sudeste. Em relação a leishmaniose tegumentar, no mesmo ano foram notificados 16.432 casos em todo o país.

Falando especificamente do estado do Maranhão, ele encontra-se entre os estados da federação com o maior número de casos de LV. Somente até o ano de 2009 foram registradas 9.972 notificações, sendo a maioria proveniente dos municípios que compõe a grande ilha de São Luís (São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar e Raposa) (NASCIMENTO et al., 2005).

Segundo os dados do Sistema Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no ano de 2020 foram notificados 376 casos confirmados de LV no Maranhão, sendo que o predomínio de casos foi em São Luís (169); e para LTA foram registrados 1.158 casos confirmados, sendo que em São Luís foram confirmados 24 novos casos.

O tratamento para leishmaniose é complexo visto que todos os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento da doença mostram-se insatisfatórios em termos de eficácia, custo, facilidade de administração e/ou segurança (HENDRICKX, CALJON, MAES, 2019), e visa a garantia da adesão ao tratamento, alívio dos sintomas e o desconforto causado pela doença e minimização dos efeitos adversos (BRASIL, 2018).

Os principais medicamentos utilizados são os antimoniais pentavalentes pode trazer inconveniente dor local por conta da longa duração do tratamento; a anfotericina B não apresenta boas propriedades físico químicas sendo de difícil solubilização e absorção (FANGUEIRO et al., 2012; BASTOS et al., 2016); e a pentamidina apresenta como um dos efeitos secundários irreversíveis diabetes mellitus insulino dependente (BRAY et al., 2013).

Diante do aumento no número de casos e as dificuldades enfrentadas no tratamento de leishmaniose, há a necessidade de novas alternativas terapêuticas como a *Lithraea brasiliensis* conhecida popularmente como “aroeira”, “aroeira-brava” ou “aroeira-preta”, pertencente a família Anacardiaceae, compreendendo três espécies de plantas que são comuns em partes da América do Sul: *L. caustica*, presente na Argentina e Chile, *L. mielloide*, e *Lithraeae brasiliensis*, presente no Brasil, Uruguai e Argentina (ALÉ et al., 1997; PIERNAAR, TEICHMAN, 1998). As espécies dessa família são caracterizadas por possuírem propriedades irritantes e causarem dermatites de contato, e

suas atividades biológicas envolvem atividade promissora contra microorganismos quando testados os extratos vegetais extraídos das folhas de aroeira (SHIMIZU et al., 2006), antiviral e citotóxicas (RUFFA et al., 2002), acaricida e com baixa toxicidade em modelo *in vivo* usando *Artemia salina* (crustáceo) (LIMA et al., 2021).

Devido aos relatos de propriedades irritantes desta espécie vegetal, poucos são os trabalhos que avaliam o potencial biológico assim como toxicidade em modelos experimentais. Dessa forma a nossa hipótese foi “Será que o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* possui composição química atraente para atividades terapêuticas? Se sim qual atividade pode ser promissora e além da sua eficácia o uso do óleo essencial é seguro?”

Com a perspectiva de bioprospecção de espécies vegetais com potencial biológico, com a disponibilidade de rica biodiversidade brasileira e a necessidade de estudos que assegurem a eficácia e terapêutica de drogas vegetais no tratamento de diversas doenças nos propomos a identificar os constituintes químicos do óleo essencial extraídos dos frutos de *Lithraea brasiliensis* Marchand, e a partir de seus constituintes nos direcionar para avaliação de potenciais terapêuticos.

Com base nessas considerações avaliamos a composição química do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*, assim como a atividade leishmanicida e a toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

O uso de produtos naturais e fitoterápicos tem a finalidade de minimizar possíveis danos à saúde da população. Elas são conhecidas por exercerem um papel relevante na cura e tratamento de diversas doenças, e para algumas pessoas e determinados locais são a única forma de tratamento de determinadas patologias (CONCEIÇÃO et al., 2012; SANTANA et al., 2018).

Todas as plantas possuem um teor tóxico pelo fato de produzirem metabólitos que podem atuar farmacologicamente, mas também toxicologicamente. Desta forma, a intoxicação é um evento clínico que provem da interação entre uma ou mais substâncias químicas e um sistema imunológico. Esses fatores então vão depender da via de administração, quantidade administrada, tempo de exposição e sua interação com outras substâncias (SOARES, 2008). Visando minimizar esses danos, há a necessidade de implementar boas práticas tanto no processo de produção quanto utilização, levando em consideração as condutas de biossegurança, e também estudos mais aprofundados em relação a esses produtos naturais e seus metabólitos (DE MOURA et al., 2020).

As plantas medicinais compreendem vegetais que podem ser usadas *in natura* com fins terapêuticos na fabricação de fármacos semissintéticos ou serem modelos para síntese de moléculas farmacologicamente ativas. Destes se produzidos medicamentos fitoterápicos, possuem finalidade profilática, curativa, com benefício ao usuário, sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de se uso (BRASIL, 2016).

Esses produtos podem ser usados de diversas maneiras como planta medicinal *in natura*, planta medicinal seca como droga vegetal, fitomedicamentos com formulas individuais manipuladas, e medicamentos fitoterápicos (VEIGA, PINTO, MACIEL, 2005).

Em geral, as plantas produzem muitas substâncias químicas que constituem seu fitocomplemento (CAETANO et al., 2015). Neles estão presentes os princípios ativos responsáveis pela ação farmacológica, mas também princípios ativos que podem desencadear toxicidade, muitas vezes dependendo da dose, tempo de uso e interações.

2.2 Família Anacardiaceae

É uma família botânica que pertence ao reino *Plantae*, sendo constituída de aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies (MARTINELLI, MORAES, 2013) com distribuição tropical e subtropical, sendo 25% dos constituintes desta família conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite por contato, sendo as tribos da família conhecidos por esse fato: *Anacardieae*, *Rhoeae* e *Semecarpeae*, a toxicidade foi comprovada nas partes aéreas das plantas sendo as substâncias relatadas por esse efeito o felandreno, carvacrol, pineno e catecois (CORREIA et al., 2006).

Essa espécie em geral apresenta-se como arbóreas, arbustos e algumas lianas, e possuem a característica de serem plantas lenhosas resiníferas com folhas simples ou compostas, apresentam flores pouco vistosas e frutos carnosos ou secos (MARTINELLI, MORAES, 2013).

No Brasil, a família *Anacardiaceae* apresenta 14 gêneros com 54 espécies, sendo que 13 delas apresentam-se exclusivamente no país (SILVA-LUZ, PIRANI, 2013).

Figura 1: Distribuição de espécies da família *Anacardiaceae* no mundo



Fonte: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>

2.3 *Lithraea brasiliensis* Marchand

Lithraea brasiliensis Marchand (Anacardiaceae), nativa da América do Sul é uma árvore de pequeno porte, medindo de 3 a 4 metros de altura. Possui folhas simples, lanceolado-ovadas ou oblongas, espatuladas. As flores são branco-esverdeadas, dispostas em panículas terminais. O fruto é uma drupa globosa branca-esverdeada (Figura 1).

Figura 2: Frutos de *Lithraea brasiliensis*



Fonte: Google imagens

O pequeno gênero *Lithraea* consiste de apenas quatro espécies distribuídas nos continentes australiano e americano. Sabe-se que membros da família Anacardiaceae contêm derivados de fenóis. Esses grupos de compostos são conhecidos por suas propriedades irritantes e são responsáveis pela indução de dermatite de contato por hera venenosa (*Rhus radicans*) ou casca de castanha de caju (*Anacardium occidentale*). Na seiva, considerada tóxica, há um material resinoso contendo alquifenóis, alquicatecóis e alquilresorcinóis. Essas substâncias são conhecidas com “Urushiois”, possuem propriedades antibacterianas, fungicidas, citotóxica, antitumoral, nematicida e acaricida (PIENAAR, TEICHMAN 1998; LIMA et al., 2021).

Com a falta de vacinas e tratamentos não tão evasivos e que causam muitos efeitos colaterais, tem sido feito novas buscas para novas alternativas para o tratamento de leishmaniose onde os extratos e óleos essenciais de plantas tem se destacado por serem capazes de possuir compostos benéficos para o desenvolvimento de novos fármacos (OLIVEIRA, GILBERT, BÔAS, 2013). Por serem compostos lipofílicos possuem a grande vantagem de serem capazes de atravessar a membrana plasmática podendo a célula do parasita sofrer lise mais facilmente (RODRIGUES et al., 2015), sendo ainda possível que os mesmos possuam mais de um alvo na célula interferindo de diferentes maneiras dependendo do tipo celular (DINESH et al., 2017).

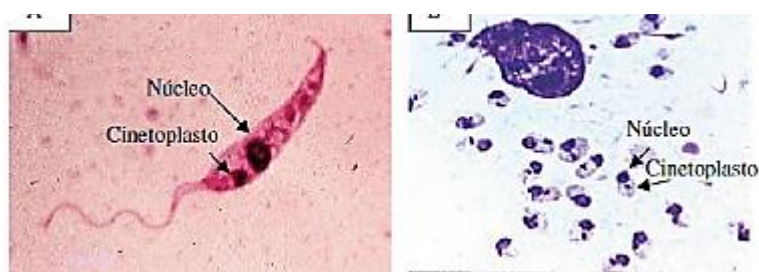
Quando se trata da avaliação da atividade biológica de produtos naturais é necessário entender qual o melhor momento para se colher determinado órgão, pois a concentração dos princípios ativos altera a depender do estágio de desenvolvimento da planta, ferramenta utilizada na colheita e em qual período a colheita foi realizada, ano, mês e período do ano (BRASIL, 2004). O método de extração também é um fator importante pois também influencia na atividade biológica. Segundo Santos e colaboradores (2018), a utilização de diferentes métodos de extração e de diferentes solventes influenciam na concentração de compostos fenólicos extraídos, e que a combinação de métodos pode, na maioria das vezes, trazer benefícios.

2.4 Leishmanioses

As leishmanioses formam um grupo de doenças infecto-parasitárias e negligenciadas de grande importância para saúde pública, sendo uma doença endêmica em mais de 102 países com 12 milhões de casos de infecções e 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (WHO, 2015). Ela é transmitida através da infecção por parasitas do gênero *Leishmania*, e o desenvolvimento da doença bem como suas manifestações clínicas dependem da interação entre as espécies infectantes e a resposta imune do hospedeiro o que irá direcionar essa doença como sendo a forma cutânea, mucocutânea ou visceral (GEORGIADOU et al., 2015).

Durante o ciclo de vida do parasita ele pode se desenvolver em duas formas: promastigotas que possuem flagelo e encontram-se no tubo digestivo do vetor, e na forma amastigota sendo encontrado nos hospedeiros vertebrados (WHO, 2008).

Figura 3: Micrografia das formas morfológicas mais comuns de *Leishmania* spp. (A) Promastigotas; (B) Amastigotas



Fonte: AGUIAR, RODRIGUES, 2017

A transmissão do parasita ocorre durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos fêmea infectadas (PRATES et al., 2012). Após isso, as formas infectantes são fagocitadas por células que envolvem o sistema imune inato (TORRES-GUERRERO et al., 2017) e sofrem diferenciação, dentro do fagolisossomo, formando as formas amastigotas e que de tanto se diferenciarem causam a ruptura da célula, liberando-as (KAYE, SCOTT, 2011), permitindo a reinfecção de outras células fagocítica e propagação do parasita no hospedeiro.

A questão de sucesso em relação ao tratamento e posterior diminuição da carga parasitária ou ainda a eliminação dos parasitas, além de estar relacionado a adesão do paciente aos tratamentos convencionais, depende do tipo de resposta celular manifestada onde a resistência está associada a proliferação e diferenciação de células T CD4+ do tipo Th1 em que macrófagos ativados apresentam uma grande capacidade de destruir os parasitas tendo o processo infeccioso chegado ao fim; e a susceptibilidade que por sua vez é representada por resposta do tipo Th2 (LIEW et al., 1990).

