

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBICIDA DOS COMPOSTOS 1,8-CINEOL,
ALFA-PINENO E P-CIMENO PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DO GÊNERO
Protium SOBRE *Leishmania amazonensis* in vitro.**

RAISSA COUTO SANTANA

2019



UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBICIDA DOS COMPOSTOS 1,8
-CINEOL, ALFA-PINENO E P-CIMENO PRESENTES EM ÓLEOS
ESSENCIAIS DO GÊNERO *Protium* SOBRE *Leishmania amazonensis* in
vitro**

RAISSA COUTO SANTANA

Sob orientação da Professora

Lucia Helena Pinto da Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S231a Santana, Raissa Couto, 1994-
Avaliação do Potencial Microbicida dos compostos
1,8-cineol, alfa-pineno e p-cimeno presentes no óleo
essencial do gênero *Protium* sobre *Leishmania*
amazonensis in vitro. / Raissa Couto Santana. - 2019.
93 f.

Orientadora: Lucia Helana Pinto da Silva.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2019.

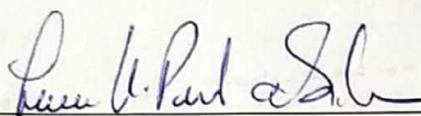
1. *Leishmania amazonensis*. 2. Terpenos. 3.
Protium. 4. Tratamentos. 5. Óleos Essenciais. I.
Silva, Lucia Helana Pinto da , 1975-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
Graduação em Ciências Veterinárias III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

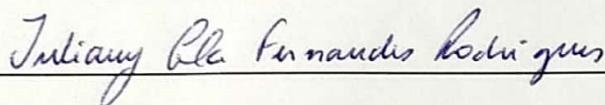
RAISSA COUTO SANTANA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

DISSERTAÇÃO (APROVADA EM 25/02/19 (Data da defesa)



Prof. Dr. Lucia Helena Pinto da Silva. IV/UFRRJ (Orientador)

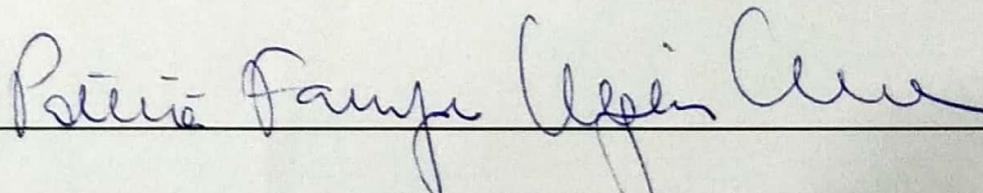


Prof. Dr. Juliany Cola Fernandes Rodrigues, PhD. IBCCF/UFRRJ(Titular)



Prof. Dr. Cedric Graebin, PhD. IQ-UFRRJ(Titular)

Prof. Dr. Deivid Costa Soares, PhD. IMPPG/UFRRJ(Suplente)



Prof. Dr. Patricia Fampa Negreiros Lima, PhD. ICBS/UFRRJ. (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rosilane Couto e Anizio Joaquim de Santana Neto pelo apoio e investimento nos meus estudos. Sempre tive suporte e sempre fizeram o possível para me ajudar a me tornar um indivíduo melhor e com objetivos, me incentivando em todas as minhas escolhas e dúvidas.

Igualmente agradeço ao meu irmão. Discutimos muito e discutimos sempre, mas me sinto uma verdadeira irmã mais velha quando me pede conselhos ou debatemos opiniões. Agora que já está no auge dos seus 18 anos, formando ideias e decidindo seu rumo como profissional e como pessoa, sou grata por ser um pilar que forma seu caráter.

Agradeço ao restante da minha família. Sou felizarda em ter ambos os lados da família muito alegres com a vida e mestres em organizar churrascos e festas. Amo todos, somos unidos apesar dos problemas e é algo que poucos podem se orgulhar.

Agradeço aos meus amigos. Particularmente os que conheci durante minha graduação e que graças a Deus não caímos no conto de “vamos marcar um dia pra se ver”. Procuramos nos manter unidos e celebramos juntos nossas derrotas e vitórias da “vida adulta”.

A Emily, minha irmã de vida. Nossa cumplicidade e amor ultrapassa todos os níveis de amizade.

Ao Ivison, que veio embrulhado de Maceió e que a amizade não esperava, mas brotou tão simples e se fortaleceu em tão pouco tempo que não me imagino em um cenário no qual não fossemos companheiros em outras vidas.

Agradeço a meu laboratório. Minha jornada na ciência começou no laboratório da Professora Patrícia Fampa e dá continuidade no laboratório de imunologia com a minha orientadora Lucia Helena. Como gosto de falar entre meus amigos desse meio, minha “Mãe Científica”. Apesar de já ter 3 filhos, Lucia me adotou e me ensinou tudo que sei. Sou eternamente grata a ela e a Patricia tanto pela minha formação profissional, quanto pela minha formação de vida sendo exemplos de mulheres fortes na ciência.

Aos meus amigos de laboratório, que me ajudam diariamente. Damos suporte uns aos outros nas adversidades e problemas que encontramos nessa jornada que escolhemos fazer.

Ao Dr. Carlos Siani da FIOCRUZ e Dr. Mônica Freiman de S. Ramos da UFRJ pelas amostras de componentes para a realização do meu trabalho.

Ao Dr. Deivid C. Soares do grupo de laboratório da professora Professora Elvira Saraiva da UFRJ, que me acolheu durante um período enriquecendo meu aprendizado.

Ao laboratório da Professora Georgia Atella da UFRJ que aceitou nosso pedido de colaboração e que dessa parceria nos proporcionou um prêmio internacional no Congresso Brasileiro de Chagas.

Agradeço a minha maravilhosa Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, aos professores que me ensinaram muito mais do que está nos livros, aos seus funcionários e ao acolhimento de todos.

Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SANTANA, Raissa Couto. **Avaliação do potencial microbicida dos compostos 1,8-cineol, alfa-pineno e p-cimeno presentes em óleos essenciais do gênero *Protium* sobre *Leishmania amazonensis* in vitro.** 77p. Dissertação de (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

As leishmanioses se encontram entre as mais importantes no grupo das doenças negligenciadas. Segundo dados da OMS, o número de casos pode chegar a 1,3 milhão anualmente. As manifestações clínicas destas doenças, afligem humanos e animais, sendo um problema de saúde pública e veterinária. Os fármacos utilizados no tratamento possuem vários problemas como administração dificultosa, alta toxicidade, custo elevado e além disso, casos de resistência tem sido reportados. Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas constituídos por uma complexa mistura de diferentes substâncias. Neste trabalho estudamos o potencial microbicida dos compostos 1,8-cineol, p-cimeno e α -pineno presentes em óleos essenciais do gênero *Protium* sobre o parasito *Leishmania amazonensis* um dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea e difusa cutânea no Novo Mundo, *in vitro*. Nossos dados mostraram que o tratamento com os compostos 1,8-cineol, α -pineno e p-cimeno dos macrófagos murinos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* possui atividade anti-amastigota. Os compostos inibiram a sobrevivência dos amastigotas de forma concentração dependente, com IC₅₀ de 40 μ g/mL, 50,1 μ g/mL e 41,4 μ g/mL para α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol, respectivamente. A avaliação da citotoxicidade para os macrófagos murinos foi avaliada por XTT e os resultados mostraram que as células permaneceram viáveis entre 70-95 % até a concentração mais alta testada (200 μ g/mL), assim como sua capacidade fagocítica não foi alterada pelo tratamento. A produção de óxido nítrico por macrófagos foi analisada por ser uma molécula altamente tóxica para microorganismos intracelulares, no entanto, o tratamento de macrófagos estimulados ou não com LPS, mostrou que estes compostos não modulam a produção de NO pelos macrófagos. Outro possível mecanismo de ação avaliado foi o efeito na composição lipídica dos parasitos tratados, nossos resultados mostraram que promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram uma mudança no perfil lipídico após 48h de tratamento na concentração de 50 μ g/mL dos compostos. O tratamento com 1,8-cineol diminuiu as concentrações de triacilglicerol e esterol + 1.2 diacilglicerol em torno de 50%, enquanto que em ácidos graxos e 1.3 diacilglicerol há uma tendência de redução nos parasitos tratados. Por outro lado, α -pineno aumentou as concentrações de triacilglicerol e esterol esterificado em 50% e p-cimeno aumentou em 26% de triacilglicerol. Os resultados indicam que os compostos α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol tem atividade anti-*Leishmania* contra *Leishmania amazonensis*.

Palavras chaves: *Leishmania amazonensis*, terpenos, *Protium*, tratamentos.

ABSTRACT

SANTANA, Raissa Couto. **Microbicidal potential evaluation of 1,8-cineole, α -pinene and p-cymene compounds of essential oil from *Protium* genus on *Leishmania amazonensis* in vitro.** 2019. 77p. Dissertation (Master's in veterinary sciences), Veterinary Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Leishmaniasis are one of the wide neglected diseases in the world. According to WHO, the number of cases can reach 1.3 million year. The clinical manifestations of these diseases affect humans and animals, being a public and veterinary health problem. The current treatment presents several problems such as difficult of administration, high toxicity and high-costs; besides drug-resistance being observed in many cases. Essential oils are secondary metabolites synthesized by plants, composed of a complex mixture of different substances. In this work, we study in vitro the microbicide potential of 1,8-cineole, p-cymene and α -pinene compounds present in essential oils of *Protium* genus on *Leishmania amazonensis*, one of the etiological agents of cutaneous and diffuse cutaneous leishmaniasis in the New World. Our data showed that treatment of *L. amazonensis* infected macrophages with the compounds 1,8-cineole, α -pinene and p-cymene have an anti-amastigote activity. The compounds inhibited the amastigotes survival in a concentration-dependent manner with IC₅₀ of 40 μ g/mL, 50,1 μ g/mL and 41,4 μ g/mL for α -pinene, p-cymene and 1,8-cineole, respectively. The cytotoxicity for murine macrophages was evaluated by XTT and the results showed that the cells viability remained among 70-95% up to the highest tested concentration (200 μ g / mL), as well as, their phagocytic capacity was not altered by treatment. Nitric oxide production by macrophages was analyzed because it is a highly toxic molecule for intracellular microorganisms, however, the treatment of resting or LPS-activated macrophages did not modulate NO production by macrophages. Another possible mechanism of action analyzed was the effect of treatment on parasite lipid composition, our results showed that treated *L. amazonensis* promastigotes had a change in the lipid profile after 48h of treatment at 50 μ g/mL of the compounds. 1,8-cineole treatment decreases around 50% the concentrations of triacylglycerol and sterol + 1,2-diacylglycerol, whereas in fatty acids and 1,3-diacylglycerol there is a tendency of reduction on treated parasites. On the other hand, α -pinene increased the concentrations of triacylglycerol and sterol sterified by 50% and p-cymene augmented 26% of triacylglycerol. The results indicate that α -pinene, p-cymene and 1,8-cineol compounds have anti-*Leishmania* activity against *Leishmania amazonensis*.

Key words: *Leishmania amazonensis*, terpenes, *Protium*, treatment.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da distribuição mundial de Leishmaniose de 2015/16: a- Cutânea e b- Visceral. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> - Visitado em 13/12/18.....4
- Figura 2.** Ciclo Biológico da *Leishmania sp.* Serafim et. al., 2018.....6
- Figura 3.** Sinais clínicos da leishmaniose canina. (a) ceratoconjuntivite; (b) lesão facial com dermatite esfoliativa; (c) epistaxe; (d) onicogribose; (e) lesão ulcerativa. Beneth e colaboradores (2008).....8
- Figura 4.** Imagens obtidas do estudo de caso leishmaniose felina por *Leishmania amazonensis* em Ribas do Rio Pardo, MS, Brasil; (A) ulcerações no nariz e (B) nódulos na orelha (Souza et. al. 2009).....9
- Figura 5.** Principais formas clínicas das leishmanioses e suas respectivas espécies etiológicas (adaptado de Ready, 2014 e Scorza, Carvalho & Wilson, 2017)12
- Figura 6. Manifestações Clínicas da Leishmaniose:** A- Leishmaniose Cutânea; B- Leishmaniose Mucocutânea; C- Leishmaniose Disseminada; D- Leishmaniose Difusa; E- Leishmaniose Visceral; F- Pós-Kalazar. Fontes: https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/ e Atlas didático: Ciclo da *Leishmania* (Texeira et. al. 2013).....13
- Figura 7.** Imagens de *Protium hebetatum* Daly (superior) e *Protium altsonii* Sandwith (inferior) Fonte: Reflora (<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/PrincipalUC/PrincipalUC.do?lingua=en>).....23
- Figura 8.** Estrutura química do composto p-cimeno. Fonte: Google imagens.....24
- Figura 9.** Estrutura química do composto 1,8-cineol. Fonte: Google imagens.....26
- Figura 10.** Estrutura química do composto α -pineno. Fonte: Google imagens.....28
- Figura 11.** Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram incubados com diferentes concentrações de α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol por 48h/37°C/5%CO₂. A viabilidade celular foi analisada pelo teste colorimétrico de sal XTT . Gráfico representa 3 experimentos independentes com média \pm SEM. α -p = α -pineno; p-c = p-cimeno; 1.8-c = 1,8-cineol;* p <0,05 em relação ao controle tratado com DMSO. Azida = 2 %.....37
- Figura 12.** Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com o composto [50 μ g / mL] e depois de 2h infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10:1 por 2h/37°C/5%CO₂. O índice fagocítico (% de macrófagos infectados x número de promastigotas por macrófagos) foi determinado pela contagem de no mínimo 200 células. Gráfico representa 3 experimentos independentes com média \pm SEM.....38

Figura 13. Macrófagos murinos peritoneais foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* na proporção de 10p:1m e depois de 24h foram tratados com α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol em diferentes concentrações. A porcentagem de inibição de sobrevivência do amastigota foi medida em relação ao controle DMSO (1%). Gráfico representa 6 experimentos independentes com média \pm SEM. *** P <0,0001; **p<0,002; *p<0,05. α -p = α -pineno; p-c = p-cimeno; 1.8-c = 1,8-cineol; AMB= Anfotericina B [1 μ g/mL].....39

Figura 14. Microscopia óptica de macrófagos infectados e tratados com (A) DMSO 1%; (B) AMB [1 μ g/mL]; (C) α -pineno; (D) p-cimeno e (E) 1.8-cineol na concentração de 50 μ g/mL. Foto tirada com celular na objetiva de 100x. Seta indica macrófagos infectados.....40

Figura 15. Macrófagos peritoneais foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10p:1m. Após 24 horas de infecção, as células foram tratadas com α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol [50 μ g/mL] por mais 24 h. O meio foi removido e uma solução contendo 0,1% SDS foi adicionada seguida de meio Scheneider +10% FBS e após 48h os promastigotas foram contados em câmara Neubauer. Gráfico representa 5 experimentos independentes com média \pm SEM * P<0.05.....41

Figura 16. Macrófagos em repouso ou ativados com 100 ng/mL de LPS foram tratados ou não com α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol [50 μ g/mL] por 48 horas. O sobrenadante foi recolhido e quantidade de nitrito dosado através do reagente Griess. Gráfico representa 4 experimentos independentes com média \pm SEM ***p=0,0009 e *p<0,05.....42

Figura 17. Efeito na composição lipídica de *L. amazonensis*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com os compostos na concentração de 50 μ g / mL por 48h. Após esse período, as células foram lisadas, submetidas a técnicas de extração lipídica e analisados por TLC. (A) Análise de densitometria da placa de TLC (B) Placa de TLC. Gráfico representa 3 experimentos independentes com média \pm SEM. ** P <0,0001. ES = esterol esterificado, FA = ácido graxos; TAG= triacilglicerol; 1.3 DG = 1.3 diacilglicerol; ST+1.2 DG = esterol esterificado + 1.2 diacilglicerol; PL= fosfolípido; OX=oxisterol.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estruturas moleculares dos fármacos utilizados no tratamento das Leishmanioses.
Fonte: <https://druginfo.nlm.nih.gov>.....**20**

Tabela 2. Constituintes dos óleos essenciais de resinas de *Protium altsonii* e *Protium hebetatum*.....**36**

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AB	Beta amiloides
AG	cido graxo
AKT/PKB	Proteína quinase B
Am-B	Anfotericina B
ATM-P53-CHK2	Via de sinalização
BAX/BCL-2	Proteínas apoptóticas
Ca⁺	Cálcio
CASPASE-3 e 9	Cisteína-cido aspártico-proteases
CAT	Catalase
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDC25	Fosfatase do ciclo de divisão celular
CDK1	Quinase dependente de ciclina
CDKN1B/P27-CDK1	Via de sinalização
CEUA	Comissão de tica no uso de animais
CG	Cromatografia gasosa
CHK1/2	Quinase checkpoint (ponto de verificação)
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
COX-2	Ciclo oxigenase 2
CXCL9;CXCL10	Quimiocinas (c-x-c) ligantes
CYT-C	Citocromo C
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de dimetilo
DNA	cido desoxirribonucleico
DNDi	Iniciativa de medicamentos para doenças negligenciadas
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
EC₅₀	Concentração máximo para obter 50% de efeito
ERG-1	Proteína reguladora transcripcional
ERK1/2	Quinase reguladora de sinal extracelular
FRAP	Potencial antioxidante redutor férrico

G2/M	Fases do ciclo celular (Pós síntese/mitose)
GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GRIESS	Teste químico que detecta a presença de nitrito
GSH	Glutationa
H+	Hidrogênio
HAT	Tripanossomíase humana africana (Doença do sono)
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
HO-1	Heme-Oxigenase I
HPLC	Cromatografia de camada fina
HSV-1	Vírus do herpes simples tipo 1
IC₅₀	Concentração máxima para obter 50% de inibição
IFN-γ	Interferon Gama
IKB-α	Proteína reguladora inibidora de NF-KB
IL-1b, 2, 18, 8, 27, 4, 10,12, 5, 13, 6	Interleucinas
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase
JNK1/2	Quinase terminal N C-jun
LAmB	Anfotericina lipossomal
LC	Leishmaniose cutânea
LD	Leishmaniose difusa
LD₅₀	Dose letal
LM	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MAG	Monoacilglicerol
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitose
MBC	Concentração bactericida mínima
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monocito 1
MDA	Malondialdeído

MFCS	Concentração fungicida mínima
Mg	Miligrama
MHC II	Moléculas do Complexo de histocompatibilidade II
MIC	Concentração inibitória mínima
μM	Micromolar
μg	Micrograma
Mn-SOD	SOD mitocondrial
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
OE	Óleos Essenciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	Proteína de tumor 53
PBS	Tampão fosfato-salino
PGS	Gel Secretório das Promastigotas
PH	Potencial Hidrogeniônico
PKDL	Leishmaniose dermal pós kalazar
PL	Fosfolipídeos
PMS	Metossulfato de fenazina
RNA	Ácido Ribonucleico
16S RNA	Ribossomo 16 da síntese do RNA
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura Instituto Memorial Roswell Park
SB -V	Antimoniais Pentavalentes
SDS	Dodecil sulfato de sódio ou Lauril sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SI	Índice de seletividade
SKO	Deleção de um único alelo
SOD	Superóxido desmutase
ST	Esteróis
STE	Sterol esterificado

TAG	Triacilglicerideos
TCD4	Linfócito T e receptor de membrana específico CD4
TCD8	Linfócito T e receptor de membrana específico CD8
TGF-B	Fator de crescimento transformante beta
TH1/TH2	Subpopulações Distintas De Linfócitos T Helpers Efetores
TLC	Cromatografica De Camada Fina
TNF-X	Fator de crescimento transformador Beta
TRL	Receptores semelhantes a Toll
UVA	Radiação ultravioleta A
XTT	Cloreto de trifenil tetrazólioq/Cloreto e tetrazólio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Epidemiologia.....	3
2.2 Ciclo Biológico.....	4
2.3 Importância Veterinária.....	7
2.4 Manifestações Clínicas.....	10
2.5 Tratamentos.....	14
2.5.1 Antimoniais Pentavalentes.....	14
2.5.2 Anfotericina-B.....	15
2.5.3 Miltefosina.....	15
2.5.4 Pentamidina.....	16
2.5.5 Paromomicina.....	16
2.5.6 Imiquimode.....	17
2.5.7 Fexinidazole.....	17
2.5.8 Azóis.....	18
2.5.9 Tratamento da leishmaniose canina.....	21
2.6 Óleos Essenciais e o gênero <i>protium</i>	22
2.6.1 para-cimeno.....	24
2.6.2 1,8-cineol.....	26
2.6.3 α -pineno.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivos Gerais.....	31
4.2 Objetivos Específicos.....	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1 Extração dos óleos essenciais.....	32
5.2 Animais e termos de ética.....	32
5.3 Parasitos.....	32
5.4 Obtenção de macrófagos murinos.....	32
5.5 Ensaio de citotoxicidade.....	32
5.6 Ensaio de fagocitose com promastigotas.....	32
5.7 Atividade Anti- <i>Leishmania</i>	33
5.8 Ensaio de morte (Killing).....	33
5.9 Dosagem de Óxido Nítrico (NO).....	33
5.10 Extração de lipídios.....	33
5.11 Cromatografia em camada fina (TLC).....	34
5.12 Análise estatística.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Composição química dos óleos essenciais de <i>Protium hebetatum</i> e <i>P. altsonii</i>	35
6.2 ENSAIO CITOTÓXICO.....	37
6.2.1 Análise de atividade mitocondrial de macrófagos murinos tratados com os componentes α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol.....	37
6.2.2 Ensaio de fagocitose de promastigotas tratados com os componentes α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol.....	38
6.3 ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA.....	39

6.3.1	Os componentes α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol inibem a sobrevivência dos amastigotas no interior de macrófagos murinos..	40
6.3.2	Ensaio de “Killing” de amastigotas.....	41
6.4	ANÁLISE DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS MONOTERPENOS.....	42
6.4.1	Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos tratados com p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol.	42
6.4.2	Avaliação do perfil lipídico de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após tratamento com os compostos 1,8-cineol, α -pineno e p-cimeno.	43
7.0	DISCUSSÃO.....	44
8.0	CONCLUSÃO.....	49
9.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1.0 INTRODUÇÃO

As chamadas doenças negligenciadas são moléstias infecciosas parasitárias, que acometem populações na margem da pobreza, com pouca visibilidade mundial. A denominação “negligenciada” tem origem devido à ausência de interesse das grandes indústrias farmacêuticas em produzir medicamentos ou vacinas por não haver retorno financeiro satisfatório. Os investimentos em pesquisas dessas doenças também são escassos afetando a descoberta de novos métodos de profilaxia e diagnóstico, principalmente no Brasil com orçamentos abaixo do esperado (ABC). A Leishmaniose compõe esse grupo de doenças ao lado da Doença de Chagas, Malária, Febre Amarela, Tuberculose, Doença do Sono entre outras. O número de casos pode chegar a 1,3 milhão e cerca 30.000 pessoas podem ser levadas a óbito anualmente. O Brasil é extremamente endêmico para a doença e juntamente com outros países representa 90% dos casos reportados de leishmaniose cutânea e visceral no mundo.