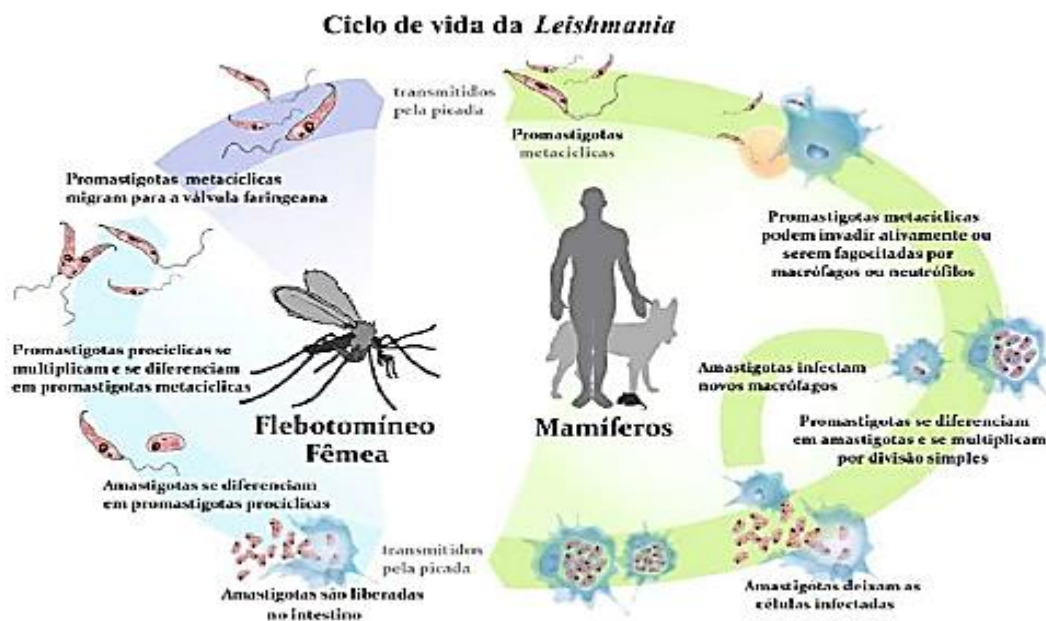


Figura 4: Ciclo de vida de protozoários do gênero *Leishmania*- Inicialmente formas promastigotas procíclicas de *Leishmania*, que residem no intestino de flebotomíneos, passam por processos de diferenciação até alcançarem a forma metacíclicas. Posteriormente, as promastigotas metacíclicas migram até regiões anteriores do trato digestivo do inseto, onde serão inoculadas na pele do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. A presença da *Leishmania* e de diferentes componentes dos flebotomíneos desencadeiam respostas imunes contra o parasita, inicialmente caracterizada pela ação fagocítica de determinados leucócitos, como por exemplo, neurófilos e macrófagos. No interior do fagolisossomo de macrófagos o parasito diferencia-se em sua forma amastigot, dotada de capacidade proliferativa. Após extensiva multiplicação parasitária, a célula hospedeira se rompe liberando amastigotas de *Leishmania* que irão infectar células vizinhas. O ciclo de vida da *Leishmania* se completa quando fêmeas de flebotomíneos adquirem células infectadas diante um novo evento de repasto sanguíneo. (Adaptado de National Institute of Allergy

Fonte: DOS SANTOS, 2019

Durante o estabelecimento do processo inflamatório, há o deslocamento dos leucócitos ao sítio da infecção, sendo desta forma a primeira linha de defesa do organismo durante a infecção por *Leishmania* (NYLÉN, GAUTAM, 2010); e juntamente com as formas infectantes há a transferência de secreções salivares dos flebotomos de natureza imunomoduladora (ROHOUSOVÁ, VOLF, 2006) que influencia na atividade de células fagocíticas e contribuem para o sucesso invasivo do parasita. O ciclo é finalizado quando essas células infectadas são capturadas por outros flebotomíneos fêmea durante o processo de alimentação (KAMHAWI, 2006).

A doença possui duas formas clínicas e suas ramificações. A leishmaniose visceral (LV) que possui um alto nível de mortalidade se não tratada (WHO, 2016) tendo como agente etiológico a *L. donovani* nas regiões do Leste Africano e do subcontinente da Índia, e a *L. infantum* no norte da África, América Latina e Europa (CHAPPUIS et al., 2007). Se tratando dos aspectos clínicos acomete principalmente baço, fígado, linfonodos e medula óssea (BARRAL et al., 1995), além de causar manifestações hematogênicas que envolvem anemia decorrente do aumento da destruição periférica de eritrócitos no baço e sangramento resultando em inflamação resistente. O seu principal fator de virulência é o lipofosfoglicano (LPG); e apresentam diferentes funções dependendo da forma do parasita.

Além disso, é frequente na LV comprometimento pulmonar onde exames mostram aumento do volume, congestão e uma consistência mais elástica do que o normal, septos interalveolares espessados por infiltrado inflamatório constituído de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (DUARTE, BADARÓ, 2009; LAURENTI, 2010).

As anormalidades da função renal encontradas são proteinúria, hematúria e aumento de ureia e creatinina. O exame macroscópico dos rins revela um aumento de volume e congestão (DUARTE, BADARÓ, 2009).

Já a forma tegumentar é caracterizada pelo aparecimento de úlceras ou nódulos em áreas expostas como braços, pernas e face (CHAPPUIS et al., 2007), e possui quatro subtipos: cutânea-localizada, cutânea mucosa, cutânea difusa e cutânea disseminada.

A forma cutânea disseminada é caracterizada por numerosas lesões formadas pela disseminação do parasito pelas vias linfáticas e hematogênicas levando ao aumento da lesão e também risco de infecções bacterianas se o diagnóstico for tardio; é provocada principalmente pela *L. braziliensis*. A leishmaniose cutânea mucosa também é causada pela *L. braziliensis* e é caracterizada pela resposta imune exacerbada com acometimento das mucosas, principalmente nasofaringe onde se encontram as lesões destrutivas. Leishmaniose difusa é causada principalmente pela *L. amazonensis* e está associada a lesões difusas não ulceradas e rica em parasitos. Forma cutânea-localizada é a forma clinica mais frequente no Brasil ocasionada principalmente pelas espécies de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (SILVEIRA et al., 2008).

A Organização Mundial da Saúde destaca que a LV e LC são as formas clínicas mais comum da doença com altas taxas de endemicidade, principalmente em países

localizados na África, Ásia, Oriente Médio e América Latina (WHO, 2017). Em 2018, os casos de leishmaniose foram registrados em 97 países, dos quais 8 países foram endêmicos para LV, 21 endêmicos apenas para LC e 68 países endêmicos para ambas doenças (WHO, 2020).

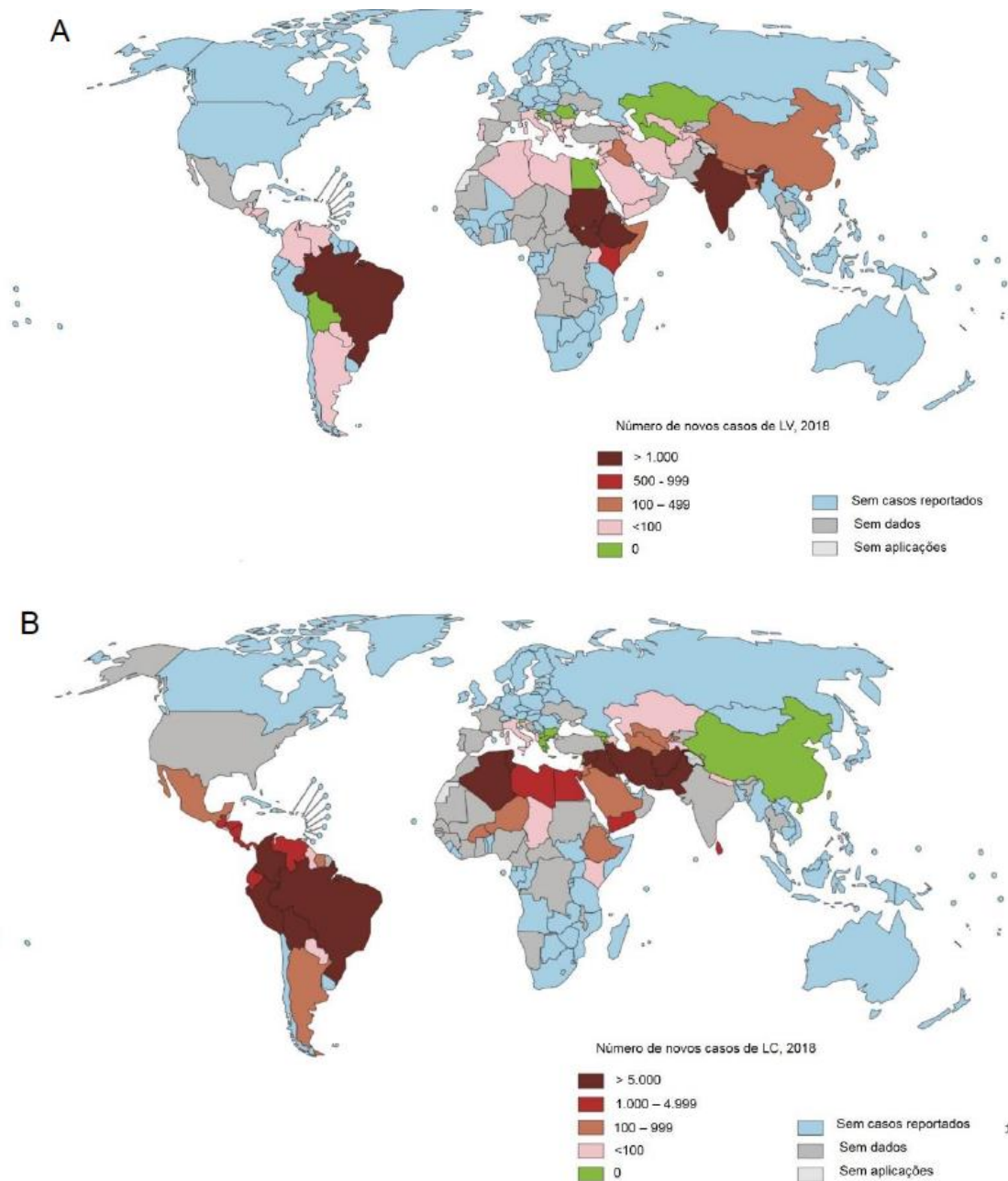


Figura 5: Mapa epidemiológico da distribuição mundial da leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea. (A) O mapa apresenta a distribuição mundial da leishmaniose visceral, representando o número de novos casos reportados em 2018, apresentando o status de endemicidade por país. (B) O mapa apresenta a distribuição mundial da leishmaniose cutânea, o número de novos casos reportados em 2018, bem como a distribuição e o status de endemicidade de cada país. (Figura adaptada da Organização Mundial da Saúde, Leishmaniose, 2020).

Em relação ao número de casos, segundo o Boletim Epidemiológico emitido em 2021, no ano de 2019 foram confirmados 2.529 novos casos de leishmaniose visceral no Brasil sendo a região Nordeste responsável pelo maior registro de casos no país (49,1%), e a taxa de letalidade 9%, a mais elevada dos últimos 10 anos. Em relação a leishmaniose tegumentar, no mesmo ano foram confirmados 15.484 novos casos no Brasil com os maiores percentuais de casos registrados na região Norte (42,8%). Em ambas as formas da doença, os maiores números de casos encontram-se na população jovem e do sexo masculino (36,7%, 65,4%; e 54,9%, 75,2% respectivamente) (BRASIL, 2021).

No Brasil, as drogas disponíveis para o tratamento são os antimoniais pentavalente e anfotericina B, e a escolha entre eles deve levar em consideração faixa etária, presença de gravidez e comorbidades (BRASIL, 2011). Os antimoniais possuem a vantagem de poder ser administrado em nível ambulatorial o que diminui os riscos relacionados a hospitalização; já a anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e de pacientes que tenham contraindicações ou que manifestem toxicidade ou que não possuem resposta positiva ao tratamento com os antimoniais. A anfotericina B é considerada a droga leishmanicida mais potente, disponível comercialmente (MARINS, 2011).

Os tratamentos de primeira escolha para as formas de leishmaniose tegumentar são injeções diárias dos antimoniais pentavalentes, além dos já mencionados, o antimoniato de N-metilgucamina, também conhecido como Glucantime, e o Estibogluconoato de sódio conhecido como Pentostan (TIUMAN et al., 2011).

O Ministério da Saúde recomenda como droga de primeira escolha os antimoniais pentavalentes e em situações especiais anfotericina B lipossomal, formulação da anfotericina B, como droga de primeira escolha (BRASIL, 2011).

Em uma revisão de literatura integrativa realizada por Comandolli-Wyrepkowski e colaboradores (2020) em relação a quais aspectos farmacológicos das terapias atualmente utilizadas para a leishmaniose cutânea, com base na literatura consultada o tratamento baseia-se principalmente nos fármacos derivados dos antimoniais pentavalentes, como preconizado pela OMS, e o segundo tratamento mais citado é baseado em formulações contendo anfotericina B.

Apesar do amplo conhecimento em relação aos vários tipos de tratamentos, eles apresentam sérios problemas que incluem resistência do parasita e indução de efeitos

colaterais que limitam a utilização e conseqüentemente sua eficácia. Além desses problemas todos os fármacos possuem administração parenteral o que exige colaboração do paciente o que fazem muitos deles abandonarem o tratamento favorecendo o aparecimento de cepas resistentes (SILVA-LOPEZ, 2010).

Diante das dificuldades enfrentadas frente aos diversos tratamentos convencionais, há a necessidade do desenvolvimento de formulações mais eficazes e mais seguras (SINGH et al., 2012), porém isso envolve problemática em relação as diferentes manifestações clínicas exigindo diferentes mecanismos farmacocinéticos das drogas utilizadas (BERMAN et al., 2005).

O outro fator crucial para uma resposta eficiente frente ao tratamento da leishmaniose, além do uso de medicamentos convencionais, o que irá ditar o quão grave a doença se desenvolve nos hospedeiros é o tipo de resposta celular. Ou seja, as manifestações clínicas serão influenciadas diretamente pelo tipo de resposta celular. Como já mencionado, uma das primeiras células recrutadas ao local da picada pelos flebotômíneos são os macrófagos o que por sua vez são responsáveis pela produção de citocinas como IFN- γ e IL-12, que são fundamentais para ativação de macrófagos (MOSSER, EDWARDS, 2008) e também para o processo inflamatório (MAKHATADZE, 1998). Ainda em relação a resposta do sistema imune frente a infecção e as posteriores manifestações clínicas apresentadas que podem levar a óbito, a polarização da resposta Th1 e Th2 direcionando uma resistência ou não da doença, depende justamente da geração dessas citocinas e a espécie de *Leishmania* infectante (WHO, 2010).

Diante do já exposto, a ausência de vacinas e dificuldades em relação aos tratamentos convencionais, fortalece a necessidade de drogas mais efetivas ou descoberta de produtos naturais para substituir os mesmos ou suplementá-los de forma tratar a doença e seus respectivos sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (ROCHA et al., 2005). Em um trabalho realizado por Gil e colaboradores (2008) relacionado a 101 plantas e suas características, também relaciona 288 compostos isolados de plantas superiores com relação a sua ação frente a parasitas do gênero *Leishmania* ssp. Dos compostos isolados houve um predomínio de alcalóides, sesquiterpenos, quinóides, flavonóides e outras classes de compostos (ROCHA et al., 2005). Ainda relacionado a esse estudo,

quando isolado de alguns produtos naturais, esses compostos apresentaram sucesso em diminuir a carga parasitaria e também atividade inibitória frente a esses parasitas.