A doença possui diversas manifestações clínicas que podem ser acometidas por mais de 20 espécies de *Leishmania*. O ciclo do parasito envolve dois hospedeiros um invertebrado, onde se encontra formas promastigotas e um hospedeiro vertebrado que apresenta formas amastigotas, que infectam células mononucleares fagocíticas. Mamíferos como canídeos, felinos, e roedores podem ser infectados pelo parasito e comprometer o bem estar humano principalmente em indivíduos que moram em regiões de mata e/ou com condições sanitárias precárias.

Nas Américas o cão tem um papel fundamental na doença, visto que é o principal reservatório do parasito na área urbana e periurbana, pois muitas vezes são assintomáticos, o que dificulta a suspeita para um diagnóstico. Alguns casos de gatos infectados com leishmaniose são apresentados também na literatura, mas pouco se sabe ainda sobre o papel desses animais no ciclo do patógeno; acredita-se que esses animais são capazes de controlar a doença. Em áreas endêmicas, 60% da população desses animais pode apresentar sorologia para *Leishmania*, fazendo-se transitar o parasito entre os indivíduos. Esses animais são acometidos principalmente pela espécie *L. infantum* que causa a forma mais grave da doença. A eutanásia desses animais é exigida pelo Programa Nacional de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral do governo brasileiro. No entanto, os estudos apontam que essa medida não controla os casos humanos ganhando apelo no quesito ético. A vacinação do animal parece ser uma opção mais eficiente como medida profilática, sendo a leish-tec licenciada recentemente no Brasil.

Durante o repasto sanguíneo do flebotômio fêmea em um hospedeiro infectado, esses invertebrados ingerem sangue contendo células infectadas com formas amastigotas do parasito. Uma vez dentro do flebótomo, sofrem modificações morfológicas e bioquímicas fazendo com que se diferencem ao longo do intestino desses insetos. Na sua próxima alimentação sanguínea as fêmeas regurgitaram as formas infectantes, promastigotas metacíclicas, que serão então fagocitadas por células do sistema mononuclear e se multiplicar até rompê-los e infectarem novas células ao redor.

Uma variedade de fatores como background genético do hospedeiro, infectividade da cepa e estado imunológico podem influenciar na progressão da doença. O paciente pode apresentar desde uma lesão única e ulcerada no sítio de inoculação até diversas lesões nodulares espalhadas pelo corpo, podendo haver ainda comprometimento do fígado e baço, que se não tratado, leva a morte do paciente.

Os tratamentos se dividem em duas abordagens denominados fármacos de primeira e segunda escolha. Ambos tratamentos apresentam toxicidade e difícil administração, que prejudicam o acompanhamento contínuo do paciente. Esse abandono do tratamento acaba sendo um dos fatores geradores de cepas resistentes. As formulações menos comprometedoras a saúde acabam encarecendo o custo de aquisição e distribuição do fármaco, que atinge principalmente a população de países pobres.

Nos tratamentos alopáticos, as buscas por novos agentes terapêuticos têm se intensificado nos últimos anos, em particular quanto a encontrar moléculas eficazes a partir de plantas medicinais. O uso de plantas medicinais na saúde humana é muito comum em aldeias e em populações do interior, quando se utilizam diferentes partes das plantas, assim como seus extratos e derivados. O interesse nas suas propriedades medicinais estimula estudos científicos nessa área.

O gênero *Protium* Burm. f. pertence à família Burseraceae, com alta ocorrência na região Amazônica. A resina que exuda de seu tronco e galhos é denominada “breu”, e é utilizada popularmente como anti-inflamatório, antifúngico e gastroprotetor, entre outras patologias. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório identificaram a atividade anti-*Leishmania* em *Leishmania amazonensis* dos óleos essenciais das espécies: *Protium hebetatum* Daly e *Protium altsonii* Sandwith. Neste estudo, identificamos 3 compostos desses óleos: 1,8-cineol, p-cimeno e α -pineno. São todos da classe dos monoterpenos, e são descritos na literatura como possuindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, bactericida e fungicida, entre outros.

O objetivo principal do presente estudo foi identificar se esses compostos apresentavam atividade leishmanicida na infecção por *Leishmania amazonensis in vitro* e/ou se atuam modulando os macrófagos peritoneais de camundongos Balb-c. Os resultados visam enriquecer os estudos sobre esses compostos e indicar se estes possuem o potencial de uso no tratamento das leishmanioses.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O gênero *Leishmania* compreende espécies de protozoários parasitos intracelulares obrigatórios, que causam diversas manifestações clínicas e possuem forte endemia em áreas tropicais e subtropicais. As chamadas leishmanioses estão entre as mais importantes doenças negligenciadas, que afetam principalmente a população mais pobre do mundo (ALVAR, 2012).

Em 2016 a Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou 200.918 novos casos de leishmaniose cutânea (LC) e 22.233 de leishmaniose visceral (LV). Mais de 90% dos casos de LC foram reportados das regiões do Mediterrâneo Oriental (69%) e das Américas (24%). Os casos de LV foram mais distribuídos globalmente, 30% na região Africana, 30% Sudeste da Ásia, 22% no Mediterrâneo Oriental e 15% nas Américas (OMS WER, 2015). O Afeganistão, Brasil, Argélia, Colômbia, Paquistão e Síria reportaram cada um mais de 10.000 casos de LC representando >70% dos casos globais e o Brasil, Índia, Sudão e Sudão do sul reportaram cada um mais de 3.000 casos de LV representando 78% dos casos globais (**Figura 1 A e B**). Nem todos os países endêmicos e em área de risco se reportaram para OMS nesse trabalho, o que se estima é que o número de casos seja bem maior, podendo chegar de 700 mil a 1.3 milhão de novos casos e de 20 a 30 mil óbitos anualmente (OMS).

No Brasil foram 11.928 casos de leishmaniose cutânea e 762 de mucocutânea (LM) no mesmo ano e dentre os enfermos, 109 apresentavam coinfeção com vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em relação ao ano anterior, houve uma queda de somente 34% dos casos (OMS, 2018). A LV segue apresentando uma ampla distribuição geográfica de casos humanos no Brasil, onde se destacam as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Representamos 96% dos casos de leishmaniose visceral do continente, sendo 316 deles de coinfeção por HIV (OMS, 2018).

O parasito foi registrado pela primeira vez em estudo pelo oficial médico do exército britânico Sir William Leishman em 1903 (LEISHMAN, 1903). Mais de 20 espécies do parasito podem causar infecção em humanos e são transmitidas por aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos (CDC, 2018). Sua prevalência recobre 100 países em 5 continentes com exceção da Antártica, sendo em sua maioria países pouco desenvolvidos e em desenvolvimento (OMS, 2010; ALVAR, 2012; BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018).

A globalização permitiu a comunicação entre os países e a exposição dos viajantes a lugares, onde ocorre a doença, contribuindo assim para a introdução do parasito a áreas não endêmicas (HARMS et al., 2003). Outro fator que favorece o aumento da doença, é o crescimento populacional exponencial com conseqüente urbanização de zonas de mata (DESJEUX, 1996). O parasito possui um grande número de hospedeiros e reservatórios com um ciclo selvagem bem estabelecido. A urbanização de zonas rurais introduz o homem nesse meio e a pobreza associada às condições precárias de saúde e má nutrição levam a baixa imunidade, somada a uma ausência de campanhas de conscientização e o controle do vetor, assim como migrações para áreas de riscos associadas a jornadas de trabalho e militarismo formam os chamados fatores de risco da leishmaniose (DESJEUX, 1996; PAVLI; MALTEZOU, 2010).

O vetor são insetos dípteros da família Psychodidae, gênero *Phlebotomine*. Um inseto exíguo (2-3mm), mas com 30 espécies capazes de transmitir a doença (LANE, 1993). Na fase adulta sua fonte principal de energia são néctares e açúcares proveniente de plantas. Um estudo interessante feito por Abbasi et. al. (2018) correlaciona a flora local com a densidade e distribuição desses insetos. Aparentemente os insetos adultos se alimentam preferencialmente de *Cannabis sativa*, mesmo em locais onde a planta é escassa. O autor sugere que essa predileção ocorre devido à grande percentagem de indivíduos, que se alimentaram dessa espécie de planta, conforme detectado através do teste de PCR.

Uma vez fecundadas, as fêmeas mudam seus hábitos alimentares e procuram sangue de mamíferos para nutrir os ovos (LEHANE et. al., 2005). A prática da hematofagia as diferenciam dos machos, assim como, sua morfologia com uma probóscide maior e aparato bucal denominado cibário para o repasto sanguíneo (RANGEL et. al., 1986). Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas pode ingerir macrófagos infectados ou amastigotas recentemente liberadas pelas células lisadas de mamíferos infectados. A saliva desses artrópodes possui substâncias com atividade biológica, que favorecem a sua própria alimentação (CHARLAB et. al. 1999). Uma vez identificadas, já foram isoladas moléculas com propriedades farmacológicas, que podem ser cruciais para o estabelecimento da infecção, como pontuado por Gomes et al. (2012) onde demonstraram que a vacinação de camundongos com a proteína recombinante rLJM11 da saliva de *Lutzomyia longipalpis* confere imunidade contra *Leishmania major* via ativação de células TCD4+.

Esses protozoários ao chegarem no trato digestivo sofrem sucessivas modificações morfológicas e bioquímicas. O parasito apresenta duas formas de vida: As formas amastigotas, que são encontradas no hospedeiro vertebrado e se caracterizam por serem arredondadas e com flagelo vestigial, obrigatoriamente intracelular e as formas promastigotas, extracelulares, alongadas e flageladas encontradas no inseto–vetor (BATES, 2007).

Após o repasto sanguíneo, o sangue ingerido é envolto em uma matriz peritrófica composto por proteínas e quitina secretados pelas próprias células do intestino. Dentro desse “saco” as formas amastigotas se transformam em formas promastigotas procíclicas, multiplicando-se intensamente. Antes da completa digestão do sangue, os parasitos agora denominados nectomonas, rompem a matriz permitindo o contato do parasito com o epitélio intestinal, onde aderem através do flagelo nas microvilosidades do intestino médio, evitando que sejam posteriormente eliminados (MORAES et. al., 2018; BATES, 2007). As nectomonas migram para a porção torácica por quimiotaxia do intestino médio e lá se dividem em populações, que se diferenciarão em formas haptomonas, leptomonas e metacíclicos (MORAES et. al., 2018). Haptomonas são as que mais se encontram na válvula estomodeu bloqueando essa estrutura (PIMENTA, SECUNDINO & BLANCO, 2003; KAMHAWI, 2006). Leptomonas são altamente replicativas e produzem o gel secretório das promastigotas (PGS) (BATES; ROGERS, 2004). As formas metacíclicas surgem no intestino anterior ou atrás da válvula estomodeu, podem ser originadas também das leptomonas e são demasiadamente infectivas (BATES; ROGERS, 2004). Uma segunda alimentação sanguínea desses insetos parece aumentar o número de parasitos metacíclicos na probóscide, tornando esses vetores mais eficientes em transmitir a doença. Aparentemente, as metacíclicas se “desdiferenciam” em formas semelhantes a leptomonas, denominadas por Serafim et. al. (2018) de retroleptomonas, que se multiplicarão novamente e darão origem a uma quantidade ainda maior de metacíclicas (SERAFIM et. al., 2018).

O PGS juntamente com a alta carga parasitária bloqueiam a passagem de sangue pela válvula estomodeu, forçando o inseto a regurgitar essa mistura e conseqüentemente as formas metacíclicas (SCHLEIN, JACOBSON & MESSER, 1992). O número de parasitos inoculados

não pode ser muito alto, caso contrário o sistema imune é ativado (VAN ZANDBERGEN et. al., 2006). Foi sugerido que entre as formas metacíclicas, parte dessas células entram em apoptose e são regurgitadas juntamente com uma porção de metacíclicos vivos, dessa forma há uma diminuição da resposta inflamatória, o que permite o estabelecimento do parasito (WANDERLEY et. al., 2013).

As primeiras células a reconhecerem o parasito são os neutrófilos, que produzem citocinas e quimiocinas, promovendo o recrutamento de outras células para o sítio de infecção (PETERS et. al. 2008). Eles não são capazes de conter a infecção; o parasito induz a célula a entrar em estado apoptótico, que ao serem fagocitados por macrófagos e células dendríticas se tornam verdadeiros “Cavalos de Tróia”, cheios de parasitos, facilitando a infecção do mesmo (RIBEIRO-GOMES et. al., 2012; VAN ZANDBERGEN et. al., 2004).

Os macrófagos são as células hospedeiras preferenciais desses parasitos. Elas interagem com as promastigotas através do flagelo, que são rapidamente fagocitadas pela célula imune (ROTUREAU et. al., 2009). Alguns parasitos serão degradados e seus antígenos apresentados através da molécula MHC II aos linfócitos T CD4, outros irão evadir os mecanismos microbicidas do fagossomo (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012). O perfil de resposta predominante dessa interação pode ser crucial para a resolução da infecção. Um perfil Th1 leva a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-12, IL-18 e IL-27, produção de IFN- γ , TNF- α , ROS, NO. Já um perfil Th2 leva a produção de IL4, IL10, TGF-B e diminuição de NO (TACCHINI-COTTIER, WEINKOPFF & LAUNOIS 2012). Um balanço entre essas duas respostas parece ser a chave para a elucidação da doença. O parasito se divide por fissão binária até conseguir lisar o macrófago e assim conseguir infectar novas células (REAL et al., 2014). O ciclo se fecha quando o flebotomíneo fêmea for fazer outra alimentação sanguínea em um hospedeiro vertebrado, perpetuando a doença (**Figura 2**).

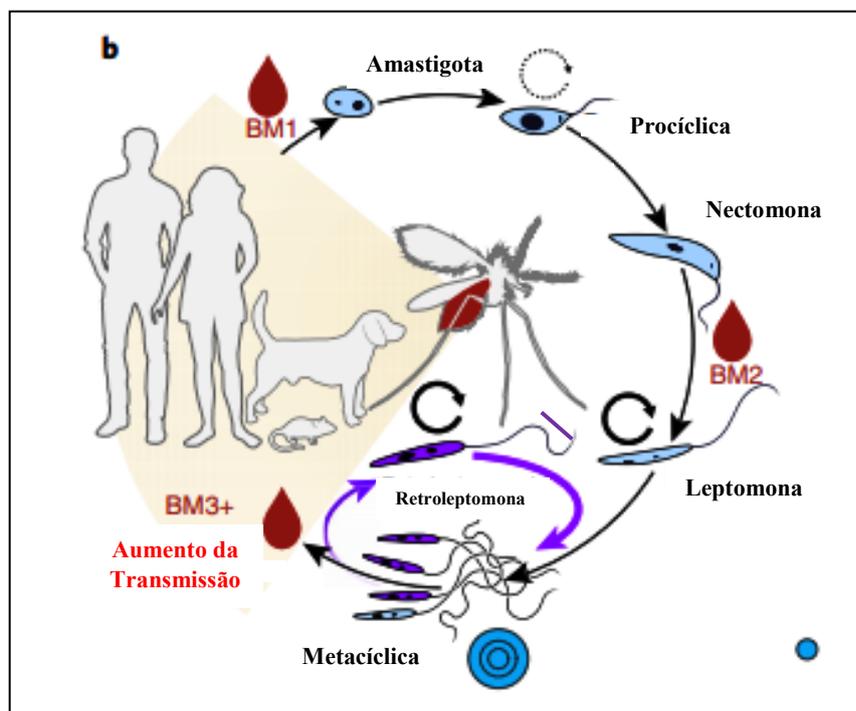


Figura 2. Ciclo Biológico da *Leishmania sp.* Serafim et. al., 2018.

2.3. IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA

Em humanos o chamado complexo *Leishmania donovani* são responsáveis pela forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). A maioria das doenças zoonóticas emergentes apresentam origem no meio selvagem. A urbanização em áreas de antiga mata abre espaço para a introdução do homem e animais domésticos no ciclo da doença (JONES et al., 2008). Vetores mais generalistas facilmente são afetados por essa dinâmica ecológica, aumentando o número de reservatórios e hospedeiros, principalmente para artrópodes hematófagos transmissores de doenças (HOLLINGSWORTH et al., 2015).

No ambiente periurbano o cão é um importante reservatório. Em áreas endêmicas aproximadamente 10% da população canina apresentará sorologia para o parasito, podendo variar bastante o percentual de cães (REGUERA et. al., 2016). No Brasil esse número pode chegar a incríveis 60% em algumas regiões (FREITAS et al., 2010). Na região Nordeste do país há uma grande circulação do parasito entre cães domésticos (SILVA R et. al., 2018) e estudos demonstraram a correlação de casos de leishmaniose canina sobrepondo os casos de leishmaniose humana (COSTA D. et. al., 2018). Entretanto, o parasito pode circular também em carnívoros, lagomorfos e mustelídeos (MILLÁN, FERROGLIO & SOLANO-GALLEGO, 2014). A circulação do parasito é inevitável, há casos de cepas identificadas em humanos isoladas em lebres (GARCÍA et al., 2014). Assim como, pequenos roedores frequentemente demonstraram ser reservatórios alternativos de *L. infantum* e *L. tropica*. (ECHCHAKERY et. al., 2017).

Cães que desenvolvem leishmaniose visceral canina (LVC) são afligidos principalmente pela espécie *L. infantum* e se tornam reservatórios da doença. O ciclo se torna então zoonótico com potencial fatal para ambas as espécies (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). A grande maioria dos cães pode estar infectado e não demonstrar sintomas, sendo necessários testes sorológicos associados a ensaios de PCR, para uma diagnose eficaz em distinguir os animais assintomáticos dos sintomáticos (SABZEVARI et. al., 2017). Os sintomas mais comuns são linfadenopatia, perda de peso, caquexia com perda de movimentos, conjuntivite, hiperqueratose (produção excessiva de queratina no focinho ou patas), dermatites associado ou não com alopecia (perda de pêlo), onicogribose (crescimento das unhas), além do comprometimento dos órgãos linfoides baço e fígado (LOPES et al., 2018) **(Figura 3)**.



BANETH et al., 2008

Figura 3. Sinais clínicos da leishmaniose canina. (a) ceratoconjuntivite; (b) lesão facial com dermatite esfoliativa; (c) epistaxe; (d) onicogribose; (e) lesão ulcerativa. Baneth e colaboradores (2008).

Mesmo dentro de uma residência esses animais podem ser expostos ao inseto vetor e a outros ectoparasitos como carrapatos e pulgas, que também se alimentam de sangue (COLOMBO et. al., 2011). Estudos relatam a presença de material genético de *Leishmania* em diferentes órgãos de carrapatos, mas nada conclusivo em relação a possível transmissão por meio destes (VIOL et. al., 2016; RAKHSHANPOUR et. al., 2017). Casos de transmissão por transfusão sanguínea e venérea já foram relatados (OWENS et al., 2001; SILVA et al., 2009).

Além dos cães, gatos também compartilham o peridomicílio com humanos podendo muitas vezes estar sujeitos à infecção (COURA et. al., 2018; DI MATTIA et. al., 2018). As espécies *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* *L. amazonensis* e *L. infantum* já foram encontradas em trabalhos com estudos de casos e a via de transmissão do parasito gato-flebotomíneo foi comprovada em laboratório utilizando-se animais naturalmente infectados (PENNISI et. al., 2015; MAROLI et. al. 2007). Em regiões que apresentam foco de leishmaniose, a soroprevalência pode chegar a 68.5 % e as análises moleculares a 60,7% para *Leishmania* nesses animais. Os sintomas mais comuns são lesões cutâneas no focinho, lábios, orelhas e pálpebras aumento dos linfonodos e alopecia, porém como os cães, alguns podem ser assintomáticos (PENNISI et. al., 2015) (**Figura 4**). Entretanto, não há estudos suficientes que demonstrem o papel desse animal como um hospedeiro alternativo (MAIA; CAMPINO, 2011). Acredita-se que esses animais possuam resistência, quando imunocompetentes são capazes de controlar a doença. (SOLANO- GALLEGO, 2007).



Figura 4. Imagens obtidas do estudo de caso de leishmaniose felina por *Leishmania amazonensis* em Ribas do Rio Pardo, MS, Brasil; (A) Ulcerações no nariz e (B) Nódulos na orelha retirado de Souza e colaboradores (2009).

Desde a sua criação, o programa Nacional de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral enfrenta vários problemas ao implementar suas medidas de ação (COSTA C. 2011, ROMERO; BOELAERT, 2010). O guia do Ministério da Saúde do Brasil pontua 3 estratégias para o controle da LV: Diagnósticos prévio e tratamento dos casos humanos, redução da população do flebotomíneo vetor e eliminação do reservatório doméstico. Entretanto, essas estratégias não parecem surtir o efeito desejado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; COSTA C. 2011).

Em casos de soropositividade confirmada para os cães, o governo estipula a eutanásia do animal infectado. Se pensarmos no ponto de vista prático o uso de inseticidas para conter a capacidade vetorial do flebotomíneo somado ao sacrifício dos animais, que contribuem para a manutenção do ciclo, são soluções que de fato podem ser promissoras (DYE, 1996). No entanto, somente o abatimento parece funcionar minimamente, prevenindo entre 20%-50% a incidência de casos em humanos dependendo do ensaio utilizado no estudo (WERNECK et al., 2014; ROMERO; BOELART 2010). Essa medida divide opiniões no quesito ético, pois o número de casos não está diminuindo e continua se espalhando pelo país (COSTA C., 2011; MACHADO et al., 2016).

Apesar de não ser uma medida de controle epidemiológico, os estudos apontam a eficácia do uso de coleiras com deltametrina (COURTNAY et al., 2009). Na área endêmica de Governador Valadares (MG) Coura-vital et al. (2018) conseguiram reduzir em 48% a incidência da infecção canina através do uso dos colares.

A vacinação profilática dos animais auxilia na prevenção da infecção (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012; GRADONI, 2015). A resposta imunológica estimulada pela vacinação é crucial para a proteção do animal. Cães assintomáticos tem uma boa resposta imunológica com produção de citocinas TNF- α , IL-2, IL-12 e IFN- γ pelas células TCD4+, produção de NO e ROS, além de participação de células TCD8+ (STRAUSS-AYALI et al., 2005; e VITORIANO-SOUZA et al., 2013). Os sintomáticos apresentam uma mistura de citocinas TH1 e TH2 como IL-4, IL5, IL-10, IL-13 e TGF- β , mas tendem mais para uma resposta anti-

inflamatória (BARBOSA et al., 2011; CARRILLO; MORENO, 2009). O uso de adjuvantes como esqueleto celulares (Monophosphoryl-lipid A+ Trehalose dicorynomycolate + cell wall skeleton - MPL® + TDM + CWS), saponina e hidróxido de alumínio ajudam na resposta protetora (TROTТА et al., 2010; POOT et al., 2009).

Comercialmente a Leish-tec® foi licenciada no Brasil em 2013 no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o número 9270. A vacina aposta na combinação do antígeno A2 presente em amastigotas de *L. donovani* e saponina para induzir uma resposta protetora do tipo TH1 nos animais (FERNANDES et. al., 2008). A vacina tem eficácia de 96% e não afeta os resultados dos exames sorológicos para detecção da doença. A primeira dose da vacina deve ser feita em 3 etapas com 21 dias de intervalos a partir dos 4 meses de idade pelo veterinário, depois a aplicação se torna anual. Somente animais assintomáticos com sorologia negativa podem receber a vacina (<http://leishtec.com.br/> acessado em 01/2019).