Os fatores que contribuem para o crescimento da doença são o aparecimento de espécies de parasitas resistentes ao fármaco utilizado no tratamento, a resistência dos vetores a produtos domésticos, aquecimento global, crescimento populacional em países endêmicos subdesenvolvidos e em desenvolvimento e o deslocamento de pessoas para essas regiões (REGUERA et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar a caracterização química e avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial dos frutos de *Lithraea brasiliensis* Marchand.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a caracterização química do OLB;
- ✓ Avaliar potencial leishmanicida *in vitro*;
- ✓ Analisar atividade antioxidante;
- ✓ Avaliar toxicidade *in vitro e in vivo* do óleo essencial;

4 Capítulo 01

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lithraea brasiliensis* Marchand

Joana Neres de Ferreira Assenço

Mayara Cristina Pinto da Silva

Resumo

Lithraea brasiliensis Marchand., popularmente conhecida como "aroeira-brava", é uma espécie distribuída na América do Sul sendo encontrada na Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai, pertencente à família Anacardiaceae. Apesar de pertencer a uma família conhecida por possuírem atividades biológicas comprovadas, poucos são os trabalhos publicados sobre a composição química e potencial biológico da espécie. Assim, o presente trabalho realizou uma caracterização química e avaliou o potencial biológico, a partir de testes anti-*Leishmania*, antioxidante essencial, citotóxico (*in vitro*) e toxicidade (*in vivo*) do óleo extraído dos frutos de *Lithraea brasiliensis*. Por meio da análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS), foram identificados trinta e dois constituintes químicos, dentre eles β -mirceno, éster metílico do ácido 4-octanoico e nerolidol. Na avaliação do potencial antioxidante, o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* (OLB) não apresentou atividade antioxidante em nenhuma das concentrações avaliadas, quando comparado à quercetina padrão. OLB mostrou atividade anti-*Leishmania*. Na avaliação da atividade anti-promastigota, o OLB apresentou IC₅₀ de 80,5 $\mu\text{g/mL}$ para *Leishmania amazonensis* e 93,51 $\mu\text{g/mL}$ para *Leishmania infantum*. O ensaio citotóxico em eritrócitos de ovelhas ($\mu\text{g/mL}$) e em células RAW, expressou correlação de resultados, em que o tratamento com OLB não apresentou toxicidade relevante, sendo dose dependente, quanto maior a concentração, maior a toxicidade, para células RAW o OLB tinha um IC₅₀ de 962,8 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da toxicidade aguda com larvas de *Tenebrio molitor* (g/Kg), o OLB apresentou toxicidade nas duas maiores doses utilizadas, com a diminuição da dose administrada não houve toxicidade. Assim, concluímos que o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* possui potencial biológico, demonstrando atividade anti-protozoária, evidenciando um perfil de biossegurança, a partir de modelos *in vitro* e alternativos de citotoxicidade celular *in vivo* utilizando invertebrados. Esses resultados nos direcionam para futuras investigações em outros alvos biológicos uma vez que existem poucos estudos relacionados a esta espécie.

Palavras-chave: Anacardiaceae. Óleo essencial. Potencial biológico. Biossegurança.

1 Introdução

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania* que possuem duas formas principais, amastigotas e promastigotas. Sua forma de transmissão é caracterizada por meio da picada de flebotomíneos fêmea, tendo evidências clínicas, epidemiológicas e experimentais que apoiam a teoria de que a leishmaniose possa ser prevenida por vacinação (BRASIL, 2017).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, com baixa mortalidade, não contagiosa, tendo como as principais espécies transmissoras no Brasil a *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* (VASCONCELOS et al., 2018). Ela pode apresentar diversas formas clínicas, como: 1) Cutânea (LC) que apresenta uma pápula eritematosa que evolui para ulcera geralmente indolor, que aparece no local da picada do vetor; 2) Disseminada (LCD) onde o indivíduo apresenta múltiplas lesões papulares que acometem várias partes do corpo principalmente face e tronco; 3) Mucosa (LM) que é uma lesão secundária que atinge principalmente a orofaringe e comprometimento da área mucosa; 4) Clínica difusa (LCD) que inicia de maneira insidiosa, com lesão única e com má resposta ao tratamento, evoluindo de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas (LIMA, 2017).

A LTA constitui um problema de saúde pública em 85 países, sendo considerada uma doença ocupacional devido a ocorrência de deformidades e envolvimento psicológico com reflexos social e econômico. Nos últimos vinte anos, ela apresentou grande crescimento tanto o número de casos como em distribuição geográfica em todas as regiões do Brasil apresentando surtos endêmicos na maioria das vezes relacionados ao processo predatório de ocupação de matas (VASCONCELOS et al., 2018).

A notificação e confirmação dos casos de leishmaniose são obrigatórias no Brasil pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), e a partir dele verificou-se que no período de 2007 e 2014 registrou-se no Brasil um total de 996 óbitos de pacientes com LTA (CONITEC; GUIA DE ORIENTAÇÃO, 2016).

Deste esse último boletim do SINAN, ao último divulgado referente ao ano de 2019, houve um aumento no número de casos, 15.484, sendo predominante em indivíduos do sexo masculino e jovens (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2021).

Em relação a leishmaniose visceral (LV), é conhecida popularmente como calazar que significa febre negra, também apresentando ampla distribuição mundial sendo caracterizada primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose. O seu quadro clinico é caracterizado por uma febre irregular de longa duração, emagrecimento e palidez cutaneomucosa, que confere um aspecto escuro à indivíduos caucasianos. Os pacientes apresentam ainda hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Os principais fatores de risco para o óbito por LV envolvem complicações infecciosas e hemorragias, que pode ser evitado com a identificação precoce dos pacientes (DUARTE, BADARÓ, 2009; BRASIL, 2006).

Os parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral são *Leishmania (L.) chagasi*, *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* (ALMEIDA et al., 2005).

Em 2019 foram confirmados 2.529 casos novos de LV no Brasil sendo a região Nordeste a responsável pelo maior registro de casos no país (49,1%). A taxa de letalidade nesse ano foi de 9% sendo a mais elevada dos últimos 10 anos acometendo principalmente adultos acima de 50 anos de idade (19,2%). No ano de 2020, foram adquiridas 1.009.036 coleiras para cães disponibilizadas aos municípios prioritários de acordo com a estratificação de risco da LV (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

2 Materiais e métodos

2.1 Aquisição dos frutos de *Lithraea brasiliensis*

Os frutos foram coletados no município de João Pinheiro- MG/Brasil (17° 44' 39" S 46° 10' 16" O). A planta foi taxonomicamente identificada e um voucher depositado no Herbário da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), sob o número 5867.

O acesso e a coleta de recurso genético no Brasil foram autorizados pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen n° A0FCC6A). Para extração do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* foi usado 100g de fruto triturado, imerso em 600ml de água. Posteriormente, esse material foi submetido ao processo de hidrodestilação por aparelho tipo Clevenger por 2h e 30 min.

O óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro e o rendimento foi calculado em percentual m/v (FARMACOPEIA, 2010), com rendimento do óleo de 4%.

2.2 Caracterização química do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*

A amostra foi analisada em um Cromatografo a Gás (CG-2010) acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM QP2010 Plus), ambos da Shimadzu, utilizando uma coluna capilar DB-5M (30m x 0,25mm x 0,25µm), o fluxo do gás de arraste, Hélio em uma velocidade linear de 47,5 cm/sec e fluxo da coluna 1,0 mL/min. A programação do forno foi de 35 °C por 6 min com rampa de aquecimento de 10°C/min até 240°C e permanecendo por 10 min, até o final da corrida. A temperatura do injetor e da fonte de íons de 250°C e 200°C, respectivamente, e o modo de injeção Split com razão de 1/30, Tempo de Corrida 36 minutos. A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação através da Biblioteca do Equipamento NIST08 (*National Institute of Standards and Technology*).

2.3 Atividade anti-*Leishmania in vitro*

2.3.1 Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum* foram cultivadas em garrafas de cultura estéreis, contendo meio Schneider (SIGMA) suplementado com Soro Fetal Bovino (GIBCO) 10% e acondicionadas em câmara de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) à 27°C.

2.3.2 Atividade anti-promastigota

Para a avaliação da atividade leishmanicida, as promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* e *Leishmania infantum* foram contadas e ajustadas para 1×10^6 parasitos/ml e distribuídas em microplacas de 96 poços. Dessa forma as amostras foram adicionadas à placa de testes, com triplicata, nas diversas diluições da formulação, 1000-15,625 $\mu\text{g/mL}$ e 1000-62,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Em seguida, as placas foram incubadas a 24°C durante 48 horas; como controle negativo foram aqueles sem tratamento e com solvente de 0,5% a nível tolerado pelo parasita, e para o positivo, 5 μL de Pentamidina. Ao final as amostras foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópico óptico, de campo claro e aumento de 400X para avaliação do número de parasitas.

O cálculo do IC50 foi feito por análise de regressão logarítmica, no *Graph Pad Prism 8.0*.

2.4 Avaliação da atividade antioxidante

2.4.1 Método de sequestro do radical livre DPPH*

O método do sequestro do radical livre DPPH* (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi realizado de acordo com a metodologia de Sánchez-Moreno; Larrauri; Saura-Calixto, 1999, com alterações. Uma solução metanólica de DPPH (40 $\mu\text{g/mL}$) foi preparada em frasco âmbar no momento da análise. Logo após, em uma microplaca de 96 poços, foram misturadas alíquotas de 190 μL da solução de DPPH à 10 μL do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* e também ao padrão de quercetina, nas concentrações de 100-3,125 $\mu\text{g/mL}$ (OLB) e 10-0,312 $\mu\text{g/mL}$ (quercetina). As leituras foram realizadas em 517 nm, utilizando metanol como branco. O tempo de reação adotado foi de 30 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left| \frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right| \times 100$$

A = absorvância

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias com experimentos realizados em triplicata.

2.4.2 Método de sequestro do radical livre *ABTS*^{•+}

A avaliação do potencial antioxidante utilizando o reagente ABTS foi feita segundo Re e colaboradores (1999), com modificações. O reagente foi dissolvido em água até a concentração 7 mMol·L⁻¹. Esta foi então misturada a uma solução de persulfato de potássio (concentração final 2,45 mMol·L⁻¹). A mistura foi mantida em frasco âmbar e ambiente escuro por 16 horas antes do ensaio para a completa oxidação do ABTS e geração do cromóforo *ABTS*^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), um cátion radicalar de alta estabilidade. A solução de *ABTS*^{•+} foi diluída em metanol absoluto até a absorvância atingir o valor de 0,7 ± 0,02 nm. As leituras foram realizadas em microplaca no comprimento de 734 nm, utilizando volumes fixos de 10 µL do óleo essencial *Lithraea brasiliensis* e também do padrão de quercetina, nas concentrações de 100-3,125 µg/mL (OLB) e 10-0,312 µg/mL (quercetina), e 190 µL de solução radicalar. A amostra foi solubilizada e diluída com metanol. O tempo de reação adotado foi de 30 minutos. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right] \times 100$$

A = absorvância

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias com experimentos realizados em triplicata.

2.5 Teste de hemólise com eritrócitos de carneiro

A atividade hemolítica foi realizada seguindo a metodologia de Almaaytah e colaboradores (2014). Foram coletados 10mL de sangue de carneiro em um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), disponibilizado pelo biotério da Universidade Federal do Maranhão, o mesmo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa de Uso de Animais (CEUA), tendo recebido o seguinte parecer: PROCESSO n.23115.005441/2017-62. O sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, a 20°C. O plasma foi removido e os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão fosfato salina (PBS).

Para o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*, foi preparado diferentes concentrações (50-0,39 mg/mL) que foram incubadas por 1 hora a 37°C em uma placa de 96 poços, com suspensão de eritrócitos e OLB.

Os controles positivo e negativo receberam 100 µL de Triton x-100 a 1% e PBS, respectivamente.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 20°C. Foi retirado o sobrenadante (100 ou 150 µL), transferido para uma microplaca e suas absorbâncias medidas a 450 nm.

A atividade hemolítica foi expressa em relação a ação do Triton x-100 e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Hemólise \%} = \frac{\text{Abs450/OLB} - \text{Abs450/PBS}}{\text{Abs450/Triton} - \text{Abs450/PBS}} \times 100$$

Onde: Abs450/OLB corresponde a amostra tratada com o óleo essencial de *L. brasiliensis*; Abs450/PBS é a amostra tratada com PBS; e Abs450/Triton é a amostra tratada com Triton x-100.

2.6 Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro*

Após 24 horas de incubação, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, 5x10⁴ células J774 ou RAW foram incubadas com diferentes concentrações do óleo essencial (5000-31,12 µg/mL). Como controle foram mantidos poços com células sem tratamento. Após o intervalo de 48 horas foi realizado o ensaio baseado em MTT. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem, sendo determinada a concentração citotóxica de 50% das células (CC50).

2.7 Ensaio de toxicidade aguda *in vivo* com *Tenebrio molitor*

2.7.1 Aquisição e manutenção das larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* entre 10° e 12° estágio larval, foram adquiridas comercialmente através de fornecedores especializados e posteriormente mantidas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, sendo acondicionadas em recipientes plásticos cobertos com tela ao abrigo da luz, contendo ração padronizada a base de farelo de trigo, milho e aveia, com temperatura controlada ($27\pm 30^{\circ}\text{C}$) e a umidade será mantida pela presença de um recipiente com água. As larvas que apresentarem alterações em sua cor ou motilidade serão descartadas e somente serão utilizadas nos ensaios aquelas com aspecto saudável (DE SOUZA et al., 2015; NAVARRO et al., 2019).