A vacina europeia Letifend® é administrada em dose única em nível profilático a partir dos 6 meses de idade para amenizar os sinais clínicos do indivíduo após uma exposição ao parasito. O processo de imunização se inicia 4 meses após a vacinação e tem duração de 1 ano (EMA, 2017). O componente antigênico, proteína Q, é uma quimera genética resultado da associação de epítomos das proteínas ribossômicas LiP2a, LiP2b e LiP0 e da histona H2A de *L. infantum*, mas sem adição de adjuvantes ou interferência nos testes diagnósticos (CARCELEN et. al., 2009; COTRINA et. al. 2018). O estudo de Cotrina et. al. (2018) afirma que a vacina é segura para o uso em cães de áreas endêmicas independente da raça, peso ou idade e até mesmo em animais soropositivos com poucos efeitos colaterais e 72% de eficácia.

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O termo Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) abrange as manifestações que afetam a pele e ocorrem no continente americano agrupando-se majoritariamente na América do sul (PAHO, 2018). No Brasil dentre as principais espécies causadoras da LTA destacam-se: *L. (V) braziliensis* encontrada em todo território nacional e considerada a primeira identificada como agente etiológico, *L. (L) amazonensis* encontrada no Nordeste (Bahia), Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro -Oeste (Goiás) e Sul (Paraná) e *Leishmania (Viannia) guyanensi* na Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A gravidade da infecção vai depender da resposta imunológica do hospedeiro, idade, saúde, genética, carga parasitária, infectividade da cepa e a espécie inoculada (CASTELLUCCI et. al., 2012, 2014; ABDELADHIM, KAMHAWI e VALENZUELA, 2014). As diferentes espécies de *Leishmania* e suas manifestações estão listadas na **Figura 5**.

Na leishmaniose cutânea (LC) ou leishmaniose cutânea localizada (LCL) no sítio onde o flebotomíneo infectado pica para fazer seu repasto sanguíneo irá se desenvolver uma lesão única e ulcerada com bordas endurecidas, indolores, mas geralmente pode apresentar uma cura lenta e com cicatrização de forma espontânea (PEARSON; SOUZA, 1996) (**Figura 6A**). Ainda assim, a região poderá conter parasitos ou ainda resquícios de material genético por anos, mesmo nos casos em que o paciente tenha completado o tratamento (SCHUBACH et. al., 1998a-b). Normalmente, os pacientes demonstram uma mistura de perfis imunológicos do tipo TH1 e TH2 trabalhando em equilíbrio, que contribuem para o controle da infecção (CASTELLANO et. al., 2009; OLIVEIRA et. al., 2014). Dentre as citocinas observa-se aumento no IL-1β; IL8, iNOS, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) CXCL9, CXCL

10 e grande atividade da enzima arginase dos macrófagos no local da lesão (ABEBE et. al., 2012; KUMAR et. al., 2007; NOVAIS et. al., 2015), já os linfócitos T produzem TNF- α , IFN γ , IL-10, TGF- β (MELBY et. al., 1994; HEJAZI et. al., 2012).

A Leishmaniose Mucosa (LM) em áreas endêmicas acomete ente 1-10% dos pacientes com LC (**Figura 6B**). O desenvolvimento dessa forma da doença pode se apresentar anos após a LC, em outros casos pode ocorrer em concomitante (MARSDEN, 1990). A espécie *L. braziliensis* do Novo Mundo causa a maioria dos casos, por isso a maior incidência está localizada nas Américas (AMATO et. al., 2008). As lesões são encontradas de formas metásticas na região da face comprometendo a área da mucosa nasal, palato, faringe, laringe, lábios, bochecha, traqueia até mesmo incomumente a genitália, levando desfiguração do rosto devido a destruição tecidual (PEARSON;SOUZA, 1996). O balanço anteriormente visto na resposta inflamatória de LC agora tende para a resposta exacerbada de TH1 com alta produção de TNF- α e IFN γ e declínio de IL-10, no entanto a parasitemia é baixa (RIDLEY, DE MAGALHAES & MARSDEN, 1989; BACELLAR et. al., 2002). O tratamento é penoso, sendo indispensável à utilização de drogas de segunda escolha (AMATO et. al., 2007, LESSA et al., 2001).

As lesões ulceradas podem se espalhar numerosamente para outras áreas do corpo com pápulas e formas nodulares levando ao desenvolvimento da chamada Leishmaniose Disseminada (LD) (**Figura 6C**) (HASHIGUCHI et al., 2016; TURETZ et al., 2002). O desenvolvimento é mais rápido que da LM, transcorrendo em semanas ou dias e o tratamento leva mais tempo (CARVALHO et. al., 1994; TURETZ et al., 2002; MACHADO et. al., 2011; HASHIGUCHI et al., 2016). A dispersão da infecção pode estar associada com a virulência da cepa inoculada (GAZE et. al., 2006). Na lesão, os linfócitos produzem níveis de citocinas TH1 semelhante ao visto em LC, mas ao chegar no sangue periférico o nível dessas citocinas são insignificantes (MACHADO et. al., 2011).

Diferente da forma disseminada, as lesões da leishmaniose cutânea difusa ou anérgica não ulceram, se encontram somente pápulas nodulares (**Figura 6D**). Como o próprio nome diz há ausência de resposta de imunológica, que resulta em um número grande de macrófagos infectados e abundantes em amastigotas (GOTO; LINDOSO 2010). As células produzem menos IFN- γ , iNOS, e IL-12 (DÍAZ et. al., 2006) e não tem uma resposta específica ao antígeno de modo que o tratamento frequentemente falha e em decorrência disso a doença pode retornar (ZERPA et. al., 2007; CALVOPINA et. al., 2006). Um caso reportado de um paciente submetido a imunoterapia com vacinas monovalentes com antígenos de *Leishmania* + *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) aumentaram o número de monócitos pro-inflamatórios e células NK e o efeito na diminuição da carga parasitária foi bem sucedido (PEREIRA et. al., 2009).

Na Leishmaniose Visceral (LV), o paciente exibe esplenomegalia, febre, pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e perda de peso. Após a inoculação, o período de incubação varia entre 2 semanas e 8 meses ocorrendo reações imunológicas nas vísceras (BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018) (**Figura 6E**). Os sintomas se desenvolvem oportunamente em uma queda da imunidade, mas podem levar anos para se desenvolver. Os pacientes apresentam sintomas de infecção sistêmica persistente como febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso. Além dos sintomas associados com a infecção nos órgãos alvo como aumento do tamanho do fígado e do baço (hepato e esplenomegalia) (MURRAY, 2004). Dependendo da idade a fatalidade ocorre entre 30 dias à 2 anos, caso não haja tratamento adequado (READY, 2014). Novamente, temos alta produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (GHALIB et. al., 1993), diminuição de INF- γ (CARVALHO et. al., 1992), além de células T não reativas ao antígeno de *L. donovani* (SAHA et. al., 2007). Os macrófagos

saturados de parasitos caem no sistema retículo endotelial e alcançam o baço, fígado e medula óssea causando uma imunossupressão e permitindo infecções secundárias (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Casos de coinfeção *Leishmania*-HIV vem crescendo na Europa, Brasil, Índia (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2011; BURZA, MAHAJAN & SANZ, 2014) e Etiópia (YIMER et. al. 2014). Ambas as doenças afetam células mononucleares fagocíticas acelerando o quadro de imunossupressão e contribuindo para viremia e parasitemia (LINDOSO et. al., 2018).

Em países como Sudão, Etiópia, Quênia, Índia, Nepal e Bangladesh após meses ou anos do tratamento da leishmaniose visceral ou mesmo durante a infecção, o paciente pode manifestar a chamada Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar (PKDL) (ZIJLSTRA et. al., 2003) (**Figura 6F**). A lesões variam de maculosa, maculopapular, eritema até formarem placas na pele (ZIJLSTRA et. al., 2003; RAMESH; MUKHERJEE, 1995). Alguns pacientes podem ter cura espontânea ou necessitar de um novo tratamento dependendo da carga parasitária (MUSA et. al., 2002; GIRGLA et. al., 1977; EL HASSAN et. al., 1992). Acredita-se que esses indivíduos sirvam como reservatórios de ciclo antroponótico da doença (MALAVIYA et. al., 2011). Pacientes soropositivos tem um maior risco de desenvolver essa forma da doença, principalmente em áreas endêmicas (RITMEIJER et. al., 2001).

Síndrome Clínica	Espécies	Manifestações Clínicas
Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)	<i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (L.) infantum</i> <i>L. (L.) donovani</i>	Lesões unicas e em numero limitado; ulcerados secos ou úmidos com bordas crateriformes. Carga parasitaria moderada
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	Lesões com inflamação alta envolvendo membranas mucosas, pode desconfigurar o rosto. Poucos parasitas presentes nas lesões.
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (V.) pifanoi</i> <i>L. (L.) aethiopica</i> <i>L. (L.) major</i>	Lesões múltiplas, disseminadas, nódulos não-ulcerados. Alta carga parasitária (anergia)
Leishmaniose Disseminada	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamanensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	Papulas numerosas; lesões acneiformes em 2 ou mais áreas do corpo, geralmente envolve a região da mucosa. Lesões com poucos parasitas
Leishmaniose Dermal Pós-calazar (PKDL)	<i>L. (L.) donovani</i>	Erupções nodulares, maculopapulares ou maculares hipopigmentadas. Parasitas presentes nas lesões
Leishmaniose Visceral	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) infantum</i>	febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso hepatomegalia e esplenomegalia

Figura 5. Principais manifestações clínicas das leishmanioses e suas respectivas espécies etiológicas. (adaptado de Ready, 2014 e Scorza, Carvalho & Wilson, 2017).



Figura 6. Manifestações Clínicas da Leishmaniose: A- Leishmaniose Cutânea; B- Leishmaniose Mucocutânea; C- Leishmaniose Disseminada; D- Leishmaniose Difusa; E- Leishmaniose Visceral; F- Pós-Kalazar. Fontes: https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/ e Atlas didático Ciclo da *Leishmania* (Teixeira et. al. 2013).

2.5 TRATAMENTOS

Os órgãos de saúde dividem os fármacos entre os pertencentes ao grupo de primeira e segunda escolha, mas essas distinções vem decaindo ao longo dos anos em algumas regiões predominantemente endêmicas, devido aos casos de resistência. Assim os fármacos são prescritos de acordo com a terapia, que melhor se aplica à região (JHA, 2006; SUNDAR et. al. 2008). Suas respectivas estruturas moleculares estão representadas na **Tabela 1**.

2.5.1 ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

Foram os primeiros fármacos utilizados para leishmaniose a partir de 1912 pelo brasileiro Gaspar Vianna após um estudo com tripanossomos, onde observou que os parasitos eram sensíveis a formulações trivalentes dos antimoniais (tártaro III ou tártaro emético) (VIANNA, 1912). A doença na época levava a óbito em 90% dos casos (CROFT; YARDLEY, 2002). Apesar do sucesso nos países endêmicos com aumento da sobrevivência dos pacientes, inclusive daqueles diagnosticados com a forma visceral da doença, esta fórmula era extremamente tóxica. Dessa forma foram desenvolvidas modificações para formas pentavalentes (Sb(V), menos tóxicas e que são usadas a mais de 90 anos no tratamento (FRÉZARD, DEMICHELI & RIBEIRO, 2009).

Essa estrutura é considerada um pró-fármaco, uma vez que ela é reduzida em uma forma trivalente mais ativa dentro do organismo (SHAKED-MISHAN et. al., 2001). Acredita-se que no interior dos fagolisossomos, agora na forma de trivalentes ativos, este composto interaja com biomoléculas como peptídeos, enzimas tióis e interfira no equilíbrio oxidoreduzidor, inibindo enzimas como a tripanotiona redutase (WYLLIE et al., 2004). Além disso os antimoniais atuam em nível de DNA, induzindo a fragmentação do mesmo e a inibição da DNA topoisomerase I (SERENO et. al., 2001).

São encontrados comercialmente sobre o nome comercial de Pentostam® (estibogluconato de sódio -) e Glucantime® (antimoniato de meglumina) e empregado principalmente em pacientes LC e em pacientes LV dependendo da região (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). São administrados por vias intralesional ou intravenoso. A primeira permite poucos efeitos colaterais e uma concentração maior da substância no local da úlcera, mas em casos onde há metástase não surte muito efeito (PALUMBO, 2010). São necessários de 2-5 doses de 1-3 mL a cada 5-7 dias (ASTE et. al., 1998). Na dose intravenosa são necessários 20 mg de Sb/kg/dia por 30 dias com conseqüente dores intramusculares, náuseas, vômitos, fraqueza e mialgia, cólicas abdominais, diarreia, erupções cutâneas hepatotoxicidade, pancreatite e o mais grave cardiotoxicidade (BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018).

Devido aos efeitos colaterais, há crescente abandono do tratamento, o que acarreta o aparecimento de cepas resistentes e ausência de resposta do paciente aos medicamentos em 60% dos casos (SUNDAR et. al., 2000). Há quase 20 anos não se utiliza mais os antimoniais pentavalentes na Índia (JHA, 2006). No entanto, existem estudos tentando resgatar esses fármacos associando-os a lipossomas (ORTEGA, GIORGIO & DE PAULA, 2017) e em regimes de combinação terapêutica.

2.5.2 ANFOTERICINA-B

Primeiramente empregado como antifúngico, a anfotericina (AmB) é um tratamento alternativo para a leishmaniose, quando há resistência aos antimoniais (SARAVOLATZ et. al., 2006). *Leishmania* apresenta como esterois 24-metilados majoritários o 5-dihidroepisterol e episterol compondo a membrana lipídica (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). A anfotericina se liga facilmente a esses lipídios, produzindo canais transmembrana que levam ao aumento de permeabilidade da membrana, seguido de lise celular (PAILA, SAHA & CHATTOPADHYAY, 2010).

A administração é feita nas clínicas hospitalares por via intravenosa. Em pacientes com VL são receitados 0.75–1 mg/kg por dia diariamente ou em dias alternados com 15 a 20 doses. Mas esses números podem variar e o tratamento se estender (BURZA, CROFT & BOELAERT, 2018). O fármaco é hidrofóbico sendo diluído em micelas de desoxicolato (fungizona). A fragilidade da composição permite o acúmulo do composto nas células renais e uma vez nesse órgão aumentam a concentração de sais e Ca^{+} e facilita a saída de ions H^{+} , o que interfere no gradiente iônico ocorrendo a apoptose da célula (SINGH, KUMAR & SINGH, 2012). Seus efeitos colaterais incluem febre, resfriado, nefrotoxicidade, hipocalcemia e miocardite. É altamente tóxica podendo levar a morte do paciente (GHORBANI; FARHOUDI, 2018).

Como solução para a alta toxicidade, foi desenvolvido uma formulação lipossomal LAmB (AmBisome®) capaz de tornar o tratamento mais tolerável. São vesículas de camada simples única compostas por fosfatidilcolina, diestearil fosfatidilglicerol e colesterol contendo em seu interior moléculas de anfotericina (ADLER-MOORE; PROFFITT, 2002). Essa junção maximiza a atividade do compostos, além de diminuir a toxicidade e o tempo de tratamento (WASAN et. al., 2010). Na dosagem recomendada pela OMS (20 mg/kg) permite uma cura de mais de 90% em LC e LV (SUNDAR; SINGH 2016).

Apesar das inúmeras vantagens desse medicamento, ele implica em um tratamento extremamente caro, o que inviabiliza a obtenção desse produto em países pouco desenvolvidos, onde se encontra as maiores parcelas de casos da doença (BALASEGARAM et. al., 2012). Contudo, existem programas de doação, que estão sendo empregados pela OMS, em alguns países endêmicos como a Índia, visando ampliar o acesso ao medicamento (GOYAL et. al., 2018).

2.5.3 MILTEFOSINA

O análogo de alquil-fosfocolina foi o primeiro medicamento aprovado comercialmente por via oral em 2002 para o tratamento da LV na Índia (SUNDAR et. al., 2012). No país foi determinado como droga de primeira escolha pelo programa de eliminação da leishmaniose visceral (SUNDAR et. al., 2008)

O hexadecil 2-etil fosfato (Miltefosina) foi primeiramente estudado para o tratamento do câncer, mas foi interrompido na fase III devido à toxicidade gastrointestinal, no entanto estudos feitos sobre *Leishmania* demonstraram seu potencial quimioterápico (VERWEIJ et. al. 1992, SUNDAR; OLLIARO, 2007). A recuperação após o tratamento ultrapassava 90% de eficácia (SUNDAR; SINGH, 2018). Seu mecanismo de ação envolve inibição da proteína

sinalizadora Akt da via de transdução de sinal celular e altera a biossíntese de fosfolipídios e esteróis resultando na alteração da fluidez da membrana, além de modular o sistema imune (URBINA, 1997; RAKOTOMANG A, SAINT-PIERRE-CHAZALET & LOISEAU, 2005).

A dose recomendada é de 1 cápsula de 50 mg três vezes ao dia durante 28 dias. Inicialmente o paciente pode apresentar náusea, vômitos, diarreia e dor abdominal, que vão abrandando com o decorrer do tratamento. Em alguns casos pode haver hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (VÉLEZ et. al. 2010; MACHADO; PENNA, 2015).

É altamente teratogênico sendo recomendado exames de gravidez para pacientes femininos e usos de anticoncepcionais antes e após o tratamento. Outra desvantagem é seu meio tempo de vida longo (152h) no organismo, o que facilita o surgimento de cepas resistentes (SUNDAR; MURRAY, 2005). Na última década tem-se observado uma diminuição da eficácia, resultando no aumento do número de casos recidivantes após 1 ano de tratamento (SUNDAR et al., 2012; BURZA et al., 2013; RIJAL et al., 2013).

2.5.4 PENTAMIDINA

O derivado sintético de diamidina começou a ser empregado em casos de recidivância de LV na década de 80 na Índia (JHA, SINGH & JHA 1991). Atualmente se utiliza para tratamento de LC (NEVES et. al., 2011) e em casos de resistência a outros tratamentos com 84-95% de sucesso (PAULA et. al., 2003; ROUSSEL et. al., 2006; AMATO et. al., 2009). Em pacientes com coinfeção *Leishmania*-HIV, ele é administrado como tratamento profilático secundário (DIRO et al. 2015). Na Guiana Francesa, ele é utilizado como fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose cutânea (DE MENEZES et al., 2015).

Para o tratamento é utilizado, uma dose intravenosa ou intramuscular de 3-4 mg/kg em dias alternativos. O uso de 3-4 doses tem efeitos similares aos antimoniais pentavalentes (NEVES et. al. 2011). O fármaco penetra no parasito por transportadores de arginina e poliamina alterando sua síntese e posteriormente inibindo ambos, o que reflete na diminuição do crescimento do parasito (BASSELIN, COOMBS & BARRETT, 2000; AMATO et. al., 1998). Também interage com k-DNA através da topoisomerase II diminuindo o potencial mitocondrial (CORTÁZAR, COOMBS & WALKER, 2007; SINGH; DEY; 2007).

Os principais efeitos colaterais são dor, endurecimento e abscessos no local da inoculação, bem como náuseas, vômitos, tonturas, adinamia, mialgia, cefaleia, hipotensão e síncope (SUNDAR; SINGH, 2016). Contudo, o maior obstáculo do uso da pentamidina são as chances de desenvolvimento de diabetes mellitus devido às oscilações de glicose no sangue ou ação direta nas células produtoras de insulina (SINGH et. al. 2014).

2.5.5 PAROMOMICINA

Esse antibiótico aminoglicosídeo (Humatin[®]) de amplo espectro interfere na síntese ribossômica (16S RNA) e na respiração celular do parasito (CHAWLA et al., 2011). Isolado da bactéria *Streptomyces rimosus var. paromomycinus*, foi utilizado pela primeira vez em 2002 para o tratamento de leishmanioses e 4 anos depois foi aprovado pelo governo Indiano para tratar LV (SUNDAR et al., 2014).

O Humatin pode ser administrado por via intramuscular para LV ou manuseado como uso tópico para LC. A dosagem intramuscular varia entre 10-20 mg/kg⁻¹ durante 21 dias (podendo chegar a 95% de cura) (SUNDAR et al., 2007; JAMIL et al., 2015). Os efeitos colaterais são leves, mas pode desenvolver toxicidade hepática e perda de audição (FURONES, GALLEGO & ASENSI-DIEZ, 2017; SUNDAR; SINGH, 2018).

É um dos tratamentos que apresenta maiores vantagens pela boa eficácia, baixo custo e poucos efeitos colaterais (WIWANITKIT, 2012). Contudo, seu uso isolado aumentam as chances de cepas resistentes. A via parental por outro lado, é um inconveniente no tratamento para LV e em 35.4% dos casos de PKDVL, o tratamento não é efetivo (SUNDAR et al., 2014).

2.5.6 IMIQUIMODE

O Imiquimode faz parte dos imidazoquinolina, uma classe de fármacos imunomoduladores (BENNETT, DOLIN & BLASER 2014). Essa molécula atua no sistema imunológico via receptores Toll- Like 7 e 8 (TRL's 8/9) nas células apresentadoras de antígeno e induz a produção de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-12 o que estimula uma resposta Th1 (HEMMI et. al., 2002; TOMAI et. al. 2007). Seu uso tópico em creme a 5% é aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) no tratamento de verrugas vaginais e câncer de pele com efeitos adversos limitados a irritações moderada na pele (EDWARDS, 2000; EEDY, 2002).

No final da década de 90 um estudo clínico *in vitro* e *in vivo* demonstrou seu potencial para o tratamento da leishmaniose. O autor observa aumento na atividade anti-*Leishmania* dos macrófagos assim como aumento da produção de NO (BUATES; MATLASHEWSKI, 1999). Em combinação com antimoniais pentavalentes funciona como um adjuvante, obtendo-se uma cura de mais de 90% nos pacientes LC (MIRANDA-VERÁSTEGUI et. al., 2009; FIROOZ et. al., 2006). No entanto, seu uso sozinho a 5% parece não ter efeito (MEYMANDI et. al., 2011; AREVALO et. al. 2007).

2.5.7 FEXINIDAZOLE

Esse nitroimidazol (1-methyl-2-((p-(methylthio)- phenoxy)methyl)-5-nitroimidazole) foi desenvolvido inicialmente como antimicrobiano de amplo espectro nos anos 1970, tendo sua atividade contra *Tripanossoma* descoberto no início dos anos 80 (WINKELMANN; RAETHER, 1980; JENNINGS; URQUHART, 1983). Recentemente, a DNDi resgatou esse fármaco como potencial candidato ao tratamento da *Tripanossomíase Humana Africana* (HAT - doença do sono) (TORREELE et. al. 2010).

Atua como um pró-fármaco sendo reduzido por enzimas nitroredutases presentes em bactérias e *Tripanossoma* (HALL; BOT & WILKINSON, 2011). Essa reação gera espécies citotóxicas causando assim dano lipídico e proteico, além de comprometer o DNA (RAETHER; HÄNEL, 2003). A *Leishmania* contém em seu genoma um gene homólogo da nitroredutase que confere ao fármaco seu efeito anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo* (WYLLIE et. al. 2012). Nas células dos mamíferos o composto não apresenta genotoxicidade e é

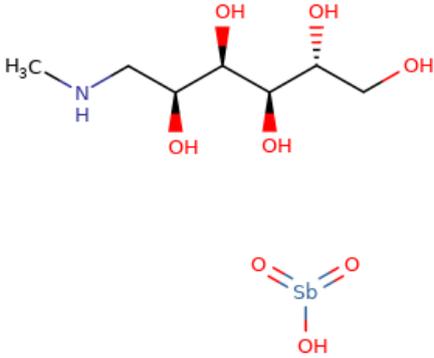
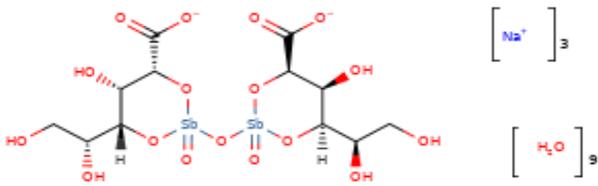
rapidamente metabolizado por via oral (TORREELE et. al. 2010; TWEATS, BOURDIN & TORREELE, 2012).

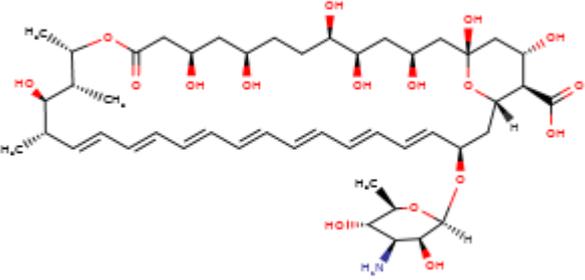
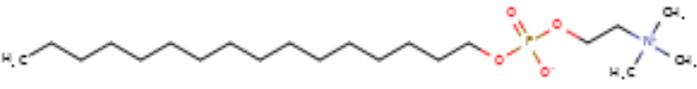
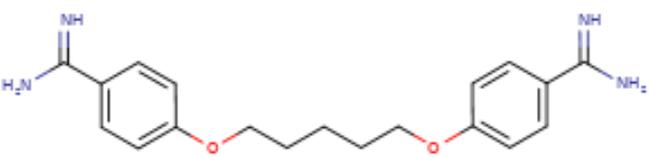
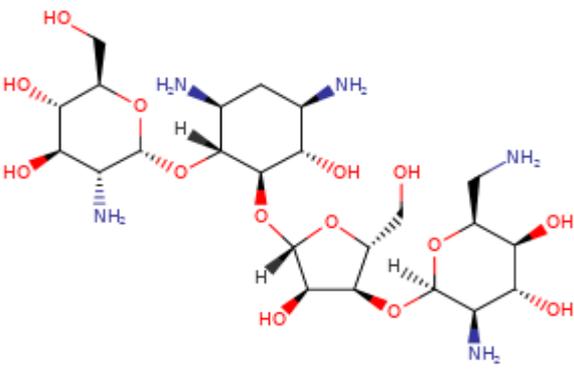
Segundos estudos em cães e camundongos o uso oral de fexinidazole é bem tolerado e em doses de 800 mg/kg/dia não se é observado efeitos colaterais (TORREELE et. al. 2010). Estudos para eficácia e seguridade em humanos em fase II/III estão em andamento, utilizando-se de 1800 mg/dia durante 4 dias seguido de 1200 mg/dia durante 6 dias para o tratamento de VL no Sudão e de pacientes em estágio tardio de HAT (DNDi clinical trials).

2.5.8 AZÓIS

Esses compostos antifúngicos atuam como inibidores de biossíntese de ergosteróis em tripanossomatídeos. O intraconazol (ITZ) e posaconazol (POSA) demonstram potencial anti-*Leishmania amazonensis in vitro* com um IC_{50/72h} de 0,44 mM e 2,74 mM para promastigotas e 0,08 mM e 1,63 mM para amastigotas intracelulares de ITZ e POZA respectivamente. As células apresentaram modificações ultraestruturais na mitocondrial relacionados a uma alteração do potencial de membrana mitocondrial, além do surgimento de autofagossomos e deformações no cinetoplasto (DE MACEDO-SILVA et. al. 2013)

Em LC acometidas por *L. mexicana* e *L. major* são utilizados os azóis comerciais fluconazol (Diflucan) e o cetoconazol (Nizoral), respectivamente. O Diflucan é administrado por via oral com 200m/kg/dia durante 6 semanas e o Nizoral também por via oral sendo 600mg/KG/dia entre 28-30 dias. Por ser uma terapia longa os pacientes precisam de acompanhamento médico com rotinas de testes de sanguíneos para assegurar a função hepáticas (MCGWIRE et. al. 2013).

	<p>Glucantime[®]</p>
	<p>Pentostam[®]</p>

 <p>The image shows the chemical structure of Amphotericin B, a polyene antifungal drug. It features a long, unsaturated hydrocarbon chain with multiple conjugated double bonds. This chain is substituted with several hydroxyl groups and a complex side chain containing a nitrogen atom and a methyl group. The structure is highly complex and characteristic of its class.</p>	<p>Amfotericina- B</p>
 <p>The image shows the chemical structure of Miltefosina, an antileishmanial drug. It consists of a long, straight hydrocarbon chain (nonyl) attached to a phosphorus atom. The phosphorus atom is also bonded to a methyl group and two chlorine atoms, forming a phosphonium salt.</p>	<p>Miltefosina</p>
 <p>The image shows the chemical structure of Pentamidina, an antileishmanial drug. It consists of two benzene rings, each substituted with an imidinoamino group (-NH=NH₂) at the para position. The two benzene rings are connected to each other via a central hexamethylene chain (-CH₂)₆ through their para positions.</p>	<p>Pentamidina</p>
 <p>The image shows the chemical structure of Paromomicina, an aminoglycoside antibiotic. It is a complex molecule composed of three linked rings: a streptidine ring, a 2-deoxystreptose ring, and a 2-deoxyadenosine ring. Each ring is substituted with various hydroxyl and amino groups, and they are interconnected by glycosidic bonds.</p>	<p>Paromomicina</p>

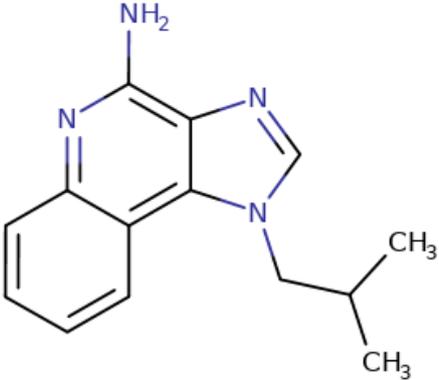
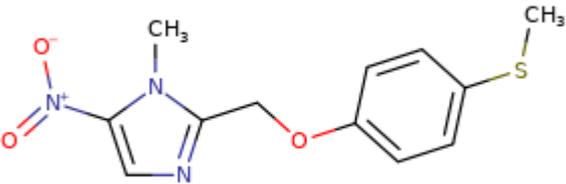
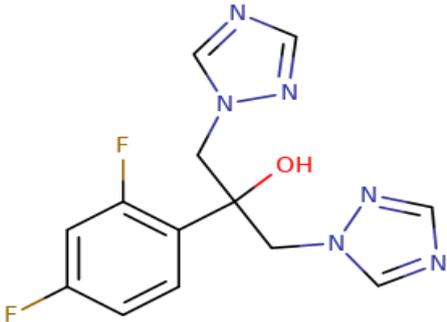
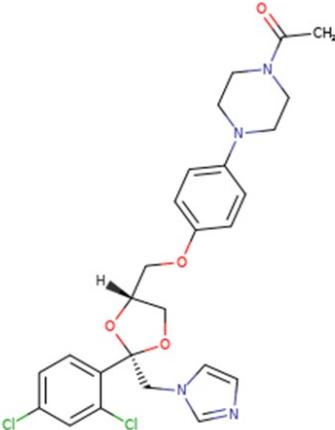
	<p>Imiquimod</p>
	<p>Fexinidazol</p>
	<p>Fluconazol</p>
	<p>Cetoconazol</p>

Tabela 1. Estruturas moleculares dos principais fármacos utilizados no tratamento das Leishmanioses.
 Fonte: <https://druginfo.nlm.nih.gov>.

Uma forma de contornar a toxicidade desses compostos é através da terapia combinada. Essa alternativa diminui o tempo de tratamento e as chances do surgimento de cepas resistentes além de reduzir o custo do tratamento. Estudos financiados pela DNDi possui algumas combinações utilizando-se Anfotericina B lipossomal-Miltefosina; Anfotericina B lipossomal-Paromomicina; Paromomicina-Miltefosina (SUNDAR et. al. 2011; GOYA et. al. 2018; DIRO et. al. 2019), Antimonias Pentavalentes- Paromomicina (MUSA et. al. 2012), Antimonias Pentavalentes- Miltefosina (WASUNNA et. al. 2016), Imiquimode-Antimonias Pentavalentes (MIRANDA-VERASTEGUI et. al. 2009) em fases avançadas de teste em pacientes infectados na Índia, África e Etiópia com resultados satisfatórios que destacam as melhorias que podem ser implementadas nesses medicamentos já existentes.

2.5.7 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CANINA

No cão são empregados os fármacos citados anteriormente em associação com outras medicações igualmente ativas. Os antimonias pentavalentes, por exemplo, são empregados juntamente com o alopurinol, e que também são o tratamento mais comum para os felinos (MATTIN et al., 2014; PENNISI et. al. 2015). Na França, Grécia, Itália, Portugal e Espanha sempre é utilizado o alopurinol seguido dos antimonias e a miltefosina, já domperidona e anfotericina são tratamentos mais raros (MATTIN et al., 2014).

A paromomicina é licenciado na Europa para manter a carga parasitológica em controle e controlar a linfadenopatia (POLI et al., 1997). Ela causa nefrotoxicidade (POLI et al., 1997) e ototoxicidade (e algumas cepas de *L. infantum* são resistentes (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; CROFT et al., 2011). A anfotericina B tem sido empregada em casos isolados de leishmaniose canina depois da OMS ter suspenso o uso veterinário (BEST et al., 2014).

O alopurinol, outra opção oral, interage com o RNA do parasito inibindo a síntese proteica (NELSON et al., 1979). É o tratamento mais utilizado em conjunto com os outros fármacos, pois sozinho é instável podendo apresentar reincidências regulares do parasito (MATTIN et al., 2014; CAVALIERO et al., 1999). Não compromete o fígado, mas pode causar disfunção renal (TORRES et al., 2011). Domperidona (benzimidazole antiemético) é uma droga de segunda escolha usada para induzir a ativação de neutrófilos nos cães (PASSOS et al., 2014), aliviando os sinais clínicos e controlando a produção de anticorpos (GÓMEZ-OCHOA et al., 2012). Os seus efeitos colaterais são leves e cessam com o fim do tratamento (SABATÉ et al., 2014). Todos os tratamentos podem e devem ser usados em combinação para garantir a saúde do animal.

No Brasil, segundo a PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008 não é permitido o tratamento de leishmaniose visceral canina com medicamentos de uso humano. Porém, por meio da Nota Técnica Conjunta do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde sob o nº 001/2016 MAPA/MS aprovaram o MILTEFORAN fornecido pela empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL como tratamento exclusivo e o único aprovado para leishmaniose canina no país. O custo do tratamento, assim como do acompanhamento médico fica de total responsabilidade e critério do dono. Este tratamento não está incluído no programa de controle da doença do governo (MINISTÉRIO DA SAÚDE E AGRICULTURA PECUÁRIA, 2016). Segundo SOTO et. al., 2007 o animal tem aumento da ativação dos macrófagos e na expansão das células T. Sua eficácia é alta em relação à diminuição da carga parasitária e melhora nos sintomas, mas ainda assim, não há completa remoção do parasito (MATEO et al., 2009) e uma pequena parcela

dos pacientes pode ter problemas gastrointestinais (ANDRADE et. al. 2011; MATEO et al., 2009). Caso o dono abandone o tratamento, a infecção pode retornar em até 6 meses (ANDRADE et. al. 2011).

2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS E O GÊNERO *Protium*

O uso de plantas na medicina rústica e tradicional é uma sabedoria muito antiga. Há evidências e registros do uso de plantas, misturas de ervas e extratos para múltiplos tratamentos já desde os primórdios da civilização humana (CRAGG & NEWMAN, 2014). Do ponto de vista da ciência moderna, os estudos laboratoriais das propriedades medicinais de vegetais datam do início do século XX (MARTINDALE 1910; HOFFMAN & EVANS 1911). Atualmente, há uma vasta literatura sobre as investigações que buscam substâncias farmacologicamente ativas (ALINA et. al. 2014).

Os óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários de natureza lipofílica produzidos pelas plantas para proteção, estresse contra herbivoria e estímulo ao processo de polinização, entre outros (KUMARI et. al. 2014; SIANI et. al. 2000; LEITNER, et. al. 2008). Os métodos convencionais de extração dos OE incluem hidrodestilação, destilação a vapor, extração por solvente ou sob pressão (EDRIS, 2007). Os óleos podem estar contidos em diferentes partes das plantas; por isso a extração pode ser feita desde a raiz até folhas e frutos (DOS SANTOS CAVANTI et al., 2015). A análise da constituição química dos OE é feita, na maioria das vezes, por cromatografia gasosa (CG) (COLLINS & BRAGA, 1998; HARRIS, 2010), ou (menos frequentemente) cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (SMELCEROVIC et. al., 2013; WASEEM & LOW, 2015). Dependendo da técnica utilizada e da origem do OE, pode-se identificar mais de 400 compostos em um único extrato. Dadas as propriedades dos OE, estes são aplicados em setores alimentício, cosmético e farmacêutico, além de aplicações agrícolas (TUREK & STINTZING et. al. 2013).

Apesar de ser uma fonte rica em substâncias, os óleos essenciais apresentam variações de composição. Vários fatores como clima, solo, genética, radiação solar, tempo de luminosidade, pH, demanda de água, tempo de coleta podem influenciar na composição e, conseqüentemente, nas ações biológicas daquele óleo. Contudo, isso pode ser contornado com o uso de culturas controladas (PECETTI et. al. 2012, JOAS et. al. 2012, HERRERO-JÁUREGUI et. al. 2011, THOMPSON & INGRAM, 2006; RIBEIRO-SANTOS, 2017). Dentre as diversas aplicações dos OE, estão a ação bactericida (SINGH et. al. 2018), antifúngica (ELSHAFIE & CAMELE, 2017), anticarcinogênica (BLOWMAN et. al. 2018), anti-inflamatória (NADJIB BOUKHATEM et. al. 2003) e antiparasitária (IZUMI et. al. 2011).

O gênero *Protium* (Tribo Potieae) é o principal representante da família Burseraceae com alta densidade no estado do Acre e na Região Amazônica. Dele extrai-se o “breu”, uma resina balsâmica popular pelas aplicações terapêuticas e antifúngicas (SIANI, MORAES, VEIGA Jr., 2017). Entre outros usos de espécies deste gênero, temos o tratamento de úlceras e feridas, dores de cabeça, dores de dente e reumatismo (SIANI, MORAES, Jr., 2017), anti-inflamatório (AMARAL et. al. 2009; SIANI et al., 1999), antifúngica (SATYAL et. al., 2017) antinociceptivo (ausência de dor) (LIMA et. al., 2005; RAO et. al., 2007), antineoplásico (SIANI et. al., 2011) e gastroprotetor (OLIVEIRA et. al., 2004; ARAUJO et. al., 2011).

Os monoterpenos (1,8-cineol, p-cimeno e α -pineno) caracterizados no nosso trabalho, foram identificados nas resinas das espécies *Protium hebetatum* Daly e *Protium altsonii* Sandwith (**Figura 7**). O primeiro tem um alto teor de terpenos e já foi observado que seu óleo inibiu a migração de neutrófilos em camundongos estimulados com zymosan e lipopolissacarídeos (SIANI et al., 1999). Já *P. altsonii* são espécies de grande porte conhecida popularmente como “breu mescla”, com grande potencial na indústria madeireira (REIS et al., 2010). O uso medicinal da sua resina não foi descrito.



Figura 7. Imagens de *Protium hebetatum* Daly (**A**) e *Protium altsonii* Sandwith (**B**) Fonte: Re flora (<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/PrincipalUC/PrincipalUC.do?lingua=en>).

A “U.S.Food and Drug Administration” admite que os monoterpenos identificados no gênero *Protium* como seguros para uso (“generally recognised as safe”-GRAS) (U.S FOOD & DRUG ADMINISTRATION). O p-cimeno possui LD₅₀ (toxicidade aguda) oral = 4750 mg/kg (ratos), 1695 mg/kg (camundongos) e intraperitoneal = 1125 mg/kg (camundongos). Já 1,8-cineol possui LD₅₀ oral = 2480 mg/kg (ratos), subcutâneo = 1070 mg/kg (camundongo) e intraperitoneal = 150 mg/kg (camundongo). Por fim α -pineno possui LD₅₀ oral = 3700 mg/kg (ratos), por inalação = 625 μ g/m³ (ratos) e intraperitoneal = >500 mg/kg (camundongos) (CAYMAN CHEMICAL). Algumas de suas características serão listadas a seguir.

2.6.1. PARA-CIMENO

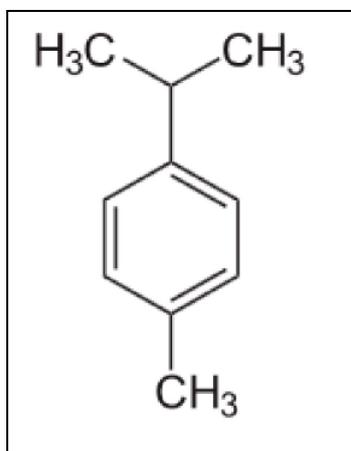


Figura 8. Estrutura química do composto p-cimeno. Fonte: Google imagens.

Presente em gêneros como *Thymus* (ASBAGHIAN et. al., 2011), *Origanum* (MECHERGUI et. al., 2016), *Ocimum* (Lamiaceae) (FOE et. al., 2016), *Eucalyptus* (Mirtaceae) (DOGAN et. al., 2018), *Protium* (Burseraceae) (SATYAL et. al., 2017) e *Artemisia* (Asteraceae) (ABDOLRAHIMZADEH et. al. 2018), entre outros. Sinônimos do p-cimeno incluem: 4-isopropil-tolueno, 1-isopropil-4-metilbenzeno e 1-metil-4-isopropilbenzeno. Na natureza, a molécula é encontrada na forma de anel benzênico com extremidades metil-isopropil (**Figura 8**), mas possui isômeros constitucionais (o-cimeno e m-cimeno) que são sintetizados em laboratório (NABAVI, 2015; JOGLEKAR, PANASKAR & ARVINDEKAR, 2014).

O monoterpeneo p-cimeno é utilizado em inseticidas, acaricida e fungicidas, além de ser um flavorizante alimentício (KORDAL et. Al., 2008; KUMMER et al., 2002; LIMA et. al., 2018). Ativo *in vivo*, protege as células neurológicas do dano oxidativo prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DE OLIVEIRA et. al., 2015). Em 2013 Zhong et al. demonstraram que células RAW 264.7 estimuladas com LPS após o tratamento com p-cimeno diminuem a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em nível transcricional e *In vivo* camundongos C57BL/6 desafiados com LPS aumentam a sua produção de IL-10 e suprimem TNF- α e IL-1 β através do bloqueio das vias MAPK e NF- κ B (ZHONG et al. 2013). Outro grupo de pesquisadores , sinalizam para o efeito anti-inflamatório de p-cimeno visto que o composto reduziu a produção de IL-8 em monócitos THP-1 estimulados com LPS assim como diminuiu a fosforilação de Akt (Proteína quinase B), I κ B α e p38 MAPK, que são proteínas inibidoras de fatores de transcrição da sinalização celular envolvidos em estímulos inflamatórios (SCHINK et. al., 2018). Em sinergia com o cinamaldeído no extrato de *Cinnamomum verum*, esse efeito é intensificado (SCHINK et. al., 2018), com a sugestão deste perfil anti-inflamatório estar associado à ação antinociceptiva (BONJARDIM et al., 2012; DE SANTANA et. al., 2015).

Yang, Chao & Liu (2014) demonstraram que o p-cimeno presente no OE de *Glossogyne tenuifolia* possuía ação bactericida com MIC 12 mg/mL para *E. coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus* e *L. monocytogenes*, MIC 6 mg/mL para *Salmonella*

entérica, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* e, por fim, *S. sanguinis* com MIC 3 mg/mL (YANG, CHAO & LIU., 2014). Os autores destacaram o efeito aditivo que o p-cimeno exerce, em conjunto com os outros compostos (4-terpineol, linalol, α -terpineol) presentes no OE (YANG, CHAO & LIU., 2014). A atividade aditiva do p-cimeno é também observada para o seu precursor carvacrol em *Vibrio cholerae*. Estudos com os compostos isolados, mostraram que o carvacrol possuía ação inibitória, enquanto que nenhum efeito foi constatado com p-cimeno; porém curiosamente, quando em associação, o p-cimeno intensificou o efeito do carvacrol (RATTANACHAIKUNSOPON & PHUMKHACHORN, 2010). De fato, o p-cimeno revela-se um bactericida pouco eficiente, como também foi evidenciado no estudo de Mitropoulou et. al. (2015), quando foi o menos ativo dos componentes do OE de *Origanum dictamnus* contra diferentes cepas de bactéria. Andrade-ochoa et al. (2015) chegaram a conclusões similares, num estudo que avaliava o efeito bactericida de vários compostos, os quais incluíam p-cimeno, carvacrol e timol, como componentes em *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* (MUGNAINI et al., 2013).

Em 2002, Ultee et. al., investigaram o mecanismo de ação de p-cimeno e carvacrol na membrana lipídica dos organismos celulares. Aparentemente ambos tem afinidade pela parte hidrofóbica da membrana celular se acumulando ao redor e interagindo com os lipídios causando um “inchaço” na membrana e tornando-a mais fluida e permeável. O tratamento com p-cimeno permitiu um aumento 2.7x maior da membrana que o tratamento com carvacrol e isso ocasionou em perda de potencial elétrico, mas não influenciou no crescimento da bactéria *Bacillus cereus* (ULTEE, BENNIK & MOEZELAAR, 2002). Já no estudo de Cristani et al., 2007 obteve-se uma ação citotóxica em *E. coli* no qual os autores também especulam que os compostos possam interagir com os lipídios da membrana.

Estudos com fungos, mostraram que p-cimeno não possui atividade antifúngica em *Rhizopus oryzae* (MICs: >1024 μ g/mL) (LIRA MOTA et. al., 2012) e *Aspergillus niger* (MIC: >300 μ g/mL) (MATAN, MATAN & KETSA, 2013). Está presente em alguns OE como *Thymus serpyllum* e *Origanum vulgare* com atividade antifúngica (MIC (0.1% e 0.5%) para dermatófitos ovinos, porém sua ação isolada se mostra inferior (MIC >8%).

O composto também está presente no OE extraído das partes aéreas de *Ocimum gratissimum* durante a prefloração (31.53%) e na floração total (28.08%). O OE proveniente da floração apresentou o melhor efeito antiparasitário em *Trypanosoma brucei brucei* (IC₅₀ = 27.23 +/- 3.74 μ g/mL) do que em *Plasmodium falciparum 3D7* (IC₅₀ = 49.29 +/- 12.35 μ g/mL). Já P-cimeno obteve um valor maior do que o OE para trypanossoma, IC₅₀=76.32 μ g/mL, enquanto que em *Plasmodium* ele não apresentou atividade (KPOVIESSI et. al., 2014). Um outro estudo sobre o efeito tripanocida de OEs de diferentes espécies e seus componentes majoritários, mostrou que o p-cimeno teve um IC₅₀ de 4.5 \pm 1.0 μ g/mL e um índice de seletividade > 100 em relação as células de fibroblastos de Balb/3T3 (KAMTE et. al. 2018).