2.7.2 Avaliação da toxicidade aguda em larvas de *T. molitor*

O teste de toxicidade aguda foi realizado como descrito por Wang e colaboradores (2015) e Alves e colaboradores (2019), com adaptações. Serão utilizadas dez larvas de *T. molitor* por grupo, considerando o peso entre 0,1 e 0,2 g, e tamanhos similares. A formação dos grupos será de acordo com a concentração do óleo essencial, variando entre as doses de 10-0,16 g/Kg. Além disso, serão também incluídos os seguintes grupos: SHAM – controle que não receberá nenhuma substância, CTRL trauma – controle que receberá apenas o trauma da injeção sem aplicação de substância e CTRL DMSO 1% - grupo que recebeu o solvente diluente do extrato e frações.

Para o procedimento das injeções agudas das substâncias teste, as larvas inicialmente foram submetidas à paralização por esfriamento em superfície de vidro com gelo, e após foram submetidas à desinfecção na porção ventral com álcool 70%, e com o auxílio de uma seringa analítica (Hamilton, Modified Microliter™) foram injetados 10µL dos diferentes tratamentos pela via intrahemocélica no quarto metâmero, na porção ventral das larvas.

Após o procedimento as larvas foram transferidas para placas de Petri destinadas aos respectivos grupos, contendo ração padronizada e incubadas ao abrigo da luz, em câmaras com temperatura e umidade favorável. A sobrevivência foi monitorada diariamente, durante 7 dias e a morte das larvas foi avaliada através da resposta ao toque, sendo observado à falta de motilidade e a presença de melanização.

2.8 Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade. Em seguida foi realizado análise de variância (ANOVA), com pós teste de Bonferroni, para variáveis paramétricas ou teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns, para variáveis não paramétricas.

Em todas as análises foi considerado como significante $p < 0,05$. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.

3 Resultados

3.1 Avaliação da caracterização química do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*

Após a análise do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* em Cromatografia em fase Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-MS), foi constatado que ele apresenta uma variedade de substâncias e conseqüentemente uma considerável quantidade de picos (Figura 5) sendo identificados 32 compostos entre eles β -mirceno, nerolidol, e ácido 4-octanóico éster metílico, que se encontra de forma detalhada na Tabela 1.

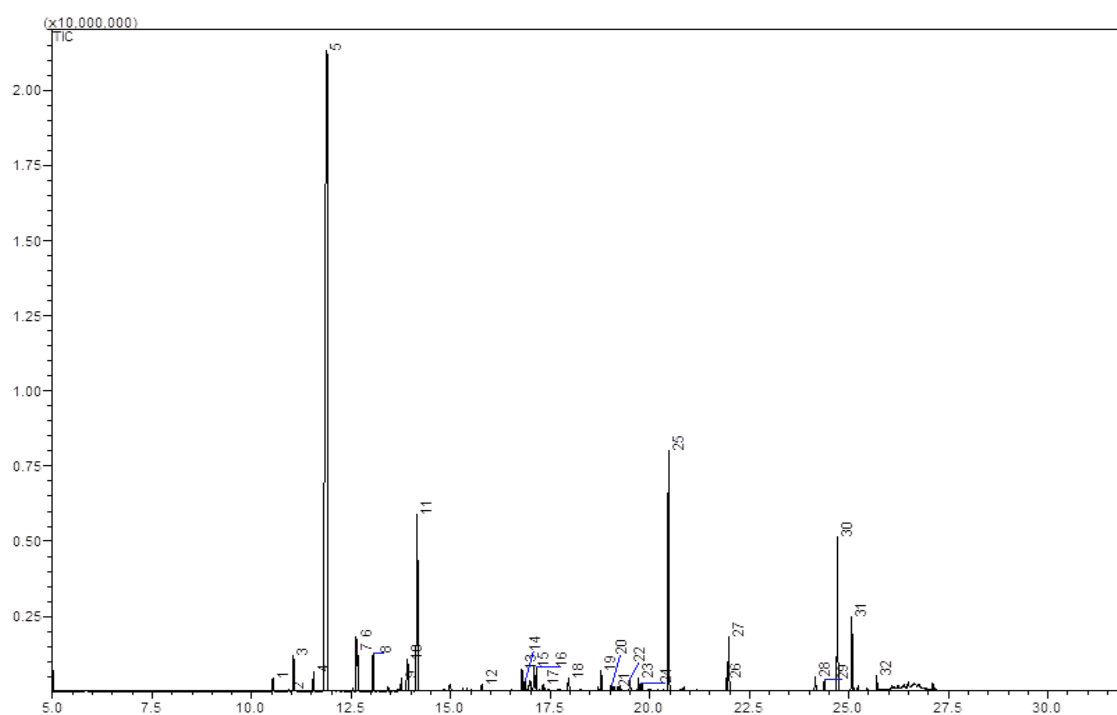


Figura 6: Cromatograma do óleo essencial de *L. brasiliensis*

Tabela 1: Composição química do óleo essencial obtido dos frutos de *Lithraea brasiliensis*

	Picos	Compostos	*RT (min)	**Área	***Área %
Monoterpenos	1	<i>α-Pineno</i>	10,530	656814	0,43
	2	<i>Canfeno</i>	10,919	67919	0,04
	4	<i>β-pineno</i>	11,552	993037	0,66
	5	<i>β-mirceno</i>	11,890	88180220	58,30
	7	<i>β-felandreno</i>	12,658	1792363	1,18
	10	<i>Linalol</i>	13,912	1993433	1,32
	29	<i>4,8-Dimetil-3,7-nonadien-2-ol</i>	24,350	253522	0,17
	32	<i>2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-[2-Metil-2-(4-metil-3-pentenil)ciclopropil]metanol</i>	25,717	563651	0,37
Sesquiterpenos	13	<i>β-farneseno (isômero 1)</i>	16,786	1012638	0,67
	19	<i>β-farneseno (isômero 2)</i>	18,776	1495930	0,99
	21	<i>β-farneseno (isômero 3)</i>	19,105	203631	0,13
	30	<i>β-farneseno (isômero 4)</i>	24,605	203631	0,13
	22	<i>Farnesol</i>	19,502	540630	0,36
	25	<i>Nerolidol</i>	20,470	13557178	8,96
	28	<i>β-bisaboleno</i>	24,155	707059	0,47
	31	<i>Farnesol (isômero)</i>	25,102	540630	0,36

Ésteres	17	<i>Geranato de metila</i>	17,325	308398	0,20
	24	<i>ácido -7,10,13,16-docosatetraenóico, éster metílico</i>	19,793	399799	0,26
	26	<i>Metil 6,9-octadecadienoato</i>	21,930	616039	0,41
Ácidos graxos	11	<i>Ácido 4-octanóico</i>	14,155	10335565	6,83
	15	<i>Ácido 4-decenóico</i>	17,091	1171179	0,77
	27	<i>Ácido linoleico</i>	21,979	2659478	1,76
Hidrocarbonetos	8	<i>2-octeno, 2-metil-6-metileno-2-etil-6-metil-1,5-heptadieno</i>	13,050	1791098	1,18
	9	<i>Hept-4-eno</i>	13,758	603224	0,40
	14	<i>1-isopropil-2-metilciclohexano</i>	16,860	461681	0,31
	16	<i>Ciclohexano</i>	17,147	1177353	0,78
	18	<i>Perileno</i>	17,957	902267	0,60
Ácidos carboxílicos	12	<i>Ácido 2,6-dimetil-2-vinil-5-heptenoico</i>	15,774	266195	0,18
Álcool metílico	23	<i>2-metil-2-(4-metil-3-pentenil)-[2-Metil-2-(4-metil-3-pentenil)ciclopropil]metanol</i>	19,717	563651	0,37

* RT(min) =Tempo de retenção (minutos), **Área = , *** % = porcentagem do componente

3.2 Avaliação da atividade leishmanicida do OLB

3.2.1 Avaliação da atividade em promastigotas de *L. amazonensis*

O efeito leishmanicida, *in vitro*, foi avaliado em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Como pode ser observado na Figura 6, houve um efeito concentração-dependente do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*, de forma que nas concentrações de 1000,500,250, 125 e 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve inibição do crescimento do parasito em torno de 100%;100%;78,5%;65,8% e 63% respectivamente.

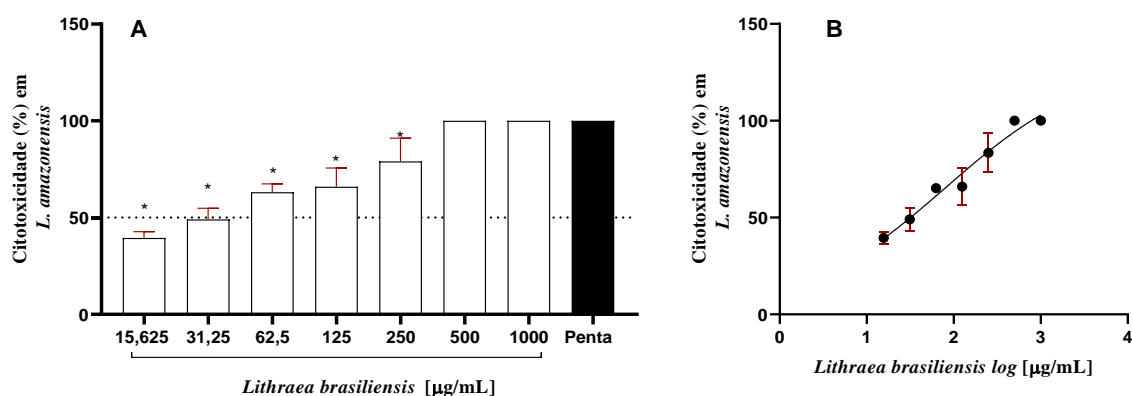


Figura 7: Efeito do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* na inibição do crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Foi avaliada a citotoxicidade de várias concentrações do OLB (A). Também foi analisada a curva dose-resposta (B) do óleo que inibiu 50% da proliferação celular em $\mu\text{g}/\text{mL}$ (intervalo de confiança 95%). Os ensaios foram realizados no tempo de 48 h. Os resultados correspondem a (média \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, quando comparado a Pentamidina® (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test.

O tratamento com o OLB apresentou IC₅₀ de 80,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Pentamidina®, fármaco de referência, exibiu valor de IC₅₀ de 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *L. amazonensis* (Tabela 2)

3.2.2 Avaliação da atividade em promastigotas de *L. infantum*

O efeito leishmanicida, *in vitro*, foi avaliado em formas promastigotas de *L. infantum*. Como pode ser observado na Figura 7, houve um efeito concentração-dependente do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*, de forma que nas concentrações de 1000,500,250 e 125 µg/ml houve inibição do crescimento do parasito em torno de 96%; 94,4%; 88,34% e 64,86% respectivamente.

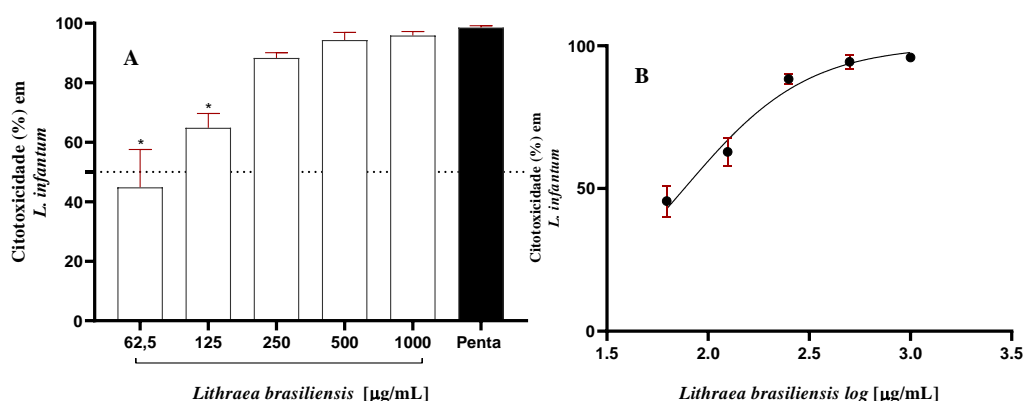


Figura 7: Efeito do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* na inibição do crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*. Foi avaliada a citotoxicidade de várias concentrações do OLB (A). Também foi analisada a curva dose-resposta (B) do óleo que inibiu 50% da proliferação celular em µg/mL (intervalo de confiança 95%), os ensaios foram realizados no tempo de 48 h. Os resultados correspondem a (média ± SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) p<0,05, quando comparado a Pentamidina® (5µg/mL). ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test.

O tratamento com o OLB apresentou IC50 de 76,42 µg/mL e Pentamidina®, fármaco de referência, exibiu valor de IC50 de 0,9 µg/mL para *L. infantum* (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* sobre as formas promastigotas de *Leishmania sp.*

Tratamento	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	Células RAW
	IC50*	IC50*	CC50*
<i>Lithraea brasiliensis</i>	80,50	76,42	962,8
Pentamidina®	0,7	0,9	15,24

*Concentração inibitória de 50% em µg/mL

3.3 Avaliação do potencial antioxidante do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*

Foi avaliado o potencial antioxidante do OLB fazendo uso dos métodos DPPH e ABTS, o óleo essencial não apresentou atividade antioxidante em nenhum dos métodos utilizados assim como das concentrações testadas (Figura 8). Neste ensaio utilizamos a quercetina, substância referência com atividade antioxidante como controle positivo.