A atividade antiviral deste composto também foi observada em vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) de forma concentração-dependente com IC₅₀ > 0,1% e diminuição de mais de 80% de colônias virais em placa. Segundo os autores, o mecanismo de ação pode estar relacionado à interação com a cápsula viral (SHARIFI-RAD et al., 2017).

2.6.2. 1,8-CINEOL

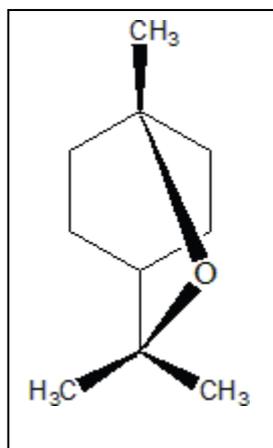


Figura 9. Estrutura química do composto 1,8-cineol. Fonte: Google imagens.

Também denominado eucaliptol, 1,8-cineol é o composto predominante nos OE (chega a 95% da composição) de plantas do gênero *Eucalyptus* (DE GROOT, 2016; SCHMIDT). É um monoterpene éter monocíclico (**Figura 9**) presente comumente na natureza, muito encontrado em fragrâncias e empregado como saborizante. Em laboratório, pode se obtê-lo através do seu precursor α -terpineol (LANA et. al., 2006).

Eucaliptol apresenta grande atividade anti-inflamatória. Juergens et al. (2004) observaram que 1.5 $\mu\text{g/mL}$ de 1,8-cineol inibiu a produção de citocinas como TNF- α (92%), IL-1 β (84%), IL-4 (70%) e IL-5 (65%) em linfócitos humanos e TNF- α (99%), IL-1 β (84%), IL-6 (76%) e IL-8 (65%) em monócitos ativados com LPS. No tratamento com 0.15 $\mu\text{g/mL}$ de 1,8-cineol houve diminuição de TNF- α (77%) e IL-1 β (61%) pelos monócitos e IL-1 β (36%) e TNF- α (16%), pelos linfócitos. O estímulo dos monócitos com LPS levou a expressão de ERG-1 uma proteína atribuída como um fator de transcrição envolvida na proliferação e apoptose. De acordo com Zhou et. al. 2007 o tratamento com 1,8-cineol diminuiu a expressão total de ERG-1 na célula de forma concentração-dependente. Não houve alteração na expressão de NF- κ B.

Em macrófagos alveolares MH-S desafiados com LPS, o tratamento prévio com 1,8-cineol diminuiu a produção de IL-6 e IL-1 (α e β) intracelulares, mas curiosamente não afetou a produção de NO e TNF- α . O composto foi capaz de atenuar a carga bacteriana de *Mycobacterium smegmatis mc² 155* sem alterar a atividade fagocítica do macrófago. Contrariando estudo anteriores, houve aumento na fosforilação de NF κ B e ERK1/2 e diminuição de p38 e JNK1/2 (YADAV & CHANDRA et. al. 2017).

No seu trabalho, Juergens et. al. 2004 apontam que o composto é excelente candidato ao tratamento de doenças como asma, sinusite e de doenças associadas a obstrução pulmonar crônica (COPD). O potencial anti-inflamatório é observado em trabalhos *in vivo*, cujo composto prolongou a capacidade pulmonar de pacientes com asma (JUERGENS ET. AL., 1998-2003; LEE et al. 2016), diminuiu sintomas associados a sinusite e a COPD (KEHRL, SONNEMANN & DETHLEFSEN., 2004; WORTH, SCHACHER & DETHLEFSEN., 2009; BRUCHHAGE et al. 2018) e atenuou os danos causados as células do pulmão pela ingestão de cigarro (YU et. al. 2017; KENNEDY-FEITOSA et. al. 2016). LI et. al. (2017) expõem que

a atividade anti-inflamatória do composto protege contra infecções pulmonares provocadas pelo vírus influenza A e que a sinergia observada entre o monoterpeno e o antiviral Oseltamivir possibilita um tratamento combinado entre os fármacos O composto ainda desempenhou o papel de adjuvante em conjunto com o do vírus inativado, para elaboração de uma vacina protetora.

Essa ação anti-inflamatória também foi observada no tratamento com 1,8-cineol de células PC12 desafiadas com beta amiloides (Ab), nas quais induzem a inflamação semelhante a doença de Alzheimer. O composto diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS, NO, citocinas TNF- α , IL-1b e IL-6, além de regular NOS-2, COX-2 e NF-KB o que pode ser útil em doenças degenerativas (KHAN et. al., 2014). De forma semelhante, estudos anteriores mostraram que 1,8-cineol (IC₅₀ = 66.23 μ M) protegia as células U-373 MG da ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (PORRES-MARTÍNES et. al. 2014). Um estudo de PORRES-MARTÍNES et. al. 2016, averiguou que o pré-tratamento com 25 μ M de 1,8-cineol diminuiu a perda de viabilidade celular em células PC12 prejudicadas pelo H₂O₂. Os autores também observaram a inibição de ROS e redução da atividade de caspase-3 nessas células. Ainda foi observado uma possível atividade antioxidante, revelada pelo aumento da expressão de enzimas como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR) e heme-oxigenase 1 (HO-1) (PORRES-MARTÍNEZ et. al., 2016).

Uma característica dos terpenos é que sua estrutura possibilita o aumento da fluidez da membrana do estrato córneo da epiderme, o que facilita a transposição de outras substâncias hidrofílicas na pele (DOS ANJOS et. al. 2007; SAPRA, JAIN & TIWARY., 2008; CASEY et. al. 2017). Isto foi visto em um estudo onde se utilizou de uma microemulsão contendo os hormônios 17 - estradiol, progesterona, acetato de ciproterona e finasterida (1%), polioxi-etileno (22%), etanol (22%), óleo de eucaliptol (45%) e água (10%) em adição com alguns agentes poliméricos como policarbofila, que ao serem aplicados de forma tópica resultou numa melhor penetração dos hormônios na pele (pele porcina) (BIRUSS, KAHLIG & VALENTA., 2007).

O 1,8-cineol também possui efeito antinociceptivo. A algesia provocada por certas substâncias como o formaldeído em camundongos Swiss foi revertido pelo tratamento com 1,8-cineol (SANTOS et al., 2000; DAMASCENO et. al., 2017). O terpenoide provoca atenuação da pressão aórtica e na frequência cardíaca (LAHLOU et. al., 2002), no entanto aumenta a circulação sanguínea (KOVAR et. al., 1987). A inalação prolongada leva a vasodilatação e ampliação de sangue no cérebro (STIMPFL et. al., 1995), relaxando a musculatura lisa vascular e dos brônquios, além de ser miorelaxante e possuir efeito gastropotetor, hepatoprotetor e imunomodulador (SOARES et. al., 2005; SANTOS & RAO., 2018; CIFTCI et. al. 2011; CIFTCI, TANYILDIZI & GODEKMERDAN, 2011).

Em 2013 foi feito um estudo da atividade anticâncer do 1,8-cineol em duas linhagens celulares humanas de câncer de cólon RKO e HCT116. O composto induz a apoptose das células através do bloqueio de survivina (inibidor de apoptose) e Akt, bem como ativando p38. A célula entra em processo de morte celular através da indução da clivagem de moléculas como Poly (ADP-ribose) polimerase (PARP) e Caspase 3 (MURATA et. al., 2013). Mais tarde Nikolić et. al. 2015 demonstraram que a citotoxicidade de 1,8-cineol era mais proeminente em células HCT116 (IC₅₀ 4 mM), também observando perda de viabilidade celular em MRC-5 (IC₅₀ 11.0 mM) e HT-29 (IC₅₀ 7.5 mM). Em células A431 o tratamento com 1,8-cineol aumentou a expressão de p53, o que leva a célula permanecer na fase G2/M do ciclo celular. A apoptose celular é confirmada pela expressão das proteínas Bax/Bcl-2, Cyt-c, caspase-9 e caspase-3 (SAMPATH et. al., 2018).

Este composto também apresentou atividade antifúngica em diferentes fungos isolados de amostras de grão de bico. Em *Aspergillus flavus* a concentração mínima inibitória (1.285 mg/mL) e fungicida (1.83 mg/mL) foi menor do que a utilizado pelo fármaco de mercado nistatina (1.78 mg/mL e >2.0 mg/mL respectivamente) (SHUKLA et. al. 2012).

Já estudos com bactérias das espécies *Staphylococcus aureus*, mostraram que estas foram susceptíveis ao composto nos tratamentos por 10 e 30 minutos, mas não apresentou efeito em *Enterococcus faecalis* (ZORAN et. al. 2000). Em comparação com o tratamento a base de Mupirocina, fármaco utilizado no tratamento, (0.125-0.156 µg/mL), a MIC de 1,8-cineol para *Staphylococcus aureus* (4-8 µg/mL) é bem inferior (KIFER, MUŽINIĆ & KLARIĆ., 2016).

O composto também já foi analisado para identificar sua atividade antiviral e observou-se que apesar dos OE de *Eucalyptus*, “Tea Tree” (óleo de melaleuca) e tomilho serem efetivos contra o vírus HSV-1, o terpeno 1,8-cineol foi o menos ativo entre os seus compostos majoritários (ASTANI, REICHLING & SCHNITZLER, 2010).

2.6.3 α - PINENO

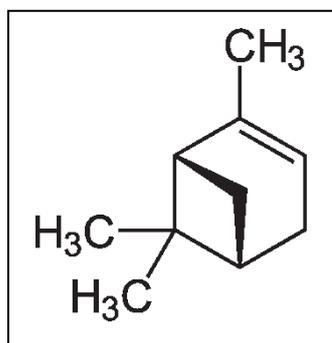


Figura 10. Estrutura química do composto α - pineno. Fonte: Google imagens

O α -pineno é um monoterpene bicíclico presente em diversas plantas, mas com dominância no OE de árvores coníferas (DE GROOT, 2016, SCHMIDT; LEE et al., 2009) (**Figura 10**). Na planta está envolvido no mecanismo de defesa da mesma atuando como inseticida (HUANG et. al. 2013; CHIU et. al. 2017).

Diversos trabalhos mostram sua atividade anti-inflamatória, através da inibição das vias de sinalização MAPK's e NF-KB em macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com LPS e isso reflete nas citocinas IL-6 e TNF- α , que foram menos sintetizadas, além de suprir a produção de NO (KIM et. al. 2015).

Estudos com linhagens celulares de próstatas, mostraram que α -pineno inibiu o crescimento de células de linhagem de câncer de próstata PC-3 induzindo a apoptose e assim, reduzindo a progressão do crescimento celular (ZHAO et. al. 2018). No trabalho de Xu et. al., 2018 as células de Hepatocarcinoma (HepG2) após o tratamento com o monoterpene se

mantiveram em fase G₂/M. O efeito no ciclo celular era de forma dose dependente suprindo (CDK1) e miR-221 e ativando vias CDKN1B/p27-CDK1 e ATM-p53-Chk2, que interrompem o crescimento celular. Um outro estudo com as células de linhagem BEL-7402 (fígado) observou-se uma diminuição de 79.3% do seu crescimento *in vitro* e 69.1% *in vivo* após indução do tumor em camundongos nude. Semelhante ao estudo anterior houve baixa expressão de proteínas mitóticas CDK1, CDC25 e ciclina B, no entanto foi observado a expressão de proteínas de dano celular Chk1 e Chk2 (CHEN et. al. 2015).

O α -pineno é o segundo maior composto presente no OE de *Rosmarinus officinalis*. Seu efeito bactericida foi similar ao do OE bruto em colônias de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O MIC de ambos ficou entre 0.0313- 0.0625% e o MBC (concentração bactericida mínima) entre 0.25-0.625% (WANG et. al. 2012). O composto parece possuir uma atividade bactericida de amplo espectro (RATHER et. al. 2012; NISSEN et. al. 2010).

A exposição a luz ultra violeta (UVA) diária pode causar sérios danos a pele pela produção de radicais livres e danos no material genético. O pré-tratamento com α -pineno diminui o estresse oxidativo atuando na produção de ROS, evitando a peroxidação lipídica e fragmentação do DNA em queratinócitos (HaCaT) e mais uma vez foi possível identificar uma baixa expressão de NF-KB, TNF- α e IL-6 (KARTHIKEYAN et. al. 2018). A ação antioxidante do α -pineno também é observada em células ICE-6 após comprometimento celular causado pela aspirina com EC₅₀ = 310 \pm 10 μ g/mL por DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) e EC₅₀ = 238 \pm 18.92 μ g/mL FRAP (ferric reducing antioxidant power). As células recuperaram a viabilidade e seu equilíbrio redox com aumento de GSH (Glutathione), reduzindo MDA (malondialdeído) e enzimas associadas ao estresse oxidativo como SOD (superóxido desmutase) e Mn-SOD (Mitochondrial-SOD). Vias de sinalização JNK e p38 foram bloqueadas após o tratamento (BOUZENA et. al., 2017).

No estudo envolvendo o potencial antifúngico do OE de *Bursera morelensis* e seus compostos majoritários α -pineno e γ -terpineno em *Candida albicans*. O composto α -pineno obteve um MFCs de 4.0 mg/mL seguido de 16.0 mg/mL, respectivamente (RIVERA-YAÑEZ et. al. 2017). Scalas et. al. 2018 obtiveram efeito inibitório do crescimento de diversas cepas de *Cryptococcus neoformans*, com MIC/MFC entre 0.54-1.07 mg/mL, além de atuar em sinergia com outros fármacos antifúngicos.

Costa S. et. al. (2018) analisaram a capacidade anti-tripanosoma de 17 OE e seus componentes majoritários. O α -pineno estava entre os 9 compostos em maior abundância nos OE. O OE de *Juniperus oxycedrus* foi um dos mais efetivos (IC₅₀ 0.9 μ g/mL) contra *Trypanosoma brucei brucei*. O α -pineno foi o composto majoritário, apresentando IC₅₀ 2.9 μ g/mL, o que levou os autores a apontá-lo como responsável pelo efeito tripanomicida observado (COSTA S. et. al., 2018). O estudo de Kamte et. al. (2018) demonstrou que o α -pineno foi um composto altamente ativo contra *T. brucei*, (IC₅₀ de 1.1 μ g/mL) e um índice de seletividade excelente (SI > 100). Anteriormente, Da franca et. al. (2015) observaram que o composto foi efetivo para ambas as formas de *Leishmania amazonensis*. O IC₅₀ resultante foi de 19.7 μ g/mL e 15.6 μ g/mL respectivamente, sendo o IC₅₀ de 16.1 μ g/mL para amastigotas axênicas, um intermediário dos dois valores. O comportamento anti-*Leishmania* parece ser mediado pelo aumento da fagocitose, atividade lisossomal e produção de NO (DA FRANCA et. al. 2015).

3.0 JUSTIFICATIVA

No atual cenário dos fármacos empregados para leishmaniose, têm-se buscado alternativas para sobrepor as adversidades desta infecção, como vimos nas formulações de AmB e dos antimonialis pentavalentes. Novas estratégias de controle da leishmaniose, assim como o de tratamento do humano e do animal devem ser reavaliadas e estudadas visando um ponto de vista de saúde integrada-ONE HEALTH (Saúde única).

O conceito ONE HEALTH foi apresentado na Convenção Anual da Associação de Medicina Veterinária em 2007 (AVMA) em colaboração com o CDC. Seu propósito é a aplicação da multidisciplinaridade de diversas áreas a nível local, nacional e global e para a elaboração de estudos que visem o bem estar humano, animal e ambiental. A saúde humana e animal estão interligadas e inseridas no meio ambiente. A maioria das doenças que acometem o ser humano tem origem num ciclo selvagem e as zoonoses são exemplos de como essas interações são complexas no âmbito de vetores e reservatórios. Devido a essa complexidade é difícil estabelecer estratégias de controle biológico que reduzam o número de casos humanos (DHAMA et. al. 2013)

Assim, considerando que o repertório de fármacos *anti-Leishmania* é limitado, é essencial preservar a sua eficácia junto com o desenvolvimento contínuo de novos compostos e estudos com reaproveitamento de fármacos já disponibilizados no mercado. Conhecer cada vez mais as características moleculares e bioquímicas dos compostos naturais, é fundamental a fim de minimizar as possibilidades de resistência às drogas utilizadas tradicionalmente, permitindo a possibilidade do uso de combinação de novos compostos com os convencionais, sendo esta opção quimioterápica muito atraente (WAGNER;ULRICH-MERZENICH, 2009, KAISER et. al., 2015).

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

- Identificar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol identificados nos óleos essenciais do gênero *Protium* sobre *Leishmania amazonensis*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade dos compostos p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol em macrófagos peritoneais através do método de XTT;
- Avaliar a funcionalidade dos macrófagos peritoneais tratados com os compostos p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol através de um ensaio fagocítico;
- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol durante a infecção com parasito *Leishmania amazonensis* em macrófagos peritoneais;
- Calcular o IC₅₀ dos compostos p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol na infecção de macrófagos.
- Avaliar a produção de NO nos macrófagos tratados com os compostos p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol;
- Analisar a composição lipídica dos parasitos tratados ou não com os compostos p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol.

5.0 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Extração dos Óleos Essenciais - As amostras dos óleos essenciais da resina de *Protium altsonii* e *P. hebetatum* foram doadas pelos Drs. Mônica Freiman de S. Ramos (Fac. Farmácia - Dep. Medicamentos – UFRJ) e Antonio C. Siani (Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, RJ), extraído por hidrodestilação e analisadas pelo método de cromatografia de gás (RAMOS et al., 2000; ADAMS, 2007). Os componentes apontados na análise da resina: 1,8-cineol, e p-cimeno foram adquiridos comercialmente em Sigma-Aldrich assim como o α -pineno foi adquirido em Acros Organics (New Jersey, EUA) e todos diluídos em DMSO (Sigma). Anfotericina B comercial foi adquirida da Cristália, Brasil e dissolvida em água.

5.2 Animais e Termos de Ética – Camundongos foram obtidos da Universidade Federal Fluminense e mantidos para experimentação no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Camundongos Balb/c entre 8-12 semanas de idade foram empregados no estudo. Os protocolos de criação e utilização dos animais de laboratório seguem as normas do CONCEA e a Comissão de Ética e Bem-Estar Animal do Instituto Veterinário. A utilização dos animais foi aprovada pela CEUA, número de protocolo No. 5285230417.

5.3 Parasitos – Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas em meio Schneider's Insect, pH 6.8 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB - Cripion) e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil) de gentamicina a 26 °C.

5.4 Obtenção de Macrófagos Murinos - Camundongos BALB/c foram inoculados com 1,5mL de tioglicolato a 3%. Após 3 dias, os macrófagos peritoneais foram obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI 1640 e plaqueados em lamínulas de vidro redondas de 13 mm² em placas de 24 poços (5 x 10⁵/poço) e incubados a 34 °C/5% CO₂ por 2 horas. As células não aderentes foram removidas pela lavagem dos poços com PBS e incubados por 24 horas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB.

5.5 Ensaio de Citotoxicidade – Macrófagos peritoneais obtidos como descrito anteriormente foram plaqueados em placa de 96 poços (2x10⁵ /poço) e incubados a 37°C/5% CO₂ por 2 horas. As células não aderentes foram removidas através da lavagem com PBS, e incubadas por 48h (durante a noite) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após esse período, os macrófagos foram tratados com 50, 75, 100, 150 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos compostos 1,8-cineol, p-cimeno, α -pineno por 24 horas a 37 °C/5% CO₂. Após os tratamentos, os macrófagos foram lavados e incubados com Solução Salina de Tampão de Fosfato (PBS) pH 7,2 contendo 1,48 mM XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide salt, Sigma) ativado com 200 μM de PMS (Phenazine Methosulfate, Sigma). Após 3h de incubação, a atividade mitocondrial das células e o produto de reação foi lido e determinado a 450nm (Microplate reader MOD. 3550-UV, Bio-Rad Laboratories). Os resultados foram expressos em percentagem de sobrevivência em relação aos controles não tratados. Azida sódica a 2% foi usada como controle positivo da reação. Os experimentos foram feitos em triplicata.

5.6 Ensaio de Fagocitose com Promastigotas – Macrófagos peritoneais obtidos como descrito anteriormente foram tratados com os compostos na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou veículo controle (DMSO 0,5%) e incubados por 2h. Após esse período, os macrófagos foram então incubados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária na

proporção parasito: macrófago de 10:1, onde interagiram por 2h, em seguida as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. O índice fagocítico (% de macrófagos infectados x número de promastigotas por macrófagos) foi determinado microscopicamente através da contagem de no mínimo 200 células em triplicatas.

5.7 Atividade Anti-*Leishmania* - Macrófagos de camundongos BALB/c foram obtidos conforme descrito acima. As células foram infectadas com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, em uma proporção de 10 P:1 M por 2 horas. Após esse período, os parasitos livres foram retirados através de lavagem com PBS e as células incubadas a 34°C/5%CO₂. Após 24 horas de infecção, a cultura foi tratada com diferentes concentrações dos compostos e incubados por mais 24 horas nas mesmas condições descritas. A anfotericina B foi usada como controle positivo. Ao final do experimento, as células foram lavadas, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. O índice de infectividade (% de macrófagos infectados x número de amastigota por macrófago) foi determinado através da contagem de no mínimo 200 células em triplicata.

5.8 Ensaio de Morte (killing) - Macrófagos peritoneais foram obtidos como descrito acima. As células foram infectadas com promastigotas de *Leishmania amazonensis* na proporção de 10 parasitos: 1 macrófagos a 37° C / 5% CO₂. Após 2 h de interação, os parasitos livres foram removidos com PBS e as células incubadas como acima por 24 horas. Em seguida, as células infectadas foram tratadas com 50 µg/mL dos compostos ou veículo controle (DMSO a 0,5%) e incubadas por mais 24 horas. Depois disso, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% foi adicionado por 10 minutos para liberar os amastigotas internalizados. As culturas foram prontamente incubadas com 1 mL de meio de Schneider suplementado com 10% de FCS para parar a reação do detergente e mantidas a 27°C por 2 dias. A carga intracelular relativa de amastigotas foi medida pelo número de promastigotas móveis diferenciados contados em câmara de Neubauer (FERREIRA et al. 2011).

5.9 Dosagem de Óxido Nítrico (NO) – Os macrófagos foram plaqueados como descrito anteriormente e 24h após, as células foram ativadas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 100 ng/mL na presença ou não dos compostos. Ao final de 48 horas de incubação, o sobrenadante foi recolhido para a análise da dosagem de nitrito pelo método de Griess (GREEN, 1982).