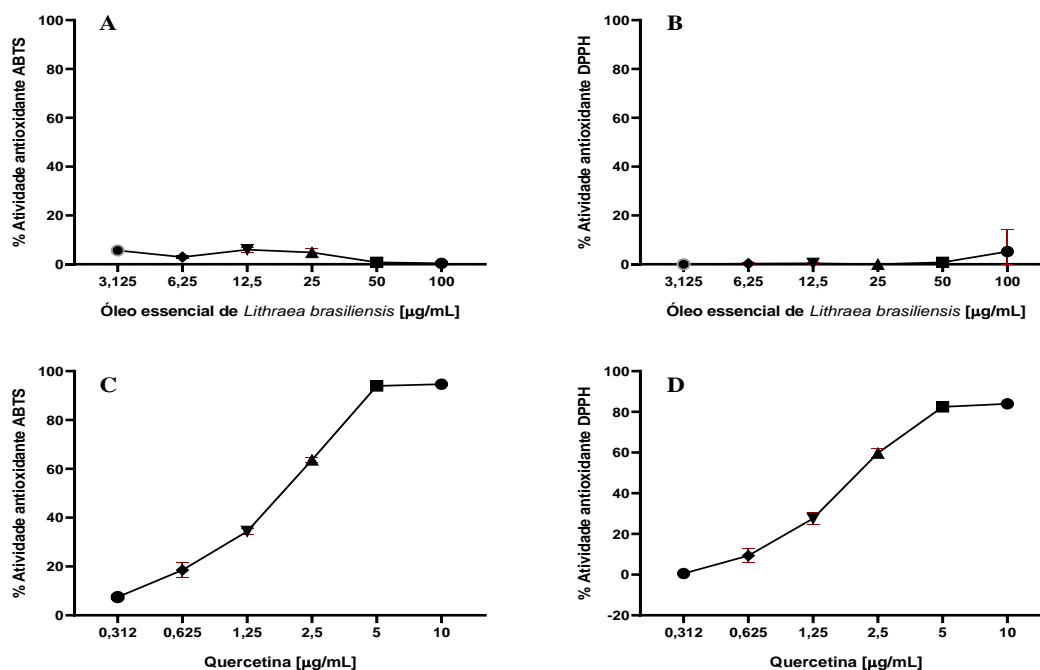


Figura 8: Atividade antioxidante do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* pelos métodos DPPH e ABTS. Foi avaliada a atividade antioxidante de várias concentrações do OLB (A e B). Também foi analisada a atividade da quercetina controle positivo (C e D), os resultados correspondem a (média \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata.

3.4 Avaliação da toxicidade *in vitro* do OLB

3.4.1 Ensaio de hemólise com hemácias de carneiro

Foi avaliado o efeito tóxico do OLB em eritrócitos de carneiro, por meio do ensaio *in vitro* da atividade hemolítica. Não houve citotoxicidade do OLB em nenhuma das concentrações testadas (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,16; 0,78; 0,39 mg/mL), quando comparado ao controle positivo (Figura 9).

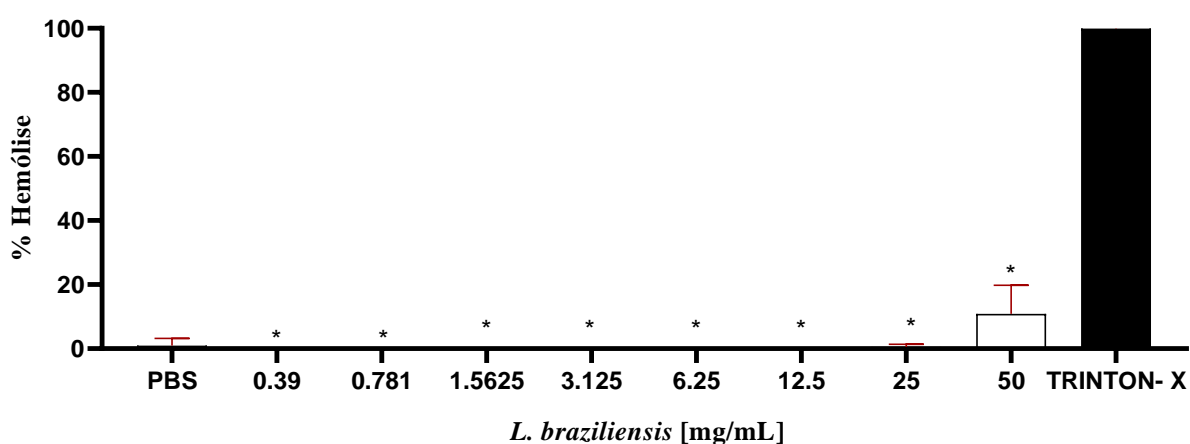


Figura 9: Percentual de hemólise do óleo essencial de *L. brasiliensis* em eritrócitos de carneiro. O percentual de hemólise foi avaliado em várias concentrações de OLB em eritrócitos de carneiro. Os resultados correspondem a (médias ± SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação ao controle positivo (Triton x-100 a 1%).

3.4.2 Ensaio de citotoxicidade em células RAW

Foi avaliado o efeito citotóxico do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* em células de linhagem RAW, através do ensaio *in vitro*. Houve citotoxicidade nas maiores concentrações do OLB (5000, 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$), quando comparada com o controle positivo (Pentamidina®) (Figura 10). Já nas menores concentrações não foi observado citotoxicidade (250, 125, 62,5 e 31,12 $\mu\text{g/mL}$).

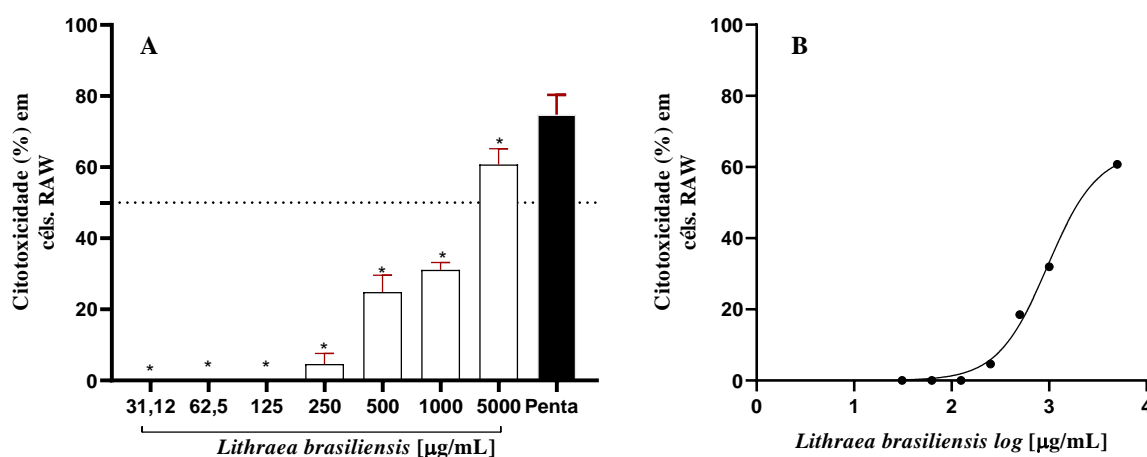


Figura 10: Percentual de citotoxicidade e curva dose- resposta do OLB em células RAW. A citotoxicidade foi avaliada em várias concentrações de OLB em células de linhagem RAW. Também foi analisada a curva dose-resposta (B) do óleo, no qual reduz 50% da viabilidade dos macrófagos em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança 95%). Os resultados correspondem a (médias \pm SD) de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, em comparação o controle positivo (Pentamidina ® 100 $\mu\text{g/mL}$).

3.5 Avaliação da toxicidade aguda do OLB em larvas de *T. molitor*

A avaliação da toxicidade aguda através de injeções diretas em larvas de *T. molitor* do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* apresentou resultados significantes diante do teste estatístico recomendado Log-rank (Mantel-Cox) revelando valores de $p < 0.0001$ (Figura 11). Não foi evidenciado mortes presentes nos grupos controles, assim como, para os tratamentos nas concentrações de 0.15 a 2,5 g/Kg atingindo sobrevida de 100% até a última hora (168h) de avaliação do teste. No entanto a letalidade foi observada nas concentrações de 5 e 10 g/Kg, sendo para OLB 10 g/Kg mortes presentes com 24h (75% sobrevivência), 48h (50% sobrevivência) e 72h (24,3 % sobrevivência). Para a concentração de 5 g/Kg o óleo essencial mostrou-se tóxico revelando mortes em 24h (85.5% sobrevivência), 48h (70% sobrevivência) e 72 h (57,5% sobrevivência).

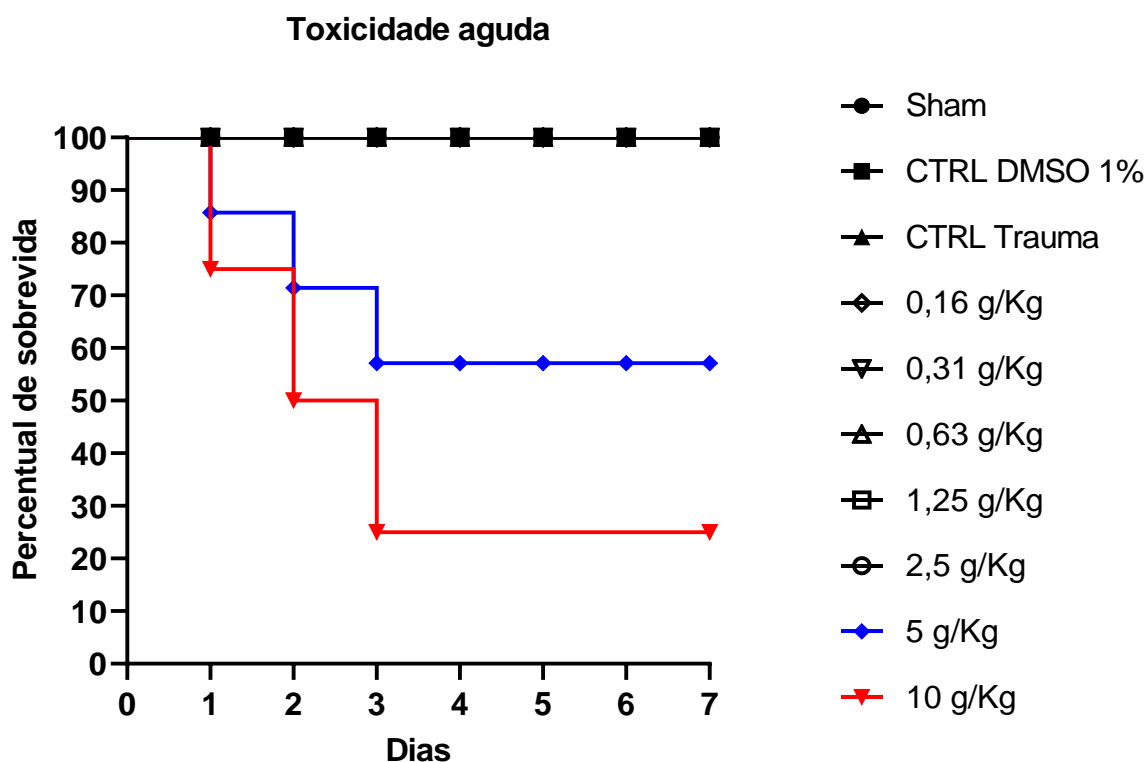


Figura 11: Taxa de sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* após tratamento com o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis*. Avaliação da sobrevivência de *T. molitor* após injeção do OLB. Foi inoculado 10 μ L do OLB entre o 4^o e 5^o metâmero, no sentido da calda a cabeça, na porção ventral em várias doses. Foi observado durante sete dias as larvas mortas e vivas, retirando sempre os mortos. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (Teste Kaplan-Meier e Teste Log-Rank [Mantel-Cox]).



Figura 12: Representação das larvas de *Tenebrio molitor* com suas respectivas doses.

4 Discussão

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as espécies vegetais são a melhor fonte de fármacos para a humanidade, de forma que muitos deles apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcaloides, terpenos, chalconas e flavonoides, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida e/ou anti-*Leishmania* (QUEIROZ et al., 1996; ROCHA et al., 2005).

Diversos compostos químicos, isolados de extratos vegetais, possuem atividades leishmanicida comprovadas contra as promastigotas e amastigotas do gênero *Leishmania* em testes *in vitro*. Já foi relatada atividade leishmanicida em terpenóides (SAUVAIN et al., 1996; CAMACHO et al., 2000), chalconas (CHEN et al., 1993; BOECK et al., 2006), flavonoides (ARAUJO, ALEGRIO, LEON, 1998) e de alcaloides (MAHIOU et al., 2004; FOURNET et al., 1996). Apesar de alguns compostos e produtos naturais terem suas atividades comprovadas contra os parasitas do gênero *Leishmania*, muitos estudos devem ser feitos em relação ao seu manuseio, coleta e modo de produção, e também em relação a sua composição química.

Ainda são poucos os estudos relacionados a *Lithraea brasiliensis* em relação a sua composição química e sua atividade biológica. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo analisar a composição química do óleo essencial desse produto natural bem como analisar através de teste *in vitro* e *in vivo* o quão seguro esse composto é para ser utilizado para o tratamento de algumas doenças, como leishmaniose.

O óleo essencial de *L. brasiliensis* (OLB) é caracterizado como um óleo volátil por conta dos seus compostos químicos, que por sua vez são metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas e sua produção e localização ocorre em diferentes órgãos vegetais. Sua composição de óleos voláteis envolve monoterpenos e sesquiterpenos, compostos presentes no óleo essencial de *L. brasiliensis*, e também fenilpropanoides (FAMPA et al., 2021). Embora os mecanismos de ação contra patógenos não estejam totalmente claros, a característica lipofílica do óleo essencial pode aumentar a permeabilidade da membrana celular, levando a danos graves em células-alvo (BAKKALI et al., 2008).

O potencial de ação dos OE descritos na literatura sugere inibição do crescimento do parasita, desestabilização da membrana plasmática, desencadeamento da peroxidação lipídica, inibição das enzimas do parasita, e mudanças na permeabilidade da membrana

mitocondrial (IZUMI et al., 2011; SAEIDNIA, GOHARI, 2012; DE LARA DA SILVA et al., 2020).

Após a identificação foram quantificados 32 compostos do OLB englobando as classes dos terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos), ácidos graxos, éster metil e hidrocarbonetos, tendo como compostos majoritários o β -mirceno, nerolidol, e ácido 4-octanóico éster metílico, (Tabela 1), e alguns dos compostos químicos identificados já foram testados de forma isolada avaliando não somente seu potencial biológico, mas também sua forma de ação no organismo.

Os monoterpenos são classificados como óleos voláteis, sendo comumente líquidos e aromáticos podendo ser empregados na preparação de perfumes e aromatizantes de alimentos, e na indústria farmacêutica são utilizados na produção de vitamina A, iononas que são encontrados em diversos OE, metiliononas, e mentol que promove o alívio de irritações, além de ser analgésico e anti-inflamatório (TRASARTI et al., 2004; MAKI-ARVELA et al., 2005; PIHLASATO et al., 2007). Essa classe de terpenos ainda possui outras atividades biológicas como bradicardia (ANJOS et al., 2013), hipotensão (ANJOS et al., 2013; RODRIGUES, 2010), atividade antimicrobiana (ALVIANO et al., 2005), ações sedativas, anticonvulsivantes, hipnóticas e hipotérmicas, efeitos antiespasmódicos, vasorrelaxantes (CUNHA, 2013; PEANA et al., 2006), antinociceptiva (PEANA et al., 2004; SIGMA-ALDRICH, 2014), anti-*Leishmania* (ROSA et al., 2003), e antimicrobiano podendo ser utilizado no combate aos microrganismos causadores de infecções hospitalares (ALVIANO et al., 2005)

Essas classes de terpenos possuem diversas atividades biológicas comprovadas, como o citral, geraniol e nerol que são monoterpenos com atividade antimicrobiana (KHAN, AHMAD, 2011; ZORE et al., 2011; AIEMSAARD et al., 2011; NGAN et al., 2012) e antifúngica (MIRON, 2013).

O linalol, que também foi um dos composto encontrado no óleo essencial de *L. brasiliensis*, possui atividade cardiovascular como em estudos realizado por Anjos e colaboradores (2013) onde o mesmo foi capaz de liberar fatores relaxantes derivados do endotélio causando o relaxamento na musculatura lisa vascular; efeitos antinociceptivos como em um estudo realizado por Coelho e colaboradores (2013) onde ao verificar os possíveis danos ao DNA presente no sangue e em tecidos cerebrais constatou-se que não houve um aumento no índices de danos nos grupos tratados com linalol de modo a sugerir que ele não apresenta efeitos genotóxicos ou mutagênicos; efeito antimicrobiano de

acordo com um estudo realizado por Soković e colaboradores (2010) foi possível averiguar um efeito inibitório mais potente sobre as bactérias Gram-positivas do que contra as Gram-negativas, apresentando bons efeitos antimicrobianos por um mecanismo que pode ser atribuído à desnaturação das proteínas ou desidratação sobre as células vegetativas; e também atividade leishmanicida como no estudo realizado por Rosa e colaboradores (2003) houve inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis* pelo óleo essencial de *C. cajucara* e linalol purificado, apresentando um percentual de inibição de 100% dos parasitas em uma hora, e quando observadas em microscopia eletrônica de transmissão constatou-se um rompimento de membrana flagelar, inchaço mitocondrial e alterações macroscópicas na organização das cromatinas nucleares.

O β -mirceno foi um dos compostos majoritários presentes no óleo essencial (Tabela 1). Ele é caracterizado como um monoterpene de cheiro agradável encontrado em várias plantas possuindo algumas atividades biológicas como atividade anticâncer (BHALLA, GUPTA, JAITAK, 2013), atividade analgésica (GUIMARÃES, QUINTANS, QUINTANS-JUNIOR, 2013), anti-*Leishmania* (CARVALHO et al., 2017), nociceptiva (SANTANA et al., 2013), atividade anti-inflamatória e cicatrizante (RIELLA et al., 2012) sendo esta última atividade relacionado a sua capacidade de inibir a formação de mediadores inflamatórios e/ou a modulação das vias centrais que controlam a dor (GUIMARÃES et al., 2013).

Esse composto também apresentou atividade anti-úlceras como demonstrado em um estudo realizado por Bonamin e colaboradores (2014), onde foram induzidas úlceras peptídicas em ratos e também foi avaliado os mecanismos de ação subjacentes aos efeitos do β -mirceno, mostrando então um efeito gastoprotetor causando também uma significativa diminuição nas lesões ulcerativas.

Já o nerolidol, o segundo componente encontrado em maior concentração no óleo essencial extraído dos frutos de *L. brasiliensis*, é classificado como um álcool sesquiterpeno alifático também presente no óleo essencial de várias plantas e também na dieta humana. Ele apresenta atividades *in vitro* contra células de câncer (TRIANA et al., 2013), bactérias (BREHM-STECHER, JOHNSON, 2003), fungos (PARK et al., 2009; JOHANN et al., 2012), e contra protozoários do gênero *Trypanosoma* (HOET et al., 2005), *Leishmania*, (ARRUDA et al., 2005), *Plasmodium* (RODRIGUES GOULART et al., 2004; SAITO et al., 2016) e *Babesia* (ABOULAILA et al., 2010).

O principal efeito do nerolidol nas células é o aumento da fluidez lipídica da camada mais superficial da pele (MENDANHA et al., 2017; ALONSO et al., 2016) e a fluidez lipídica nas membranas dos fibroblastos (MENDANHA et al., 2013), e isso porque, como os outros compostos sesquiterpenos possui alta hidrofobicidade possibilitando a penetração através da membrana e interação com proteínas intracelulares e/ou sítio intra-organelas (PARK et al., 2009).

Além de aumentar a fluidez lipídica, os sesquiterpenos, também são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes (GONZALEZ-BURGOS, GOMEZ-SERRANILHOS, 2012), equilibrando os efeitos das espécies reativas de oxigênio protegendo as células contra danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA (VINHOLES et al., 2014; NOGUEIRA NETO et al., 2013) eliminando radicais livres prevenindo a peroxidação lipídica e aumentando a produção de enzimas antioxidantes nas células para proteção contra o estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996; WANG, WANG, CHEN, 2008).

Estudos mostram que o nerolidol ainda exibe uma potente atividade antimicrobiana contra algumas cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* susceptíveis ou resistentes a metilina (HADA et al., 2003; TOGASHI et al., 2010) por conta de danos na membrana da célula e consequente lise celular (TOGASHI et al., 2010) interferindo também em genes que regulam a patogenicidade dos patógenos.

Em relação ao terceiro componente majoritário, o ácido 4-octanóico éster metílico, caracterizado como um ácido graxo, assim como o linolênico, também presente no OLB. Eles são compostos por uma longa cadeia hidro-carbonada e um grupamento carboxila terminal, apresentando três funções principais: 1) São componentes estruturais das membranas biológicas; 2) Atuam como precursores de mensageiros intracelulares e 3) São oxidados, nesse caso, gerando adenosina trifosfato (ATP) (FERREIRA et al., 2012).

A partir do início da década de 1970 foram realizados estudos demonstrando o efeito dos ácidos graxos na resposta imune onde os mesmos interferem em diversos passos do processo inflamatório como contração vascular, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação e morte celular (HATANAKA, CURI, 2007). Para o tratamento de feridas, o ácido linoleico e o ácido linolênico são os mais importantes para o tratamento de feridas, pois não podem ser sintetizados por mamíferos, sendo chamados de ácidos graxos essenciais (AGE) (MAHAN, ESCOTT-STUMP, 2005).

Produtos à base de AGE para o tratamento de feridas podem conter um ou dois AGE acrescidos de outras substâncias como vitamina A, vitamina E e lecitina de soja ou integrar formulações de triglicérides de cadeia média (TCM) que são úteis como fonte nutricional, solventes, veículos e estabilizador de produtos a ser administrado por via oral, tópica ou parental; eles ainda podem ter usos no tratamento e prevenção de dermatite amoniacal e úlceras por pressão, impedindo a maceração, além de ser de importância nos processos de inflamação celular e capacidade de regeneração dos tecidos (MAGALHÃES et al., 2008). Todos esses componentes agem de forma a aumentar a resposta imune, acelerando o processo inflamatório, e conseqüentemente estimulando o processo de cicatrização (DE NARDI et al., 2004).

Estudos mostram que, além dos ácidos graxos essenciais, lecitina, vitamina A e E também contribuem para o processo de reparação tecidual. As duas últimas possuem propriedades antioxidantes e protegem a membrana celular do ataque de radicais livres. Já a lecitina de soja, além de ser um agente de proteção, proporciona a manutenção da hidratação dos tecidos e ajuda no processo de cicatrização da pele (EHRlich, HUNT, 1968; HAMÚ, PINTO, CHAGAS, 1999).

O ácido linoleico, também presente no OLB, exerce um importante papel quimiotático para macrófagos, sendo fundamental na expressão de componentes que regulam a produção de colagenase, promovendo a remoção das impurezas de feridas; favorece o desbridamento autolítico no leito da ferida por contribuir com a produção de metaloproteínas, induzindo a granulação e podendo acelerar o processo de cicatrização. Foi observado que além disso, o ácido linoleico é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, alterando as sínteses de proteínas, parede celular, ácidos nucleicos e membranas celulares durante a divisão (GREENWAY, DYKE, 1979; DECLAIR, 1996).

Especificamente, o ácido linoleico é um lipídio encontrado em maior quantidade na camada epidérmica, sendo importante no transporte de gorduras, favorece a manutenção e integridade da barreira de permeabilidade epidérmica e acelera os processos cicatrizantes. Ele age como um modulador da membrana celular protegendo a lesão e agindo como um imunógeno local; é um protetor da pele contra agentes químicos e enzimático. Pelo fato de ser um lipídio que forma naturalmente uma barreira de impermeabilidade para a pele, age como um importante agente restaurador tecidual por

promover a quimiotaxia e angiogênese, ainda, protege a pele contra infecções por *S. aureus*, regula a permeabilidade da barreira de água da pele e proporciona a nutrição celular local (DENARDI et al., 2004; DECLAIR, 1996; BAJAY, JORGE, DANTAS, 2003).

Após a caracterização do óleo essencial dos frutos de *Lithraea brasiliensis*, e a identificação de compostos bioativos, foi avaliado sua eficácia na atividade anti-*Leishmania*, antioxidante, bem como sua segurança através de ensaios de citotoxicidade em células de linhagem RAW e eritrócitos de carneiro *in vitro* e toxicidade aguda *in vivo* (modelo alternativo com larvas de *Tenebrio molitor*).

Em relação a atividade do óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* frente as promastigotas do gênero *Leishmania*, concluiu-se que ele foi capaz de inibir tanto o crescimento de *L. amazonensis* (Figura 6) quanto de *L. infantum* (Figura 7) em todas as concentrações testadas havendo uma diminuição na porcentagem de inibição ao decorrer da diminuição da concentração, sendo ela então dose-dependente, mas ainda assim havendo uma diminuição de 63% e 64,86% nas menores concentrações testadas, respectivamente. Desta forma, quando calculado a concentração inibitória mínima, que é o nível de uma substância suficiente para inibir *in vitro* determinado componente biológico em 50% da quantidade inicial (IC50), para *L. amazonensis* o tratamento com OLB apresentou IC50 de 80,50 µg/mL e Pentamidina®, fármaco de referência, exibiu o valor de IC50 de 0,7 µg/mL; e para *L. infantum* o OLB apresentou IC50 de 76,42 µg/ml e para o fármaco de referência exibiu um valor de 0,9 µg/ml (Tabela 2).

Quando pesquisado em bases de dados os componentes majoritários identificados no óleo essencial de *L. brasiliensis*, somente o nerolidol utilizado de forma isolada apresentou atividade anti-*Leishmania*. Em um estudo realizado por Ceole e colaboradores (2017) analisando o óleo essencial de *Piper aduncum*, onde o principal constituinte é o nerolidol, frente as promastigotas de *Leishmania braziliensis*, também causador da leishmaniose tegumentar, e vale ressaltar que diferentes espécies desse gênero têm demonstrado atividade contra *L. amazonensis* e *L. infantum* (MARQUES et al., 2010; CARMO et al., 2012; CAPELLO et al., 2015; HOUEL et al., 2015; GUTIERREZ et al., 2016), foi efetivo contra as promastigotas de *L. braziliensis* sugerindo que o nerolidol pode causar danos na membrana do parasita, pois o mesmo, por ser altamente hidrofóbico, pode facilmente atravessar a membrana celular para alcançar alvos intracelulares (ANTHONY, FYFE, SMITH, 2005). Os terpenos não afetam a dinâmica

das proteínas da membrana, em vez disso, altera a fluidez lipídica (CAMARGOS et al., 2014) induzindo mecanismos de morte celular semelhante a apoptose.

Desta forma, ao analisar as promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com nerolidol, por microscopia eletrônica de transmissão, foram encontradas várias evidências morfológicas de um processo semelhante a apoptose como despolarização da membrana mitocondrial e encolhimento celular indicando que o tratamento com nerolidol levaria a morte celular dos parasitas através desse processo (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; GANNAVARAM, DEBRABANT, 2012; ISLAMUDDIN, SAHAL, AFRIN, 2014; AWASTHI et al., 2016; SHADAB et al., 2017).