5.10 Extração de lipídios - Promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram cultivadas na presença ou não de compostos na concentração de 50 µg/mL a 26 ° C. Após 48 h, os parasitos foram contados e 3x10⁶ células foram utilizadas para a extração lipídica de acordo com Bligh e Dyer (1959). As amostras foram lavadas duas vezes em PBS e foi adicionado uma mistura de metanol: clorofórmio: água (2: 1: 0,8). Após agitação intermitente durante 1 hora, a solução foi centrifugada durante 20 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante contendo os lipídios precipitado foi recolhido. O precipitado foi submetido a uma segunda extração, a mesma mistura de solventes foi adicionada, seguida por agitação intermitente durante 1 hora e depois centrifugado. Os sobrenadantes foram combinados e 1,0 mL de água destilada + 1,0 mL de clorofórmio foram adicionados. Após 40 s de agitação, o material foi novamente centrifugado por 30 min (BLIGH AND DYER, 1959). A fase inferior (orgânica), contendo os lipídios, foi separada com uma seringa de vidro e transferida para tubos eppendorf resistentes a solventes orgânicos (Axygen Scientific Inc., Union City, Califórnia, EUA). O solvente foi evaporado por arrasto com Nitrogênio. A massa lipídica total obtida foi medida em balança digital, pela diferença entre os microtubos após e antes da mistura adicionada.

5.11 Cromatografia em camada fina (TLC) - Os extratos lipídicos foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) em placas de gel de sílica 60 (Sílica Gel, 60F254, Merck KGaA, Frankfurt, DS, Germany). A fase orgânica foi seca com nitrogênio e ressuspensa num volume adequado de clorofórmio / metanol (1: 1 v / v). Para a TLC unidimensionais de lipídios neutros utilizou-se o seguinte sistema solvente: hexano: éter etílico: ácido acético 60: 40: 1 v / v; (Kawooya e Law, 1988). Os lipídios foram identificados por comparação com os seguintes padrões comerciais a concentrações de 5,0 mg / mL (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, EUA): esteróis esterificados (STE); triacilglicerol (TAG); esteróis (ST); ácidos graxos (AG); monoacilglicerol (MAG) e diacilglicerol (DAG), fosfolípidos (PL). As placas foram coradas com o reagente de Charring [CuSO₄ 10% H₃PO₄ 8% (v/v)] (RUIZ & OCHOA, 1997) em um recipiente de vidro com 1 mm de espessura e secas à 200 °C por 20-30 min, escaneadas e submetidas à análise densitométrica utilizando o programa Image Master Total Lab v1.11 (Amersham Pharmacia Biotech).

5.12 Análise Estatística – Os dados foram analisados pelo teste T de *Student* para comparação de dois grupos ou análise de variância (one-way ANOVA e one ANOVA-Kruskall Wallis para testes não paramétrico), para mais de dois grupos. As análises foram feitas utilizando o software GraphPadPrism 6.0. O valor de p é considerado significativo quando menor ou igual a 0.05.

6.0 RESULTADOS

6.1. Composição química dos óleos essenciais de *Protium hebetatum* e *P. altsonii*.

As atividades dos OEs são geralmente atribuídas à presença dos componentes químicos presentes. Resultados preliminares do nosso grupo havia observado, que os óleos essenciais das espécies *P. hebetatum* e *P. altsonii* do gênero *Protium* tinham um potencial anti-*Leishmania*. Assim, a composição química destes foi analisada pelo método de cromatografia gasosa e foram gentilmente cedidos pela Dra. Monica Freiman da Faculdade de Farmácia da UFRJ e o Dr. Antonio Siani de Farmanguinhos/Fiocruz.

Dentre os compostos identificados, foi observado que o óleo de *P. altsonii* possuía 42,9%, 33,3% de α -pineno, p-cimeno, respectivamente, estes compostos majoritários encontrados e 4,8 % 1,8-cineol, um dos compostos minoritários identificados nesse óleo. O óleo essencial de *Protium hebetatum* continha 74,6% de p-cimeno, composto majoritário também encontrado nesta espécie e 8,6% de α -pineno um dos compostos minoritários desse óleo e não apresentava 1,8-cineol na sua composição. Todos os constituintes presentes nos óleos estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Constituintes dos óleos essenciais de resinas de *Protium altsonii* e *Protium hebetatum*.

Constituinte	IR*	Abundância do componente (%) **	
		<i>Protium altsonii</i>	<i>Protium hebetatum</i>
alfa-tujeno	931	traços	-
alfa-pineno	939	42,9	8,6
canfeno	953	-	-
sabineno	976	4,0	-
beta-pineno	980	-	-
alfa-felandreno	1005	5,4	3,7
alfa-terpineno	1018	-	3,0
p-ment-1-eno	1023	2,3	-
p-cimeno	1026	33,3	74,6
beta- felandreno	1031	7,3	10,7
1,8-cineol	1033	4,8	-
p-ment-3-en-8-ol	1145	traços	-

* IR = Índice de Retenção = parâmetro utilizado em cromatografia gasosa, baseado em medidas relativas do tempo de retenção de diferentes estruturas moleculares em misturas complexas, permitindo corroborar a identidade delas (ADAMS, 2007). No presente caso, as condições de cálculo destes valores estão descritas em RAMOS et al. (2000). **Abundância refere-se à proporção que o composto individual está presente na mistura de que constitui os óleos essenciais, sendo obtida pela integração da área de seu sinal correspondente no cromatograma.

6.2. ENSAIO CITOTÓXICO

6.2.1. Análise de atividade mitocondrial de macrófagos murinos tratados com os componentes α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol .

Primeiro, analisamos a atividade citotóxica dos compostos sobre as células do hospedeiro, para isso macrófagos murinos foram incubados com diferentes concentrações 50, 75, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ dos compostos e a viabilidade celular avaliada pela atividade de desidrogenases mitocondriais. No tratamento com p-cimeno foi observado uma porcentagem de células viáveis de 97%, 92%, 89%, 83% e 82%, respectivamente. No tratamento com α -pineno a viabilidade variou de 98% a 85 % de células viáveis. E no tratamento com 1,8-cineol foi visto uma viabilidade de 93%, 88%, 92%, 93% e 90%, respectivamente (**Figura 11**). Nossos dados mostraram que os compostos não foram tóxicos até a mais alta concentração testada de 200 $\mu\text{g/mL}$.

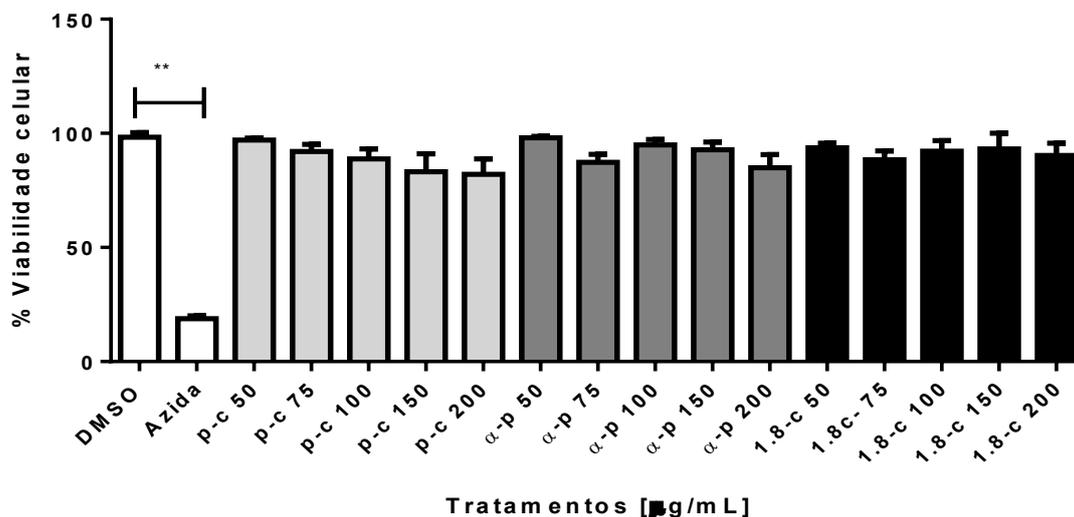


Figura 11. Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram incubados com diferentes concentrações de α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol por 48h/37°C/5%CO₂. A viabilidade celular foi analisada pelo teste colorimétrico de sal XTT . Gráfico representa 3 experimentos independentes com média \pm SEM. α -p = α -pineno; p-c = p-cimeno; 1,8-c = 1,8-cineol; * p < 0,05 em relação ao controle tratado com DMSO. Azida = 2 %

6.2.2 Ensaio de fagocitose de promastigotas tratados com os componentes α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol.

A fagocitose é uma propriedade funcional dos macrófagos crucial para a destruição do patógeno. Sendo assim, decidimos analisar a capacidade fagocítica dos macrófagos. Para isso, as células foram incubadas com 1,8-cineol, p-cimeno e α -pineno na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 2h e depois incubamos com promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na capacidade fagocítica entre os macrófagos controles e os tratados (**Figura 12**).

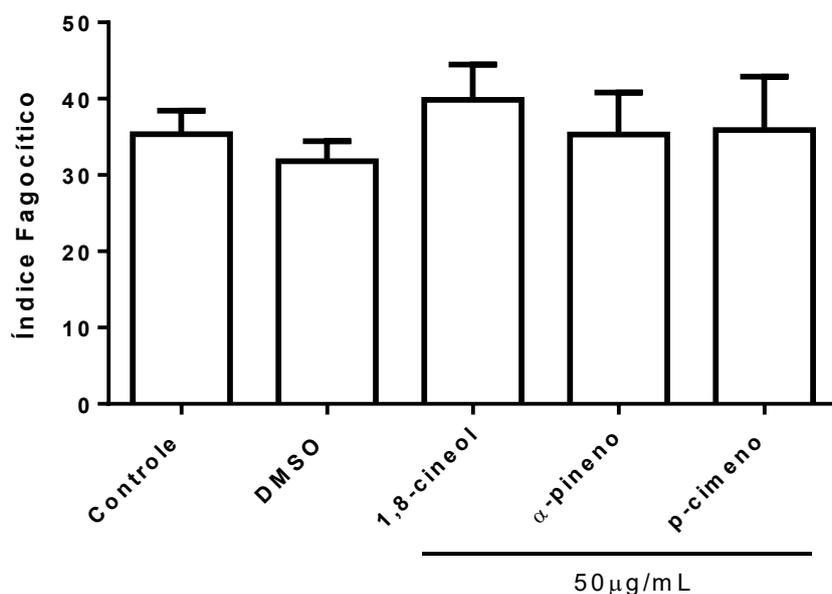


Figura 12. Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com o composto [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e depois de 2h infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10:1 por 2h/37°C/5%CO₂. O índice fagocítico (% de macrófagos infectados x número de promastigotas por macrófagos) foi determinado pela contagem de no mínimo 200 células. Gráfico representa 3 experimentos independentes com média \pm SEM.

6.3 ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA

6.3.1 Os Componentes α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol inibem a sobrevivência dos amastigotas no interior de macrófagos murinos.

A atividade anti-amastigota foi avaliada através da sobrevivência dessas formas intracelulares nos macrófagos infectados *in vitro*. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* e após 24 h de infecção foram tratados com os monoterpenos em diferentes concentrações por 24h. Os resultados mostraram que o tratamento com α -pineno nas concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram, respectivamente, 37,7%, 57,7% e 71% de inibição na sobrevivência de formas amastigotas com um $\text{IC}_{50} = 40 \mu\text{g}/\text{mL}$; seguido do 1,8-cineol que inibiu 18,6%, 61,4% e 75%, $\text{IC}_{50} = 41,4 \mu\text{g}/\text{mL}$ e do p-cimeno com 26,84%, 49,8% e 69,6% de inibição e $\text{IC}_{50} = 50,1 \mu\text{g}/\text{mL}$ em relação ao controle não tratado. Os compostos apresentaram um efeito anti-amastigota concentração-dependente (**Figura 13**). A anfotericina-B foi utilizada como controle positivo na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, onde apresentou 74,2% de inibição. O controle negativo DMSO a 1% mostrou inibição de 15%.

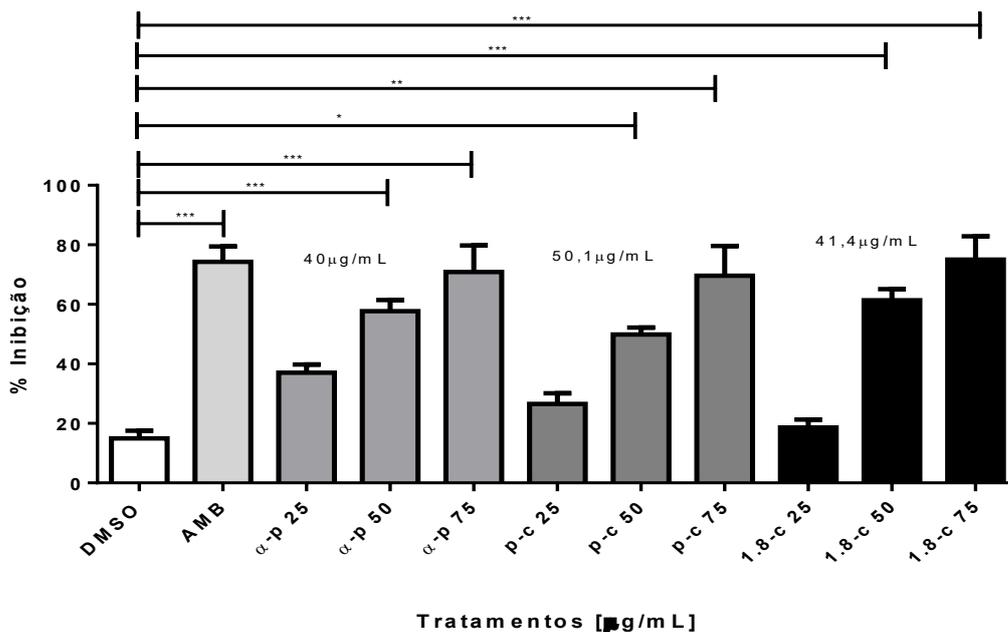


Figura 13. Macrófagos murinos peritoneais foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* na proporção de 10p:1m e depois de 24h foram tratados com α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol em diferentes concentrações. A porcentagem de inibição de sobrevivência do amastigota foi medida em relação ao controle DMSO (1%). Gráfico representa 6 experimentos independentes com média \pm SEM. *** $P < 0,0001$; ** $p < 0,002$; * $p < 0,05$. α -p = α -pineno; p-c = p-cimeno; 1.8-c = 1,8-cineol; AMB= Anfotericina B [$1 \mu\text{g}/\text{mL}$].

Na **Figura 14**, observamos por microscopia óptica usando a coloração por Giemsa, os macrófagos corados no citoplasma (roxo claro) e o núcleo (roxo escuro) e os amastigotas no seu interior (seta). Nota-se que no tratamento com DMSO apresenta muitos macrófagos infectados e com um grande número de amastigotas (**14A**). Após o tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ de α -pineno (**14C**), p-cimeno (**14D**) e 1,8-cineol (**14E**) observamos um número menor de macrófagos infectados e também houve uma redução no número de parasitos no seu interior.

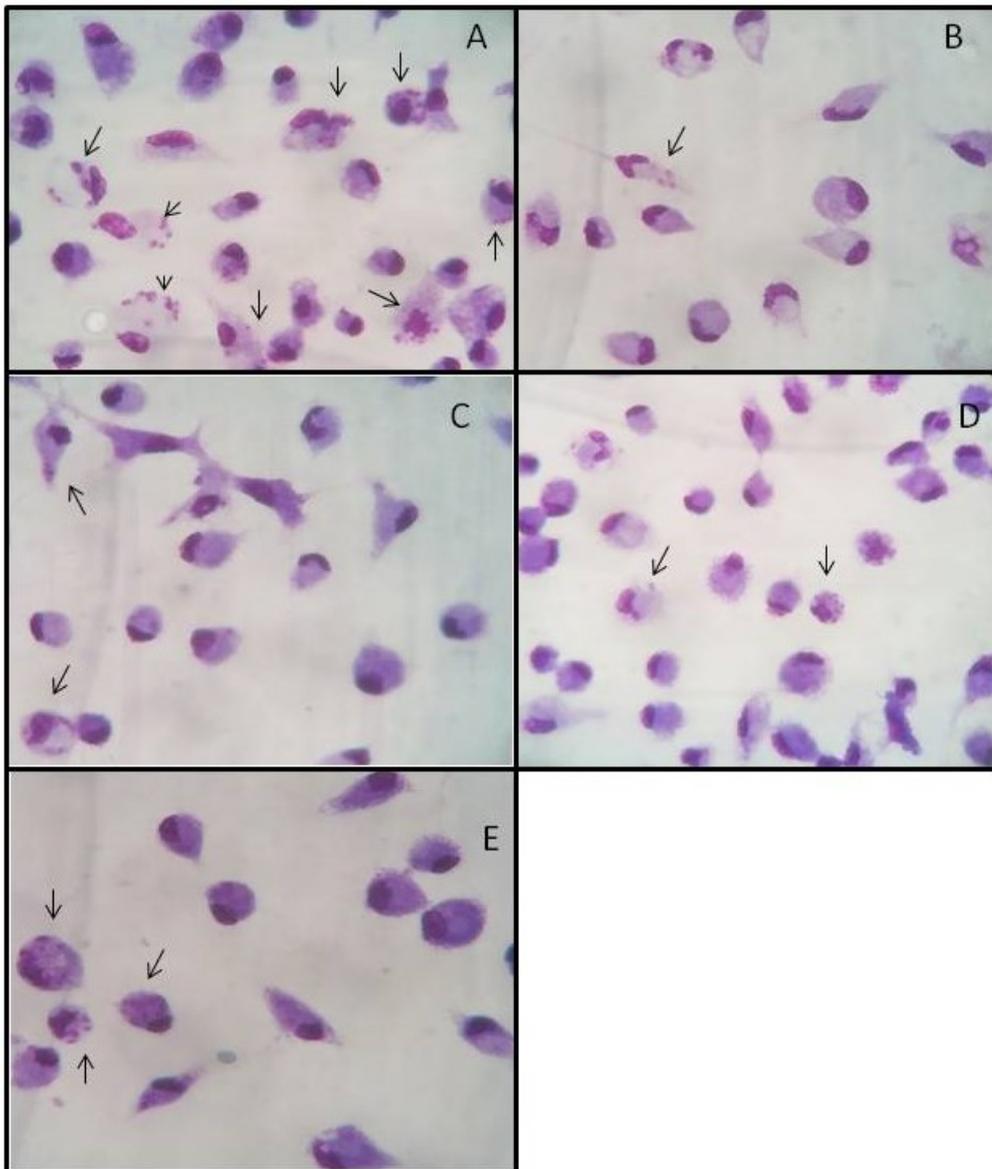


Figura 14. Microscopia óptica de macrófagos infectados e tratados com (A) DMSO 1%; (B) AMB [1 $\mu\text{g/mL}$]; (C) α -pineno; (D) p-cimeno e (E) 1,8-cineol na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Foto tirada com celular na objetiva de 100x. Seta indica macrófagos infectados.

6.3.2 Ensaio de “Killing” de amastigotas

O ensaio de “Killing” permite analisar se os amastigotas estão viáveis após o tratamento proporcionando condições favoráveis para a sua diferenciação em formas promastigotas. Nossos dados mostraram que o tratamento com os compostos reduziu a diferenciação dos amastigotas em promastigotas em 50-60% em relação ao controle DMSO 0.5%. (Figura 15).

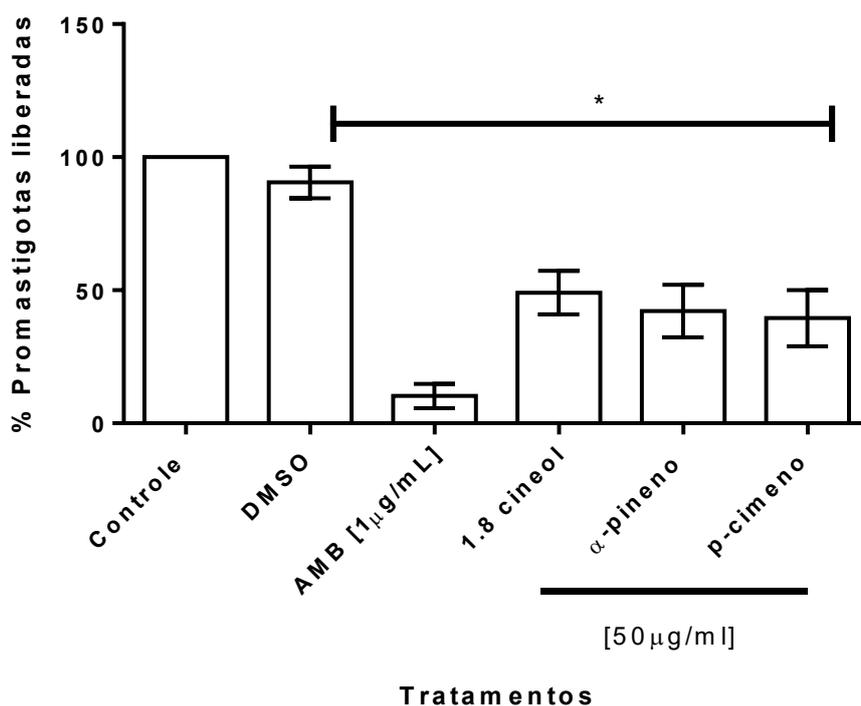


Figura 15. Macrófagos peritoneais foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10p:1m. Após 24 horas de infecção, as células foram tratadas α-pineno, p-cimeno e 1,8-cineol [50 µg/mL] por mais 24 h. O meio foi removido e uma solução contendo 0,1% SDS foi adicionada seguida de meio Scheneider +10% FBS e após 48h os promastigotas foram contados em câmara Neubauer. Gráfico representa 5 experimentos independentes com média ± SEM * P<0.05.

6.4 ANÁLISE DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS MONOTERPENOS

6.4.1 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos tratados com p-cimeno, α -pineno e 1,8-cineol.

A ativação de macrófagos implica na produção eficaz de óxido nítrico, uma molécula tóxica para microorganismos intracelulares, levando assim a destruição do parasito. Dessa forma, decidimos verificar a produção de NO dos macrófagos tratados com os monoterpênos. Os dados mostraram que os macrófagos peritoneais ativados com LPS [100 ng/mL] aumentaram 3x a produção de NO comparado aos macrófagos controles não ativados. Entretanto, quando incubamos os macrófagos com os monoterpênos não observamos um aumento na produção de NO. De forma semelhante macrófagos ativados com LPS e incubados com os monoterpênos também não apresentaram diferença significativa quando comparados aos macrófagos ativados somente com LPS. (**Figura 16**).

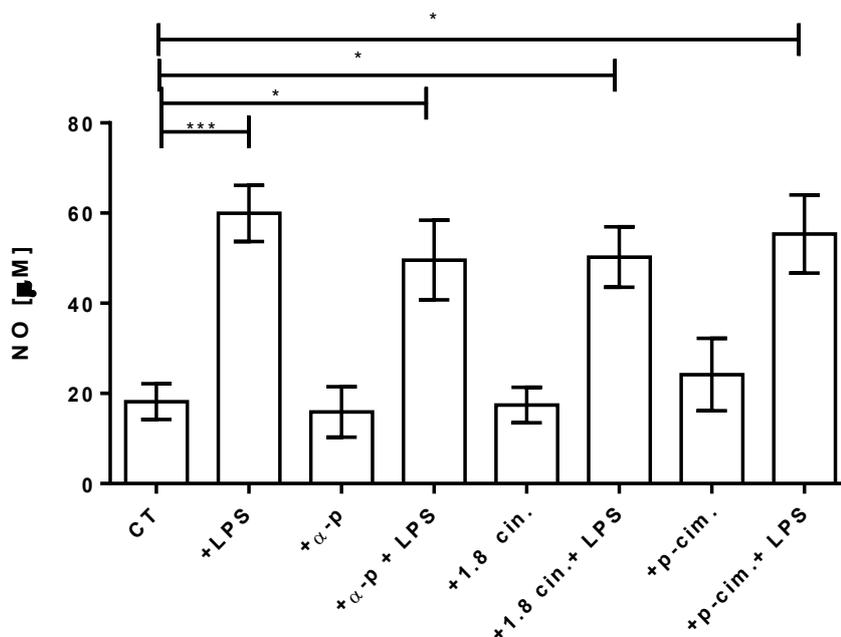


Figura 16. Macrófagos em repouso ou ativados com 100 ng/mL de LPS foram tratados ou não com α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol [50 μ g/mL] por 48 horas. O sobrenadante foi recolhido e quantidade de nitrito dosado através do reagente Griess. Gráfico representa 4 experimentos independentes com média \pm SEM ***p=0,0009 e *p<0,05.

6.4.2. Avaliação do perfil lipídico de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após tratamento com os compostos 1,8-cineol, α -pineno e p-cimeno.

Um outro possível mecanismo de ação analisado foi a composição lipídica das formas promastigotas tratadas com os compostos. As análises das TLCs mostraram que o 1,8-cineol diminuiu 46% triacilglicerol e 47% do esterol + 1.2 diacilglicerol. É possível ver também uma tendência de redução em ácidos graxos e 1.3 diacilglicerol. O tratamento com α -pineno aumentou a porcentagem de esteróis esterificados em 51% e os níveis de triacilglicerol em 45%, enquanto que o tratamento com p-cimeno aumentou 26% de triacilglicerol. Os dados foram gerados a partir da comparação com o controle 1% DMSO (**Figura 17**)

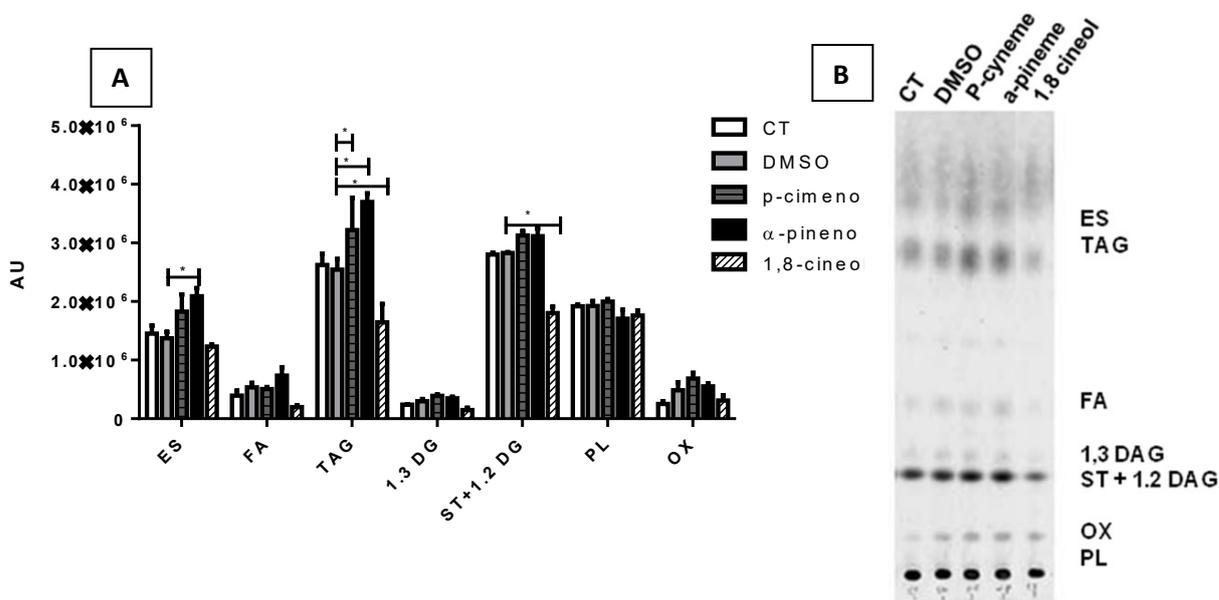


Figura 17. Efeito na composição lipídica de *L. amazonensis*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com os compostos na concentração de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ por 48h. Após esse período, as células foram lisadas, submetidas a técnicas de extração lipídica e analisadas por TLC. (A) Análise de densitometria da placa de TLC (B) Placa de TLC. Gráfico representa 3 experimentos independentes com média \pm SEM. ** P < 0,0001. ES = esterol esterificado, FA = ácidos graxos; TAG= triacilglicerol; 1.3 DG = 1.3 diacilglicerol; ST+1.2 DG = esterol esterificado + 1.2 diacilglicerol; PL= fosfolipídio; OX = oxisterol.

7.0 DISCUSSÃO

Os fatores que limitam o tratamento da leishmaniose são: o alto custo, os efeitos colaterais severos, a administração dificultosa e o aparecimento de cepas resistentes. Mesmo depois de 60 anos da descoberta dos medicamentos até hoje utilizados, ainda não há soluções que contornem satisfatoriamente os problemas encontrados na administração desses fármacos (SUNDAR AND CHAKRAVARTY, 2015). Na tentativa de encontrar antiparasitários mais eficientes, que garantam o bem estar do paciente e a eliminação efetiva do parasito, cada vez mais cresce no campo da quimioterapia estudos com produtos de origens naturais derivados das plantas.

Os OE's são substâncias de natureza lipofílica com um amplo espectro de efeitos farmacológicos tais como bactericidas (SINGH et. al. 2018), antifúngica (ELSHAFIE & CAMELE, 2017), anticarcinogênica (BLOWMAN et. al. 2018), anti-inflamatória (NADJIB BOUKHATEM et. al. 2003) e anti-*Leishmania* (DOS SANTOS SALES et. al. 2018; SHARIFI-RAD et. al. 2018; TAMARGO et. al. 2017; MAHMOUDVAND et. al. 2018) *in vivo* e *in vitro*. Essa atividade é atribuída aos componentes presentes nessa mistura, que na sua maioria é composta por terpenos. Os monoterpênicos 1,8-cineol, o p-cimeno e o α -pineno são encontrados em diferentes óleos essenciais e na literatura já foram relatadas diversas atividades destes, dentre elas anti-inflamatória (ZHONG et al. 2013), bactericida (ZORAN et. al. 2000), anti-fúngica (VILELA et. al. 2009), anti-oxidante (PORRES-MARTÍNEZ et. al., 2016) e anti-câncer (ZHAO et. al. 2018).

Em estudos anteriores do nosso grupo com os óleos brutos do gênero *Protium*, observamos o efeito tóxico sobre formas promastigotas e amastigotas da espécie do parasito *L. amazonensis*, o que nos levou a crer, que compostos presentes no óleo desse gênero poderiam ter potencial para uma atividade anti-*Leishmania*.

Na análise dos OE's foi identificado no óleo de *P. altsonii* 42.9%, 33.3% e 4.8 % de α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol, respectivamente. Já o OE de *Protium hebetatum* continha 8.6% de α -pineno, 74.6% p-cimeno e não apresentava o composto 1,8-cineol na sua composição. No trabalho de Siani et. al. 1999, o p-cimeno compunha 2,21% do OE de *Protium hebetatum*. Em Luani et. al. 2019 o α -pineno foi o monoterpêneo predominante mais encontrado nas espécies de *Protium*, ocorrendo em 15 das 77 (44.2%) espécies estudadas. Dos 15 indivíduos de *Protium hebetatum*, 5 deles possuíam o componente na sua composição (LUANI et. al. 2019). A diferença na porcentagem dos componentes encontrados nos OE's está associada as condições de crescimento nos quais a planta foi submetida como o clima e o solo (PECETTI et. al. 2012, JOAS et. al. 2012, HERRERO-JÁUREGUI et. al. 2011, THOMPSON & INGRAM, 2006; RIBEIRO-SANTOS, 2017).

Os nossos dados mostraram que os componentes estudados não apresentaram citotoxicidade para macrófagos murinos em nenhuma das concentrações testadas (50 a 200 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, em outro estudo o tratamento com α -pineno deu indícios de toxicidade a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ com viabilidade em torno de 60% dos macrófagos peritoniais de camundongos Swiss no ensaio com MTT (DA FRANCA et. al. 2015). No entanto, nossos resultados com ensaio de XTT utilizando macrófagos Balb/c na mesma concentração testada encontramos 94% macrófagos viáveis. Diferenças na resposta de macrófagos de camundongos "Swiss" e Balb/c já foram relatadas com diferentes estímulos e patógenos, esta diferença observada pode ser uma característica intrínseca desta célula a esse composto (MARQUES et al., 2011; VÍCTOR & DE LA FUENTE, 2003) Além disso, os métodos utilizados apesar de serem muito parecidos são reduzidos por enzimas diferentes, o que pode ter influenciado nos resultados. Um outro estudo, utilizando concentrações menores observaram viabilidade nos macrófagos peritoneais de camundongos tratados com o

componente α -pineno (0.2 até 20 μM ou 0,02 até 2,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no teste de MTT (KIM et. al. 2015).

Um estudo com quertínócitos mostrou que o composto α -pineno na concentração de 30 μM (4,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não é tóxico para as células de linhagem HaCaT, além de proteger contra os danos causados pela radiação ultravioleta (UVA), reduzindo a perda de potencial mitocondrial (KARTHIKEYAN, 2018). Já estudos com células PC12 (linhagem de feocromocitoma de medula adrenal de ratos) tratadas com 1,8-cineol na concentração até 10 μM (1,542 $\mu\text{g}/\text{mL}$) também não foi observado toxicidade (KHAN et. al. 2013). Porres-Martínez et. al. 2016 apontaram que a citotoxicidade de 1,8-cineol e α -pineno para PC12 é vista a partir de 400 μM (61,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para células U373-MG, o tratamento com α -pineno é seguro até 250 μM (34,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e para 1,8-cineol somente até 100 μM (15,425 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (PORRES-MARTÍNEZ et. al., 2016). Em comparação com nossos resultados, onde não houve perda de viabilidade até 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, os resultados sugerem que os macrófagos possam ser mais resistentes ao tratamento.

A fagocitose é um mecanismo utilizado pela célula fagocítica para apresentar epítomos antigênicos para os linfócitos T e estes serem ativados com sucesso, a fim de montar uma resposta imune efetiva. Alguns compostos possuem ação direta nas células dos mamíferos, que podem influenciar em suas funções básicas. No trabalho de Yadav e Chandra, 2017 o 1,8-cineol [0.02%] diminuiu a carga parasitária de bactérias nos macrófagos sem interferir na atividade fagocítica. Em nossos resultados também não observamos alteração na capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais tratados com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos compostos. No entanto, já foi relatado um aumento da fagocitose dos macrófagos peritoneais tratados a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -pineno e desafiados com zimosan (DA FRANCA et. al. 2015). Essa diferença observada em relação aos nossos resultados pode ser devido a concentração testada.

As formas amastigotas são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da infecção e conseqüentemente pelas manifestações clínicas da doença. Sendo assim, buscamos averiguar se os componentes possuíam atividade anti-amastigota. Os compostos apresentaram efeito anti-*Leishmania* em *L. amazonensis* de forma concentração-dependente. O p-cimeno já foi identificado como anti-*Leishmania* por ESCOBAR et. al. 2010 com IC_{50} de 149,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para promastigotas e $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ para amastigotas de *L. chagasi*. Silva et. al. 2017 correlacionaram a estrutura molecular de diversos monoterpenos adquiridos comercialmente com a sua ação anti-*Leishmania* sobre *L. amazonensis*. Neste trabalho os autores não observaram efeito antiparasitário ($\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$) de p-cimeno sugerindo que a ausência do grupo hidroxila presente nos outros dois compostos (Timol e Carvacrol), que foram tóxicos para o parasito, seja significativo para o efeito observado (SILVA, et al., 2017). Contraditoriamente, nossos resultados mostraram efeito anti-*Leishmania* para a espécie *L. amazonensis* de forma concentração-dependente com IC_{50} de 50.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ superior ao de timol (26,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e cavacrol (25,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) encontrados no trabalho de Silva et. al. 2017.

O tratamento com o 1,8-cineol também foi tóxico para as formas amastigotas de *L. amazonensis* com $\text{IC}_{50} = 41.4 \mu\text{g}/\text{mL}$. Este valor foi menor do que o encontrado por Silva et. al. 2017 para formas promastigotas de *L. amazonensis* ($\text{IC}_{50} = 568.1 \mu\text{g}/\text{mL}$), o que sugere que as amastigotas possam ser mais sensíveis a este composto do que os promastigotas, ou ainda que este composto possa ser metabolizado pela célula hospedeira e o seu produto possa causar o efeito tóxico. Um outro estudo utilizando o óleo essencial de *Thymus capitellatus* em diferentes espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. tropica* e *L. major*) se mostrou tóxico, entretanto um dos seus principais compostos, 1,8-cineol, não teve efeito sobre a viabilidade dos parasitos (MACHADO et. al. 2012).

Um estudo de toxicidade com α -pineno por 48h sobre diferentes formas do parasito indica que as formas amastigotas intracelulares (15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram mais suscetíveis à ação do α -pineno do que as formas amastigotas axênicas (16,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e promastigotas (19,7 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (DA FRANCA et al., 2015). Nossas análises para formas amastigotas intracelulares implicam em maior concentração requerida com um $\text{IC}_{50} = 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ do composto, contudo, o nosso tempo de tratamento foi de 24h.

Considerando a inibição da sobrevivência dos amastigotas nos macrófagos infectados tratados com compostos, nós decidimos investigar se essas formas intracelulares eram capazes de se diferenciarem em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Este ensaio mostrou que nos macrófagos infectados e tratados os amastigotas não conseguiam se diferenciar em promastigotas, nós observamos um percentual de morte em torno de 50-60 % na concentração 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos compostos, indicando assim que os amastigotas presentes nos macrófagos tratados estavam inviáveis.

Visto que observamos uma redução na sobrevivência dos amastigotas e uma menor viabilidade dessas formas, nós avaliamos se o efeito microbicida observado nos macrófagos tratados com os compostos poderia ser via modulação da produção de NO, já que esse é um importante mecanismo microbicida utilizado pela célula para eliminar o parasito no interior do fagolisossomo (SAKS & ANDERSON, 2004). Nossos dados mostraram que em nenhum dos tratamentos com os compostos modulou a produção de NO dos macrófagos peritoneais em repouso ou ativados com LPS. Trabalhos anteriores mostraram que de forma concentração-dependente o pré-tratamento com α -pineno (1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 30 minutos) inibe a translocação de NF-KB e promove o acúmulo de I κ B- α no citoplasma de células THP-1 estimuladas com LPS (1 mg/mL/ 1h) (ZHOU, 2004). Além disso, Kim et. al. 2015 demonstraram que os macrófagos peritoneais primeiramente tratados com α -pineno (0,2 até 20 μM ou 0,02 até 2,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 1h) e depois estimulados com LPS (200 ng/mL) por 24h, obtiveram uma produção de NO menor em comparação ao controle somente com LPS. Essa queda dose-dependente está associado com a diminuição da expressão da enzima iNOS (NO sintase induzida) responsável pela produção de NO em macrófagos. Aparentemente, o contato do componente com a célula resulta no bloqueio dessa via de síntese, uma vez que em nossos resultados os macrófagos que foram primeiramente estimulados com LPS (100 ng/mL por 2h) e depois tratados com os componentes por 48h não sofreram alterações na produção de NO, nossa hipótese é que o componente atue impedindo a fosforilação de I κ B- α . Curiosamente, Da Franca et. al. 2015 demonstraram uma alta produção de NO em macrófagos estimulados com *Leishmania* por 30 minutos e posteriormente tratados com o componente α -pineno a partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24h e nas células não estimuladas com o parasito foi observado um aumento a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Um estudo com células PC12 (linhagem de feocromocitoma de medula adrenal de ratos) demonstrou que o aumento na produção de NO, devido ao contato com o peptídeo beta-Amyloid 25-35 (A β 25-35) foi suprimido nessas células com o pré-tratamento do 1,8-cineol (5 e 10 μM ou 0,77 e 1,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (KHAN et. al. 2015). Possivelmente, o tipo de estímulo possa influenciar no mecanismo de ação desses componentes e que em doses elevadas o composto α -pineno possa ter um efeito pro-inflamatório, promovendo a produção de agentes microbicidas. Recentemente, foi mostrado que o pré-tratamento de macrófagos alveolares MH-S com 1,8-cineol [0.02%] e desafiados com LPS (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não afetou a produção de NO em nenhum dos tempos estudados (6, 12 e 24h) (YADAV E CHANDRA 2017).

Os lipídios que compõem a membrana plasmática de macrófagos diferem dos encontrados em *Leishmania*. Enquanto as células dos mamíferos possuem colesterol, os parasitos possuem majoritariamente ergosterol em sua membrana celular. Camargos et. al. 2014 estudaram a atividade dos terpenoides na membrana totais de *Leishmania amazonensis*. Um dos terpenos utilizados foi o 1,8-cineol, que foi tóxico para as formas promastigotas e na

concentração do seu IC₅₀ (4.697 µM ou 72,4 µg/mL) levou ao aumento na fluidez da membrana celular do parasito, causando a lise das células (4-9%), porém em concentrações maiores essa porcentagem chegou a 50% (CAMARGOS et. al. 2014).

Esse mecanismo de ação de lise celular associado a permeabilização da membrana é observado também no tratamento com miltefosina, devido à afinidade pelas proteínas e lipídios da membrana do parasito (MOREIRA et. al. 2014). Talvez os compostos estudados atuem nas formas amastigotas de maneira semelhante ao encontrado em miltefosina, sendo necessários mais estudos para identificar possíveis modificações na membrana dos parasitos. Nossos dados de análise lipídica de promastigotas após o tratamento com 1,8-cineol demonstraram que promastigotas incubados com 50 µg/mL do composto por 48h leva a uma queda nos níveis de triacilgliceróis e esterol + 1.2 diacilglicerol e indicam uma redução em ácidos graxos, e 1.3 diacilglicerol sugerindo que, nessa concentração o composto já começaria a interferir no metabolismo lipídico. O lipídio neutro como os triacilgliceróis vem sendo proposto como reservatório de ácidos graxos nos tripanossomatídeos na forma de corpos lipídicos que são utilizados pelo parasito como fontes energéticas (STEIGER, 1973; ALLMANN et. al. 2014). O tratamento com 1,8-cineol sugere que a adição do componente ao meio de cultura possa levar o parasito a níveis de estresse, fazendo com que ele consuma essas reservas lipídicas como mecanismo de sobrevivência.

No estudo de Mathur et. al. 2017 foi observado que o tratamento com os antimoniais trivalentes induz as formas promastigotas de *L. donovani* a produzir mais ergosterol, além de alterar os níveis de ácidos graxos. Os autores sugerem que esse “reforço” na membrana celular é um mecanismo de defesa em resposta ao estresse citotóxico do fármaco. Tendo em vista que o tratamento com p-cimeno e α-pineno resultou em um aumento dos níveis de triacilglicerol e esterol esterificado e que eles possam ser precursores desse lipídio (YAO & WILSON, 2016), isto levanta a hipótese de que conseqüentemente houve também alteração em ergosterol nos promastigotas.

O grupo de Soumya et. al. 2015 identificou uma enzima em *L. donovani* denominada acetil-CoA sintetase, que está envolvida na produção de Acetil-CoA, um mediador, cuja atuação inclui diversas vias metabólicas, dentre elas a de biossíntese lipídica. Em um estudo recente, eles observaram que o “knock-down” de um dos alelos (SKO), que codifica essa enzima, diminuiu a capacidade infectiva do parasito. Além disso, os parasitos SKO apresentaram 3x menos lipídios totais em comparação ao controle e curiosamente produziram também 3x menos ergosterol (SOUMYA et. al. 2017). O que nos levou a questionar se essa enzima poderia ser alterada pelo tratamento com nossos compostos. Futuramente planejamos analisar a morfologia desses parasitos após o tratamento com os compostos assim como sua infectividade e a expressão da acetil-CoA sintetase em formas promastigotas e amastigotas internalizadas de *L. amazonensis*. Considerando também a possibilidade de incorporar moléculas químicas aos compostos que acrescentem uma afinidade a essa enzima e direcionando a ação anti-*Leishmania*, pois segundo o autor, essa enzima possui pouca similaridade (49.3%) com a encontrada em *Homo sapiens*, sinalizando ser um ótimo alvo para os futuros fármacos (SOUMYA et. al. 2017).

Como destacado anteriormente, o tratamento para leishmaniose necessita urgentemente de uma atualização em sua abordagem. Os fármacos quando empregados isolados, por mais eficientes que possam ser, acabam dando brecha para o surgimento de cepas resistentes caindo no ciclo dos medicamentos que ao longo dos anos perdem utilidade. A implementação de novos medicamentos se faz necessário, no entanto igualmente importante é o estudo direcionado à terapia combinada. O nosso trabalho implica que os componentes 1,8-cineol, p-cimeno e α-pineno presentes nos OE-s de *Protium altosonii* e

Protium hebetatum possuem ação anti-*Leishmania* sobre *L. amazonensis* com ausência de citotoxicidade para os macrófagos. Esses compostos são de fácil acesso e uma vez comprovada sua baixa letalidade para o hospedeiro pode abrir portas para o uso em combinação com outros medicamentos. Sua forma oleosa permite a aplicação tópica pelo próprio paciente podendo diminuir o uso de administrações intravenosas e aumentar as chances de sucesso da terapia, visto que compostos lipofílicos conseguem permear a membrana celular e se difundir pelo citoplasma. Alguns terpenos conseguem reagir com os lipídios presentes na camada *stratum corneum* da pele e assim aumentar a permeabilização de outros compostos associados (VADDI et. al. 2002; EDRIS et. al. 2007). Estudos anteriores indicam que o 1,8-cineol é capaz de incorporar nessa camada e aumentar sua fluidez (ANJOS et. al. 2007). Assim como o p-cimeno também pode interagir com os lipídios da camada celular tornando-a mais permeável (ULTEE, BENNIK & MOEZELAAR, 2002).

Assim, o estudo vislumbra a possibilidade de que essas substâncias possam ser usados em combinação com medicamentos já conhecidos para o tratamento de leishmaniose a fim de promover um efeito sinérgico e benéfico para o paciente. No entanto mais estudos nessa área farmacológica são necessários para elucidar essas alternativas. Um eventual candidato seria os antimoniais pentavalentes devido a ambos poderem atuar na síntese de macromoléculas (HERMAN, GALLALEE & BEST, 1987). Ou mesmo em associação a anfotericina B que tem o ergosterol como alvo de ação (PAILA, SAHA & CHATTOPADHYAY, 2010). Outro aspirante seria em conjunto a miltefosina que inibe a via de esteróis e fosfolipídios (URBINA, 1997; RAKOTOMANGA, SAINT-PIERRE-CHAZALET & LOISEAU, 2005) e ampliar seu uso em cães e gatos domésticos, visto que o tratamento é muito caro para os proprietários que o desejam.