Em um outro estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2017), foi avaliado a ação anti-*Leishmania* do óleo essencial das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, que também pertence à família Anacardiaceae, e é conhecida como “aroeira-do-sertão”, frente as promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Após a identificação dos constituintes do óleo essencial, observou-se a maior prevalência de monoterpenos e sesquiterpenos, destacando como maior componente o β -mirceno, e também observou-se que o OE mostrou um comportamento dose-dependente frente as promastigotas de *L. amazonensis* com um percentual de inibição de 100% nas duas primeiras concentrações. Os autores concluíram, após análises dos resultados que a atividade anti-*Leishmania* do óleo essencial não é provavelmente mediado pelo aumento da produção de óxido nítrico que é produzido por macrófagos e é uma das citocinas que auxilia na destruição do parasita, mas pelo aumento da capacidade de fagocitose.

Por fim, em um outro estudo realizado por Machado e colaboradores (2012) avaliou-se a ação do óleo essencial das partes aéreas de *Cymbopogon citratus* frente as promastigotas de *L. infantum*, *L. tropica* e *L. major*; após análise em cromatografia constatou-se que um dos maiores componentes é o β -mirceno. Ao ser analisado por microscopia eletrônica os autores observaram um aumento do volume das células e organelas e vacuolização do citoplasma das células tratadas com o OE podendo haver uma entrada passiva, e se acumular nas membranas das células do parasita levando a um aumento da permeabilidade da membrana. Ao observar a ação do óleo frente aos parasitas do gênero *Leishmania*, observou-se que ele induziu a morte dos parasitas compartilhando várias características fenotípicas observadas na apoptose de metazoários, aqueles unicelulares.

Após a realização de testes com as promastigotas do gênero *Leishmania*, foi realizado o teste de atividade antioxidante com o intuito de determinar se o óleo essencial possuía tal atividade. Esse teste possui importância e relevância comercial e farmacológica em relação aos aditivos estudados bem como pela necessidade de metodologias mais simples e baratas (PALANISAMY et al., 2011). As atividades antioxidantes de derivados vegetais têm sido avaliadas por diferentes métodos como os colorimétricos, que foi o teste realizado no presente estudo onde destacam-se aqueles relacionados a habilidade dos antioxidantes de neutralizar radicais como DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) ou ABTS. [Sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)].

No presente trabalho, foi realizado o teste de atividade antioxidante em ambos os métodos, DPPH e ABTS, e constatou-se que o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* não possui atividade antioxidante em nenhuma das concentrações testadas (6,25-100 µg/mL) (Figura 8) possivelmente pela complexidade da composição do OLB.

Em seguida foram realizados os testes de citotoxicidade em células RAW e em eritrócitos de carneiro, e toxicidade em larvas de *Tenebrio molitor* afim de testar a segurança do óleo essencial.

Para o primeiro, quando avaliado a atividade hemolítica do óleo essencial de *L. brasiliensis* em eritrócitos de carneiro, por meio do ensaio *in vitro*, observou-se que não houve citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas (50-0.39 mg/mL), quando comparado ao controle positivo (Figura 9).

Já quando avaliado o efeito citotóxico do óleo essencial de *L. brasiliensis* em células de linhagem RAW, através do ensaio *in vitro*, observou-se citotoxicidade nas maiores concentrações do OLB (5000,1000 e 500 µg/mL), quando comparada com o controle positivo (Pentamidina®), não sendo observado nas demais concentrações (Figura 10).

Os testes de citotoxicidade contra eritrócitos são baseados na liberação de hemoglobina causada pela ruptura total ou pela formação de poros nas membranas celulares (ORSINE et al., 2012). Esse teste é bem aceito usado para avaliação preliminar dos efeitos protetores e tóxicos de substâncias em humanos (FRESHNEY, 2005). Em um estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2017) avaliando a atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade do óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr.

All. conhecida popularmente como aroeira-do-sertão, ela demonstrou ser mais segura contra eritrócitos do que os medicamentos de referência indicando baixa citotoxicidade contra as células do hospedeiro.

Em outro estudo realizado por Mendanha e colaboradores (2013) avaliando a toxicidade dos terpenos em fibroblastos comparando seu potencial hemolítico e aumento da fluidez da membrana de eritrócitos observou-se os monoterpene não diferiam significativamente em sua potência para aumentar a fluidez lipídica, mas diferiam em sua capacidade de romper a membrana eritrocitária e de causar citotoxicidade em eritrócitos. Ainda de acordo com esse estudo, os monoterpene menos polares, como limoneno mostrou menos agressão a membrana e menor citotoxicidade; já o nerolidol mostrou maior potencial em aumentar a fluidez da membrana como também aumentou a capacidade de romper a membrana e aumentou o potencial citotóxico.

A concentração do nerolidol que causou 50% de hemólise foi de aproximadamente 2×10^5 moléculas/célula, no entanto, a concentração que produz um significativo aumento na fluidez na membrana dos eritrócitos foi de 2.5×10^9 moléculas/célula. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as sondas de spin estão distribuídas esparsamente na membrana, e, portanto, a espectroscopia de sonda de spin só detecta mudanças na fluidez quando ocorre uma mudança generalizada na membrana, o que sugere que uma alteração altamente localizada na membrana eritrocitária é o suficiente para causar hemólise.

Alguns gêneros incluídos na família *Anacardiaceae* são conhecidos por serem tóxicos e causadores de dermatite severa (CORREIA et al., 2006). Diante dos resultados obtidos nos testes de toxicidade e citotoxicidade, o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* apresenta toxicidade dependendo da concentração utilizada. No teste de toxicidade aguda com larvas de *T. molitor*, o OLB apresentou letalidade nas primeiras concentrações testadas havendo morte em mais da metade das larvas (Figura 11).

As plantas em geral produzem uma variedade de substâncias químicas que podem apresentar diversas atividades biológicas constituindo um recurso terapêutico importante principalmente para uma parcela da população que não tem acesso aos medicamentos industrializados (TÔRRES et al., 2005). Por esse motivo, e também por serem produtos naturais, existe uma percepção na população que o uso de plantas no tratamento de doenças é natural, seguro, barato e eficaz tendo seu uso associado aos medicamentos convencionais (TOVAR, PETZEL, 2009). Espécies consideradas tóxicas produzem

metabolitos secundários que pela inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas levando a sérios distúrbios no organismo e até mesmo ao óbito (VASCONCELOS et al., 2009; JESUS, SUCHARA, 2013).

Para isso deve ser realizado os testes de toxicidade que irá determinar o potencial de novas substâncias e produtos de causar danos à saúde humana e que os rotulam e classificam de acordo com seu potencial de letalidade ou toxicidade. Outras informações também podem ser registradas como mecanismos de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas, estabelecimento das doses para estudos adicionais a toxicidade, informações para a comparação de toxicidade entre as substâncias de mesma classe, informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais, além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (PURCHASE et al., 1998; BLAUBOER, 2003; PRIETO et al., 2006; COECKE et al., 2005).

5 Conclusões

Diante da importância da descoberta de novos fármacos e de medicamentos que sejam combinados ou não com produtos naturais de modo que potencialize o efeito dos mesmos, e que se diminuía os efeitos adversos e também o número de microrganismos resistentes a eles, faz-se necessário a descoberta desses potenciais produtos e mais que isso, estudos aprofundados relacionados a eles.

São escassos os estudos relacionados ao gênero *Lithraea*, e mais ainda estudos relacionados a espécie de *Lithraea brasiliensis*. Sabe-se que algumas plantas pertencentes a essa família são tóxicas, causam dermatites de contato e ainda, que possuem algumas atividades biológicas como antifúngica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-*Leishmania*, nociceptiva.

Com isso, conclui-se que o óleo essencial dos frutos de *Lithraea brasiliensis* apresenta baixa toxicidade para as células de linhagem RAW e eritrócitos de carneiro, demonstrando toxicidade dose-dependente somente aos modelos *in vivo* de *Tenebrio molitor*. O OLB possui atividade anti-promastigota contra os parasitos das espécies de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

Estes resultados nos direcionam a dar continuidade nos estudos *in vitro* e *in vivo* com o óleo essencial de *Lithraea brasiliensis* de modo a nos aprofundarmos em outras possíveis atividades biológicas, bem como relacionar essas atividades com os seus componentes químicos de forma isolada.

5 Referências bibliográficas

AIEMSAARD, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 31–37, 2011.

ALMEIDA, M.A.O. et al. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 227–232, 2005.

ALVIANO, W. S. et al. Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth Linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.

ANJOS, P. J. C. et al. Cardiovascular effects induced by Linalool in normotensive and hypertensive rats. **Z. Naturforsch. C.**, Tubingen, v. 68, n. 5-6, p. 181-190, 2013.

ANTHONY, J. P., FYFE, L., SMITH, H. (2005). Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology** 21, 462–468.

ARAÚJO, C.A.C., ALEGRIO, L.V., LEON, L.L. 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry** 49:751-754.

ARRUDA, D. et al. Antileishmanial activity of the terpene Nerolidol, **Antimicrob. Agents Chemother.** 49 (2005) 1679–1687.

AWASTHI, B. P. et al. (2016). Plumbagin, a plant-derived naphthoquinone metabolite induces mitochondria mediated apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*: an ultrastructural and physiological study. **Apoptosis** 21, 941–953.

BAJAY, H.M.; JORGE, A.S.; DANTAS, S.R.P.E. Curativos e coberturas para o tratamento de feridas. In: Jorge AS, Dantas SER, organizadores. Abordagem multidisciplinar do tratamento de feridas. **São Paulo: Atheneu**; 2003. p. 85-6.

BAKKALI. F. et al. (2008) Biological effects of essential oils-a review. **Food Chem Toxicol** 46:446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n.15, p.3643-3653, 2013.

BOECK, P. et al. 2006. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg Med Chem** 14: 1538-1545.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**. Número especial, Mar. 2021.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2017, Brasília - DF, 1ª ed., pag. 1-191.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.60 p.

BONAMIN, F. et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of b-myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-Biological Interactions** 212 (2014) 11–19

B.F. BREHM-STECHER, E.A. JOHNSON, Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (10) (2003) 3357–3360.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**. v.31 n. 3, p. 277-281, 2003.

CAPELLO, T. M. et al. (2015). Chemical composition and in vitro cytotoxic and antileishmanial activities of extract and essential oil from leaves of *Piper cernuum*. **Natural Product Communications** 10, 285–288.

CAMACHO, M.R. et al. 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry** 56: 203-210.

CAMARGOS, H. S. et al. (2014). Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. **PLoS ONE** 9, e104429.

CARMO, D. F. M. et al. (2012). Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. **Molecules** 17, 1819–1829.

CARVALHO, C.E.S. Anti-Leishmania activity of Essential oil of Myracrodruon urundeuva (Engl.) Fr. All.: Composition, Cytotoxicity and Possible mechanisms of Action. **Experimental Parasitology**. 2017. [10.1016/j.exppara.2017.02.012](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.012)

CEOLE, F.L. et al. Nerolidol, the main constituent of Piper aduncum essential oil, has anti-Leishmania braziliensis activity. **Parasitology**, Cambridge University Press 2017 doi:10.1017/S0031182017000452

CHEN M. et al. 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. **Antimicrob Agents Ch** 37:2550-2556.

COELHO, V. et al. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-Linalool in mice. **J. Nat. Med.**, Tokyo, v. 67, n. 4, p. 876-880, 2013.

COECKE, S. et al. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals**. suppl 1, p. 147-175, 2005.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS (CONITEC). **Proposta de elaboração protocolo clínico e diretrizes terapêuticas** - Local, 2

CORREIA, S.J. et al. 2006. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Quim. Nova**. 29(6), 1287-1300.

CUNHA, P. S. **Efeito vasorrelaxante dos isômeros (+) e (-) – Linalol em artéria mesentérica de rato**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2013.

DECLAIR V. Dermatite irritativa de fraldas. **Rev Paul Enferm**. 1996;15(1-3):24-32.

DE LARA DA SILVA, C.E. et al. (2020) Effect of essential oils on Leishmania amazonensis: a systematic review. **Parasitology** 147:1392–1407. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001304>

DE NARDI, A.B. et al. Secondary cicatrization in dermoepidermal wounds treated with essential fatty acids, vitamins A and E, soy lecithin and polynylpyrrolidone-iodine in dogs. **Arch Vet Sci**. 2004;9(1):1-16.

DUARTE, M.I.S.; BADARÓ, R.S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 1707-36.

EHRlich, H.P.; HUNT, T.K. Effects of cortisone and vitamin A on wound healing. **Ann Surg**. 1968;167(3):324-8.

FAMPA, P. et al. Anti-*Leishmania* Effects of Volatile Oils and Their Isolates. **Rev. Bras. Farmacogn**. 2021

FERREIRA, A.M. et al. Utilização dos Ácidos Graxos no Tratamento de Feridas: Uma revisão Integrativa da Literatura Nacional. **Rev Esc Enferm USP** 2012; 46(3):752-60

FOURNET, A. et al. 1996. In vitro efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Ch** 40: 2447-2451.

FRESHNEY, R.I., 2005. Culture of specific cell types. **John Wiley & Sons, Inc.** doi: 10.1002/0471747599.cac023

GANNAVARAM, S., DEBRABANT, A. (2012). Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 2, 1–9.

GREENWAY, D.L.A.; DYKE, K.G.H. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. **J Gen Microbiol**. 1979;115(1):233-45.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with Analgesic Activity-A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v.27, p. 1-15, 2013.

GUTIÉRREZ, Y. et al. (2016). Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. **Chemistry & Biodiversity** 13, 1715–1719.

GUIA DE ORIENTAÇÃO. Vigilância de leishmaniose tegumentar Americana (LTA). 2016, **Santa Catarina, 5º ed**, pag. 1-45

HADA, T. et al. Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Nat. Med.** 2003, 57, 64–67.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. Annu. **Rev. Nutr.** 1996, 16, 33–50. [CrossRef] [PubMed]

HAMÚ, Z.C.; PINTO, M.M.; CHAGAS, L.A.F. Ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E e lecitina de soja: uma nova opção no tratamento de lesões graves com perda de substância com ou sem presença de infecção. **Rev Bras Med.** 1999;56(1):5-12.

HOUËL, E. et al. (2015). Therapeutic switching: from antidermatophytic essential oils to new leishmanicidal products. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110, 106–113.

H. RODRIGUES GOULART. et al. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*, **Antimicrob. Agents Chemother.** 48 (2004) 2502–2509.

HATANAKA E, CURI R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Farmacol.** 2007;88(2):53-8.

ISLAMUDDIN, M., SAHAL, D., AFRIN, F. (2014). Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. **Journal of Medical Microbiology** 63, 74–85.

IZUMI, E. et al. (2011) Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Nat Prod Rep** 28:809–823. <https://doi.org/10.1039/C0NP00069H>

JESUS, N.A.; SUCHARA, E.A. Cultivo de plantas tóxicas e a ocorrência de intoxicações em domicílios no município de Barra do Graças. **Revista Eletrônica da UNIVAR**, v.2; n.10, p.89-95, 2013.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. (2010). Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors** 3, 104.

J. TRIANA. et al., A chemotaxonomic study of endemic species of genus *Tanacetum* from the Canary Islands, **Phytochemistry** 92 (2013) 87–104.

KHAN, M. S.; I. AHMAD. In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 48-55, 2011.

L. ALONSO, C.A. et al. Transmittance and autofluorescence of neonatal rat stratum corneum: nerolidol increases the dynamics and partitioning of protoporphyrin IX into intercellular membranes, **J. Fluoresc.** 26(2016) 709–717, <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1758-z>

LIMA, J.R. de. Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimônio pentavalente. 2017. 146f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)** – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2017. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/22948>

MACHADO, M. et al. Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology** 130 (2012) 223–231

MAGALHÃES, M.S.F. et al. Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. **Acta Cir Bras.** 2008;23(3):262-9.

MAHAN LK, ESCOTT-STUMP S. KRAUSE: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. **11ª ed. São Paulo: Roca;** 2005.

MAHIOU, V. et al. 1994. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **J Nat Prod** 57: 890-895.

MAKI-ARVELA, P. et al. One-pot citral transformation to menthol over bifunctional micro- and mesoporous metal modified catalysts: Effect of catalyst support and metal. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 240, p. 72–81, 2005.

M. ABOULAILA. et al. Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of Babesia parasites, **Parasitol. Int.** 59 (2) (2010) 278–282.

MARQUES, A. M. et al. (2010). Chemistry and biological activity of essential oils from Piper clausenianum (Piperaceae). **Natural Product Communications** 5, 1837–1840.

MENDANHA, A.S. et al. Effects of nerolidol and limonene on stratum corneum membranes: a probe EPR and fluorescence spectroscopy study. **Int. J. Pharm.** 30; 532(1), 547–554, 2017. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.046

MENDANHA, A. S. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro** 27 (2013) 323–329

MIRON, D. Avaliação da Atividade Antifúngica de Monoterpenos e Desenvolvimento de Métodos Analíticos e de Forma Farmacêutica Tópica. **Tese Apresentada para o Título de Doutor. Porto Alegre, 2013.**

NOGUEIRA NETO, J. et al. Antioxidant effects of nerolidol in mice hippocampus after open field test. **Neurochem. Res.** 2013, 38, 1861–1870. [CrossRef] [PubMed]

NGAN, L. T. et al. Growth-inhibiting effects of Paeonia lactiflora root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1575-1583, 2012

ORSINE, J.V.C. 2012. The acute cytotoxicity and lethal concentration (LC50) of Agaricus sylvaticus through hemolytic activity on human erythrocyte. **Int. J. Nutr. Metab.** 4, 19-23. doi: 10.5897/IJNAM11.064

PARK, M.J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and-terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes. **Fitoterapia** 2009, 80,290–296. [CrossRef] [PubMed]

PEANA, A. T. et al. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sci., Oxford**, v. 78, n. 7, p. 719-723, 2006.

PEANA, A. T. et al. Effects of (-)-Linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageen an, L-glutamate and prostaglandin E2. Eur. **J. Pharmacol.**, Sassari, v. 485, n. 1-3, p. 165-174, 2004.

PIHLASALO, J. et al. Conformational equilibria of citral. **Journal of Molecular Structure-THEOCHEM**, v. 814, p. 33-41, 2007.

PRIETO, P. et al. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PURCHASE, I. F. et al. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

QUEIROZ, E.F.1996. Pesseine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **J Nat Prod** 59: 438-440.

RIELLA, K. R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 656-663, 2012.

ROCHA, L.G. et al. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 12: 514-535.

RODRIGUES, K. M. S. **Ação do Linalol sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos**. 2010. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Brasil, Fortaleza, 2010.

ROSA, M. do S. S. et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 47, n. 6, p.1895-1901, 2003.

SAEIDNIA, S, GOHARI, A.R. (2012) Trypanocidal monoterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs. **Stud Nat Prod Chem** 37:173–189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00006-7>

SAITO, A.Y. et al. Antimalarial activity of the terpene nerolidol, **Int. J. Antimicrob. Agents** 48 (6) (2016) 641–646.

SANTANA, M. T. et al. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 9, p. 1144-1149, 2013.

SAUVAIN M. et al. 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dellineaceae) **Phytother Res** 10:1-4.

SHADAB, M. et al. (2017). Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with Kalsome™ 10, a new liposomal amphotericin B. **PLoS ONE** 12, e0171306.

SIGMA-ALDRICH. **Linalool**. St. Louis: SIGMA, c2014. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/l2602?lang=pt®ion=BR>
Acesso em: 22 abr. 2022.

S. JOHANN. et al. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioide brasiliensis*, **Med. Mycol.** (8) (2012) 843–851.

S. HOET. et al. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*, **Planta Med.** 5 (2006) 480-482.

SOKOVIĆ, M. et al. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 11, p. 7532-7546, 2010.

TOGASHI, N. et al. Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* of terpene alcohols with aliphatic carbon chains. **J. Essent. Oil Res.** 2010, 22, 263–269.
[CrossRef]

TÔRRES, A.R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.373-380, 2005.

TOVAR R.T., PETZEL, R.M. Herbal toxicity. **Disease-a-month**, v.55, n.10, p.592–641, 2009.

TRASARTI, A.F. et al. Highly selective synthesis of menthols from citral in a one-step process. **Journal of Catalysis**, v. 224, p. 484–488, 2004.

VASCONCELOS, J. et al. Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. **Revista Científica da UFPA**, v.7, n.1, p.1-10, 2009.

VASCONCELOS, J.M. et al. **Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento**. Artigo de Atualização/Update. RBAC. 2018;50(3):221-7

VINHOLES, J. et al. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. **Food Chem.** 2014, 156, 204-211. [CrossRef] [PubMed]

WANG, C.Y.; WANG, S.Y.; CHEN, C.T. Increasing antioxidant activity and reducing decay of blueberries by essential oils. J. Agric. **Food Chem.** 2008, 56, 3587–3592. [CrossRef] [PubMed]

ZORE, G.B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1181– 1190, 2011.

7 REFERÊNCIAS

ALÉ, I.S. et al. Allergic Contact Dermatitis Caused by *Lithraea molleoides* and *Lithraea braziliensis*: Identification and Characterization of the Responsible Allergens. **American Journal of Contact Dermatitis**, Vol8, No 3 (September), 1997: pp 144-149

ASTOLF FILHO, S.; SILVA, C.D.A; BIGI, M.F. (2014). Bioprospecção e biotecnologia. **Parc. Estrat. Brasília**, 19(38): 45-80

BARRAL, A. et al. Polar and Subpolar Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: Clinical and Immunopathologic Aspects. **International Journal of Dermatology**, v.34, n. 7, p. 474–479, 1995.

BASTOS, M. M. et al. (2016). Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Rev. Virtual Quim.** 8 (6), 2072-2104.

BERLINCK, R.G.S. et al. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Quim. Nova**, Vol. 40, No. 6, 706-710, 2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico**. Número especial, Mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**, Brasília: Ministério da Saúde, 2011.78 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultivo, uso e manipulação de plantas medicinais**. Brasília. 2004.

BRASIL, M. DA S. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2016.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2018). **Manejo Terapêutico de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)**. Santa Catarina, 13 p. Disponível em:

<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/ManualLTAvisualiza%C3%A7%C3%A3o.pdf>

BRAY, P. G. et al. (2013). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**. 19, 232.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Clin. Infect Dis.**, 2005; 7:33 – 38.

CAETANO, N. L. B. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população do município de Lagarto- SE, Brasil–Ênfase em pacientes oncológicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 748–756, 2015.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C.D. et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde / ISSN 2178-2091**. 2020.

CONCEIÇÃO, G. M. et al. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2012.

CORREIA, S.J. et al. 2006. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Quim. Nova**. 29(6), 1287-1300.

DE MOURA, F. D. et al. A Importância da Biossegurança na Produção e Utilização de Produtos Naturais e Fitoterápicos. **Braz. J. of Develop., Curitiba**, v. 6, n. 2, p.7054-7062 feb. 2020. ISSN 2525-8761

DINESH N. Glycyrrhizic acid attenuates growth of *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. **Experimental parasitology**. 2017; 176:21-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.015>

DUARTE, M.I.S.; BADARÓ, R.S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 1707-36.

FANGUEIRO, J. F. et al. (2012). Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**. 35, 1848-1853.

GEORGIADOU, S. P. et al. Current clinical, laboratory, and treatment outcome characteristics of visceral leishmaniasis: results from a seven-year retrospective study in Greece. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 34, p. 46-50, 2015.

GIL, E.S. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.3, p. 223-230, 2008 ISSN ISSN 1808-4532

HENDRICKX, S., CALJON, G., & MAES, L. (2019). Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. **Parasitology Research**.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

LAURENTI, M. D. Patologia e patogenia das Leishmanioses. 2010. 84 f. **Tese (Livre-Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 2010.**

LIEW, F.Y. et al. Macrophage killing of Leishmania parasites in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v.144, p. 4794, 1990.

LIMA, A.S. et al. Acaricide activity of extract and an isolated compound of *Lithraea brasiliensis* on *Rhipicephalus microplus* and selectivity actions against a non-target organism. **Veterinary Parasitology** 300 (2021) 109597.

MARINS, J. R. P. Nota técnica número 52/2011 CGDT/DEVIT/SVS/MS. **Orientações sobre a utilização da anfotericina B para o tratamento de pacientes com as leishmanioses**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, 2011.2p.

MAKHATADZE NJ. Tumor Necrosis Factor Locus: Genetic Organisation and Biological Implications. **Hum Immunol** 1998;59:571–579.

MARTINELL, G.; MORAES, M. A. (Orgs.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, cap. 2, p. 140-141, 2013.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Robe, 1999.

MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Rev Immunol** 2008;8: 958–969.

NASCIMENTO, M. D. S. B. et al. (2005). Prevalência de infecção por *Leishmaniachagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. 21, 1801-1807.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135, 2010.

OLIVEIRA LFG, GILBERT B, BÔAS GKV. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos**. 2013; 8(1):33-42. doi: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15128>.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS, 2019.

PIENNAR, M.E; TEICHMAN, I.V. The generic position of *Lithraea brasiliensis* Marchand (Anacardiaceae): evidence from fruit and seed structure. **Botanical Journal of the Linnean Society** (1998), 126: 327-337. With 4 figures

PRATES, D. B. et al. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. **J. Parasitol. Res.**, v. 2012, p. 643029, 2012.

ROCHA L. G. et al. Review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 2005; 12:514-35.

RODRIGUES K.A.F. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. 2015; 160:32-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024>

ROHOUŠOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: Effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitologica**, v. 53, n. 3, p. 161–171, 2006.

RUFFA, M.J. et al. 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **J. Ethnopharmacol**. 79, 335–339. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00400-7](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00400-7)

SANTOS T.A. **Avaliação de diferentes métodos e solventes de extração sobre a composição fenólica e centesimal, atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos dos frutos da *Momordica charantia* L.** 2018. doi: <https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/8871>

SANTANA, M. D. O et al. O Poder das Plantas Medicinais: uma Análise Histórica e Contemporânea sobre a Fitoterapia na visão de Idosas. **Multidebates**, v. 2, n. 2, p. 10-27, 2018.

SHIMIZU, M.T. et al. 2006. Essential oil of *Lithraea Molleoides* (vell.): chemical composition and antimicrobial activity. **Braz. J. Microbiol.** 37, 556–560. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400028>

SILVA-LÓPEZ RE. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, 2010; 33:1541 – 1543.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. Anacardiaceae In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB44>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

SILVEIRA, F. T. et al. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1075–1080, 2008.

SINGH N, et al. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2012; 3: 485-497, 2012.

SOARES, C. V. S. B. A. A. M. Intoxicação por plantas no estado do Espírito Santo. **Infarma**, v. 20, n. 11/12, p. 8–11, 2008.

TIUMAN TS, et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, 2011; 15: 525 -32.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.

VASCONCELOS, J.M. et al. **Leishmaniose Tegumentar Americana: Perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento**. RBAC. 2018; 50 (3):221-7

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–28, 2005.

VERONESI. Tratado de infectologia. 3ª ed /São Paulo: **editora Atheneu**, 2005 vol.2 Cap.92.

WHO. The World Health Report Geneva, **Switzerland**. 2015.

WHO. The World Health Report Geneva, **Switzerland**. 2008.

WHO. **Status of endemicity of CL worldwide 2016**, 2016. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf

WHO | Leishmaniasis [Internet]. [cited 2020 Jan 11]. Available from: https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/

World Health Organization, 2010. Leishmaniasis: background information. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/en/ Acesso em: 12 dez. 2011.