8.0 CONCLUSÃO

1. Os componentes (α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol) derivados dos OEs de *Protium* apresentaram efeito anti-amastigota em *Leishmania amazonensis*.
2. Não foi observado toxicidade para as células hospedeiras como demonstrado pela atividade mitocondrial após o tratamento com os componentes (α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol).
3. Os componentes (α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol) não alteraram a capacidade fagocítica da célula hospedeira.
4. O efeito anti-*Leishmania amazonensis* dos componentes (α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol) é independente da produção de Óxido Nítrico.
5. Os componentes (α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol) são capazes de modificar o perfil lipídico das formas promastigotas de *L. amazonensis*.

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, I., DE QUEIROZ, A. T. L., KIRSTEIN, O. D., NASEREDDIN, A., HORWITZ, B. Z., HAILU, A., SALAH, I., MOTA, T.F., FRAGA, D. B. M., VERAS, P. S. T., POCHE, D., POCHE, R., YESZHANOV, A, TORRES-POCHE, C. B. Z., WARBURG, A. Plant-feeding phlebotomine sand flies, vectors of leishmaniasis, prefer *Cannabis sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 46, p. 11790-11795, 2018.
- ABDELADHIM, M., KAMHAWI, S., VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691-703, 2014.
- ABDOLRAHIMZADEH, H., BOLANDPARVAZ, S., ABBASI, H. R., DEGHANHALILI, M., PAYDAR, S., DEGHANIAN, A., ZARE, M. Antimicrobial Survey of Local Herbal Drugs against *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients Admitted to a Level-I Trauma Center. **Bulletin of Emergency & Trauma**, v. 6, n.4, p.355, 2018.
- ABEBE, T., HAILU, A., WOLDEYES, M., MEKONEN, W., BILCHA, K.; CLOKE, T., FRY, L., SEICH AL BASATENA, N.K., CORWARE, K., MODOLELL, M. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1684, 2012.
- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS (ABC). **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <http://www.abc.org.br/atuacao/nacional/grupos-de-estudos/doencas-negligenciadas/>. Acesso em 09 de Março de 2019.
- ADLER-MOORE, J., PROFFITT, R. T. AmBisome: Liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 21-30, 2002
- ALINA C.-M.C., ROCÍO R.-L., AURELIO R.-M.M., MARGARITA C.-M.M., ANGÉLICA R.-G., RUBÉN J.-A. Chemical Composition and In vivo Anti-inflammatory Activity of *Bursera morelensis* Ramírez Essential Oil. **J. Essent. Oil Bear. Plants**. v. 17, p. 758–768, 2014;
- ALLMANN, S., MAZET, M., ZIEBART, N., BOUYSSOU, G., FOUILLEN, L., DUPUY, J. W., ... & BOSCHART, M. Triacylglycerol storage in lipid droplets in procyclic *trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114628, 2014.
- ALVAR, J., VELEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., MARGRIET DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AMARAL, M. P., BRAGA, F. A., PASSOS, F. F., ALMEIDA, F. R., OLIVEIRA, R. C., CARVALHO, A. A., OLIVEIRA, F. A. Additional evidence for the anti-inflammatory properties of the essential oil of *Protium heptaphyllum* resin in mice and rats. **Lat Am J Pharm**, v. 28, p. 775-782, 2009.
- AMATO, V. S., TUON, F. F., BACHA, H. A., NETO, V. A., NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis. Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. **Acta tropica**, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.

AMATO, V. S., TUON, F. F., IMAMURA, R., ABEGAO DE CAMARGO, R., DUARTE, M. I., & NETO, V. A. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p. 1026-1034, 2009.

AMATO, V., AMATO, J., NICODEMO, A., UIP, D., AMATO-NETO, V., & DUARTE, M. (1998, August). Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. In *Annales de Dermatologie et de Venereologie* (Vol. 125, No. 8, pp. 492-495).

ANDRADE, H. M. TOLEDO, V. P. C. P., PINHEIRO, M. B., GUIMARÃES, T. M. P. D., OLIVEIRA, N. C., CASTRO, J. A., SILVA, A. S. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 83-90, 2011.

ANDRADE-OCHOA S, NEVÁREZ-MOORILLÓN GV, SÁNCHEZ-TORRES LE, VILLANUEVA-GARCÍA M, SÁNCHEZ-RAMÍREZ BE, RODRÍGUEZ-VALDEZ LM, RIVERA-CHAVIRA B. E. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **BMC Complement Altern Med**. v. 23, n. 15, p. 332, 2015

ARAÚJO D.A.O.V., TAKAYAMA C., DE-FARIA F.M., SOCCA E.A.R., DUNDER R.J., MANZO L.P., LUIZ-FERREIRA A., SOUZA-BRITO A.R.M. *Potium heptaphyllum* on experimental gastric ulcer models in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 721-729, 2011.

AREVALO, I., TULLIANO, G., QUISPE, A., SPAETH, G., MATLASHEWSKI, G., LLANOS-CUENTAS, A., & POLLACK, H. Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 12, p. 1549-1554, 2007

AREVALO, I., WARD, B., MILLER, R., MENG, T. C., NAJAR, E., ALVAREZ, E., ALEJANDRO, L. C. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. **Clinical infectious diseases**, v. 33, n. 11, p. 1847-1851, 2001.

ASBAGHIAN S., SHAFAGHAT A., ZAREA K., KASIMOV F., SALIMI F. Comparison of volatile constituents, and antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Thymus caucasicus*, *T. kotschyanus* and *T. vulgaris*. **Nat. Prod. Commun**, v.6, p. 137–140, 2011.

ASTANI, A., REICHLING, J., SCHNITZLER, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 24, n. 5, p. 673-679, 2010.

ASTE, N. et al. Intralesional treatment of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **British Journal of Dermatology**, v. 138, n. 2, p. 370-371, 1998.

BACELLAR, O., LESSA, H., SCHRIEFER, A., MACHADO, P., RIBEIRO DE JESUS, A., DUTRA, W. O., GOLLOB, K. J., CARVALHO, E. M. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.

- BALANÑA-FOUCE, R., REGUERA, R.M., CUBRÍA, J.C., ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.** v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.
- BALASEGARAM, M., RITMEIJER, K., LIMA, M. A., BURZA, S., ORTIZ GENOVESE, G., MILANI, B., CHAPPUIS, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, 2012.
- BARBOSA, M.A., ALEXANDRE-PIRES, G., SOARES-CLEMENTE, M., MARQUES, C., RODRIGUES, O.R., DE BRITO, T.V., DA FONSECA, I.P., ALVES, L.C., SANTOS-GOMES, G.M. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **Journal of comparative pathology**, v. 145, n. 4, p. 336-344, 2011.
- BASSELIN, M., COOMBS, G. H., BARRETT, M. P. Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 109, n. 1, p. 37-46, 2000.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BATES, P. A., ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004
- BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2014.
- BEST, M. P., ASH, A., BERGFELD, J., BARRETT, J. The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. **Veterinary parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 292-295, 2014.
- BLOWMAN, K., MAGALHÃES, M., LEMOS, M. F. L., CABRAL, C., PIRES, I. M. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.
- BONJARDIM L. R. , CUNHA E. S, GUIMARÃES A. G, SANTANA M. F, OLIVEIRA M. G, SERAFINI M. R, ARAÚJO A. A, ANTONIOLLI A. R, CAVALCANTI S. C, SANTOS M. R, QUINTANS-JÚNIOR L. J. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of p-cymene in mice. **Z. Naturforsch C**. v. 67, n. 1-2, p. 15-21, 2012.
- BOUZENNA, H., HFAIEDH, N., GIROUX-METGES, M. A., ELFEKI, A., & TALARMIN, H. Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 961-968, 2017
- BRUCHHAGE, K. L., KOENNECKE, M., DRENCKHAN, M., PLÖTZE-MARTIN, K., PRIES, R., WOLLENBERG, B. 1, 8-cineol inhibits the Wnt/ β -catenin signaling pathway through GSK-3 dephosphorylation in nasal polyps of chronic rhinosinusitis patients. **European journal of pharmacology**, v. 835, p. 140-146, 2018.
- BUATES, S., MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. 6, p. 1485-1494, 1999.
- BURZA, S., CROFT, S. L., BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 15, n. 392(10151), p. 951-970, 2018.
- BURZA, S., MAHAJAN, R., SANZ, M. G., SUNYOTO, T., KUMAR, R., MITRA, G., & LIMA, M. A. HIV and visceral leishmaniasis coinfection in Bihar, India: an underrecognized

and underdiagnosed threat against elimination. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 4, p. 552-555, 2014.

BURZA, S., NABI, E., MAHAJAN, R., MITRA, G., LIMA M. A. One-year follow-up of immunocompetent male patients treated with miltefosine for primary visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Clinical infectious diseases**, v. 57, n. 9, p. 1363-1364, 2013.

CALVOPINA, M., GOMEZ, E. A., SINDERMANN, H., COOPER, P. J., HASHIGUCHI, Y. Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1074-1077, 2006.

CARNEIRO DE FREITAS, J. C., SOUSA NUNES-PINHEIRO, D. C., & AMARAL DE ABREU, C. R. Geographical variation in clinical signs and prevalence of *Leishmania sp.* infection among dogs in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n. 3, 2010.

CARRILLO, E., MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 67-70, 2009.

CARVALHO, E. M., BARRAL, A., COSTA, J. M., BITTENCOURT, A., MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 56, p. 315–325, 1994.

CARVALHO, E. M., BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., BARRAL-NETTO, M., BADARO, R., ROCHA, H., & JOHNSON JR, W. D. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 535-540, 1992.

CASEY, A. L., KARPANEN, T. J., CONWAY, B. R., WORTHINGTON, T., NIGHTINGALE, P., WATERS, R., ELLIOTT, T. S. J. Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 278, 2010.

CASTELLANO, L. R., FILHO, D. C., ARGIRO, L., DESSEIN, H., PRATA, A., DESSEIN, A., RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

CASTELLUCCI, L., JAMIESON, S. E., ALMEIDA, L., OLIVEIRA, J., GUIMARAES, L. H., LESSA, M., FAKIOLA, M., JESUS, A. R., NANCY MILLER, E., CARVALHO, E. M., BLACKWELL, J. M. Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection, genetics and evolution**, v. 12, n. 5, p. 1102-1110, 2012.

CAVALIERO, T., ARNOLD, P., MATHIS, A., GLAUS, T., HOFMANN-LEHMANN, R., DEPLAZES, P., 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 13, n. 4, p. 330-334, 1999.

CAYMAN CHEMICAL. **SAFETY DATA SHEET**. 2017/2018. Disponível em: <https://www.caymanchem.com/msdss/23159m.pdf> (p-cimeno), <https://www.caymanchem.com/msdss/21576m.pdf> (α -pineno), <https://www.caymanchem.com/msdss/22183m.pdf> (1,8-cineol). Acesso em 11 de Março de 2019.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). **Neglected Tropical Diseases**. 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2018.

CHARLAB, R., VALENZUELA, J. G., ROWTON, E. D., & RIBEIRO, J. M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 15155-15160, 1999.

CHAWLA, B., JHINGRAN, A., PANIGRAHI, A., STUART, K. D., MADHUBALA, R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin-susceptible-resistant *Leishmania donovani*. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26660, 2011.

CHEN, W., LIU, Y., LI, M., MAO, J., ZHANG, L., HUANG, R., YE, L. ANTI-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. **Journal of pharmacological sciences**, v. 127, n. 3, p. 332-338, 2015.

CHIU, C. C., KEELING, C. I., & BOHLMANN, J. Toxicity of pine monoterpenes to mountain pine beetle. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8858, 2017.

CIFTCI O, OZDEMIR I, TANYILDIZI S, YILDIZ S, OGUZTURK H. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1, 8-cineole against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. **Toxicol. Ind Health**, v. 27, n. 5, p. 447-53, 2011.

COLOMBO, F. A., ODORIZZI, R. M., LAURENTI, M. D., GALATI, E. A., CANAVEZ, F., PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology research**, v. 109, n. 2, p. 267-274, 2011.

CORTÁZAR, T. M., COOMBS, G. H., WALKER, J. *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. **Experimental parasitology**, v. 116, n. 4, p. 475-482, 2007.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232-242, 2011.

COSTA, D. N. C. C., BERMUDI, P. M. M., RODAS, L. A. C., NUNES, C. M., HIRAMOTO, R. M., TOLEZANO, J. E., CIPRIANO R. S., CARDOSO G. C. D., CODEÇO C. T., NETO, F. C. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de saúde pública**, v. 52, p. 92, 2018.

COSTA, S., CAVADAS, C., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L., DO CÉU SOUSA, M. In vitro susceptibility of *Trypanosoma brucei brucei* to selected essential oils and their major components. **Experimental parasitology**, v. 190, p. 34-40, 2018.

COTRINA, J. F., INIESTA, V., MONROY, I., BAZ, V., HUGNET, C., MARAÑÓN, F., ALONSO, C. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, n. 15, p. 1972-1982, 2018.

COURA, F. M., PASSOS, S. K. P., PELEGRINO, M. D. O. F., LEME, F. D. O. P., PAZ, G. F., GONTIJO, C. M. F., COSTA-VAL, A. P. D. Serological, molecular, and microscopic

detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 570-574, 2018.

COURA-VITAL, W., DE ALMEIDA LEAL, G. G., MARQUES, L. A., DA COSTA PINHEIRO, A., CARNEIRO, M., REIS, A. B. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0208613, 2018.

COURTENAY O., KOVACIC V., GOMES P. A., GARCEZ L. M., QUINNELL R. J. A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis. **Medical and veterinary entomology**, v. 23, n. 3, p. 245-256, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**. v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2014.

CRISTANI M, D'ARRIGO M, MANDALARI G, CASTELLI F, SARPIETRO MG, MICIELI D, VENUTI V, BISIGNANO G, SAIJA A, TROMBETTA D J AGRIC. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Food Chem**, v. 55, n. 15, p. 6300-8, 2007.

CROFT, S. L., OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011.

CROFT, S. L., YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

DA FRANCA RODRIGUES, K. A., AMORIM, L. V., DIAS, C. N., MORAES, D. F. C., CARNEIRO, S. M. P., & DE AMORIM CARVALHO, F. A. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.

DAMASCENO, M. D. B. M. V., SANTOS, S. A. A. R., BARBOSA, T. M., ARAÚJO, J. R. C., VIEIRA-NETO, A. E., WONG, D. V. T., CAMPOS, A. R. Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 247-254, 2017

DE GROOT, ANTON C.; SCHMIDT, ERICH. Essential oils, part III: chemical Composition. **Dermatitis**, v. 27, n. 4, p. 161-169, 2016.

DE LIRA MOTA KS, DE OLIVEIRA PEREIRA F, DE OLIVEIRA WA, LIMA IO, DE OLIVEIRA LIMA E. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. **Molecules**. v. 17, n. 12, p. 14418-33, 2012.

DE MACEDO-SILVA, S. T., URBINA, J. A., DE SOUZA, W., & RODRIGUES, J. C. F. In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83247, 2013.

DE MENEZES, J. P. B., GUEDES, C. E. S., PETERSEN, A. L. D. O. A., FRAGA, D. B. M., VERAS, P. S. T. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DE OLIVEIRA T. M, DE CARVALHO R. B, DA COSTA I. H, DE OLIVEIRA G. A, DE SOUZA A. A, DE LIMA S. G, DE FREITAS R. M. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. **Pharm Biol**, v. 53, n. 3, p. 423-8, 2015

DE SANTANA, M. F. , GUIMARÃES A. G, CHAVES D. O, SILVA J. C, BONJARDIM L. R, DE LUCCA JÚNIOR W, FERRO J. N, BARRETO E. D. E. O, DOS SANTOS F. E,

SOARES M. B, VILLARREAL C. F, QUINTANS J. D. E S, QUINTANS-JÚNIOR L. J. The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 11, p. 1583-1590, 2015.

DHAMA, K., CHAKRABORTY, S., KAPOOR, S., TIWARI, R., KUMAR, A., DEB, R., NATESAN, S. One world, one health-veterinary perspectives. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 1, n. 1, p. 5-13, 2013.

DI MATTIA, D., FONDEVILA, D., ABRAMO, F., FONDATI, A. A retrospective histopathological, immunohistochemical and molecular study of the presence of *Leishmania spp.* in the skin of cats with head and neck ulcerative dermatitis. **Veterinary dermatology**, v. 29, n. 3, p. 212-e76, 2018.

DIAZ, N. L., ARVELÁEZ, F. A., ZERPA, O., & TAPIA, F. J. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology: Experimental dermatology**, v. 31, n. 1, p. 114-117, 2006.

DIRO, E., BLESSON, S., EDWARDS, T., RITMEIJER, K., FIKRE, H., ADMASSU, H., SOIPEI, P. A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006988, 2019.

DIRO, E., RITMEIJER K, BOELAERT M, ALVES F, MOHAMMED R, ABONGOMERA C, RAVINETTO R, DE CROP M, FIKRE H, ADERA C, COLEBUNDERS R, VAN LOEN H, MENTEN J, LYNEN L, HAILU A AND VAN GRIENSVEN J. Use of pentamidine as secondary prophylaxis to prevent visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients, the first twelve months of a prospective cohort study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004087, 2015

DOGAN, G., KARA, N., BAGCI, E., & GUR, S. Chemical composition and biological activities of leaf and fruit essential oils from *Eucalyptus camaldulensis*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 72, n. 11-12, p.483-489, 2017.

DOS ANJOS, J. L. V., DE SOUSA NETO, D., ALONSO, A. Effects of 1, 8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum. **International journal of pharmaceutics**, v. 345, n. 1-2, p. 81-87, 2007.

DOS SANTOS CAVALCANTI, A., ALVES, M. D. S., SILVA, L. C. P. D., PATROCÍNIO, D. D. S., SANCHES, M. N., CHAVES, D. S. D. A., & SOUZA, M. A. A. D. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 356-362, 2015.

DOS SANTOS SALES, V., MONTEIRO, Á. B., DE ARAÚJO DELMONDES, G., DO NASCIMENTO, E. P. Antiparasitic Activity and Essential Oil Chemical Analysis of the *Piper Tuberculatum* Jacq Fruit. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 17, n. 1, p. 268, 2018.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996

ECHCHAKERY, M., CHICHARRO, C., BOUSSAA, S., NIETO, J., CARRILLO, E., SHEILA, O., BOUMEZZOUGH, A. Molecular detection of *Leishmania infantum* and

Leishmania tropica in rodent species from endemic cutaneous leishmaniasis areas in Morocco. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 454, 2017.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v.21, n. 4, p. 308-323, 2007.

EDWARDS, L. Imiquimod in clinical practice. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 1, p. S12-S17, 2000.

EEDY, D. J. Imiquimod: a potential role in dermatology?. **British Journal of Dermatology**, v. 147, n. 1, p. 1-6, 2002.

EL HASSAN, A. M., GHALIB, H. W., ZIJLSTRA, E. E., ELTOUM, I. A., SATTI, M., ALI, M. S., ALI, H. M. Post kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: clinical features, pathology and treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 245-248, 1992

ELSHAFIE, HAZEM S.; CAMELE, IPPOLITO. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

ESCOBAR, P., MILENA LEAL, S., HERRERA, L. V., MARTINEZ, J. R., & STASHENKO, E. (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY LETIFEND (EMA). **Summary of Product Characteristics**. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/003865/WC500207742.pdf; 2017. Acesso em Janeiro de 2019.

FERNANDES A. P., COSTA M. M., COELHO E. A., MICHALICK M. S., DE FREITAS E., MELO M. N., TAFURI W. L., RESENDE DDE M., HERMONT V., ABRANTES CDE F., GAZZINELLI R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania)* chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FIROOZ, A., KHAMESIPOUR, A., GHOORCHI, M. H., NASSIRI-KASHANI, M., ESKANDARI, S. E., KHATAMI, A., DOWLATI, Y. Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. **Archives of dermatology**, v. 142, n. 12, p. 1575-1579, 2006.

FOE F. M. C., NYEGUE M. A., KAMDEM S. L. S., ESSAMA R. H. S., ETOA F. Chemical composition, antioxidant effects and antimicrobial activities of some spices' essential oils on food pathogenic bacteria. **Afr. J. Biotechnol.** V.15, p. 649–656, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Substances Generally Recognized as Safe Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption**. C.F.R 2006. Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.515>. acesso em 08 janeiro de 2018.

FREITAS, J.C., NUNES-PINHEIRO, D.C., ABREU, C.R. Geographical variation in clinical signs and prevalence of *Leishmania* sp. infection among dogs in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 3, 2010.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

FURONES, A. D., GALLEGO, F. C., ASENSI-DIEZ, R. Hearing loss associated with paromomycin treatment in a patient with visceral leishmaniasis. **Farmacia hospitalaria: organo oficial de expresion cientifica de la Sociedad Espanola de Farmacia Hospitalaria**, v. 41, n. 3, p. 433, 2017.

GARCÍA, N., MORENO, I., ALVAREZ, J., DE LA CRUZ, M. L., NAVARRO, A., PÉREZ-SANCHO, M. Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. **BioMed research international**, v. 2014, 2014

GAZE, S. T., DUTRA, W. O., LESSA, M., LESSA, H., GUIMARAES, L. H., JESUS, A. R., CARVALHO, L. P., MACHADO, P., CARVALHO, E. M., GOLLOB, K. J. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a non balanced monocyte population. **Scandinavian journal of immunology**, v. 63, n. 1, p. 70-78, 2006.

GHALIB, H. W., PIUVEZAM, M. R., SKEIKY, Y. A., SIDDIG, M., HASHIM, F. A., EL-HASSAN, A. M., REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 1, p. 324-329, 1993.

GHORBANI, M., FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 25, 2018.

GIRGLA, H. S., MARSDEN, R. A., SINGH, G. M., RYAN, T. J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **British Journal of Dermatology**, v. 97, n. 3, p. 307-311, 1977.

GLANS, H., DOTEVALL, L., SÖBIRK, S. K., FÄRNERT, A., & BRADLEY, M. Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996–2016: a retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 632, 2018.

GOMES, R., OLIVEIRA, F., TEIXEIRA, C., MENESES, C., GILMORE, D. C., ELNAIEM, D. E., KAMHAWI, S., VALENZUELA, J. G. Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted *Leishmania* conferring ulcer-free protection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 12, p. 2735-2743, 2012.

GOTO, H., LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GOYAL, V., MAHAJAN, R., PANDEY, K., SINGH, S. N., SINGH, R. S., STRUB-WOURGAFT, N., BALASEGARAM, M. Field safety and effectiveness of new visceral leishmaniasis treatment regimens within public health facilities in Bihar, India. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006830, 2018.

GOYAL, V., MAHAJAN, R., PANDEY, K., SINGH, S. N., SINGH, R. S., STRUB-WOURGAFT, N., BALASEGARAM, M. Field safety and effectiveness of new visceral leishmaniasis treatment regimens within public health facilities in Bihar, India. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006830, 2018.

GRADONI, L., Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. *Veterinary parasitology*, v. 208, n. 1-2, p. 94-100, 2015.

GRAMICCIA M., GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International journal for parasitology*, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.

H., GALVANI A.P., GAMBHIR M., GURARIE D., IRVINE M.A., JERVIS S., KEELING M.J., KELLY-HOPE L., KING C., LEE B.Y., LE RUTTE E.A, LIETMAN T.M., NDEFFO-MBAH M., MEDLEY G.F., MICHAEL E. Quantitative analyses and modelling to support achievement of the 2020 goals for nine neglected tropical diseases. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 630, 2015.

HALL, B. S., BOT, C., WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.

HARMS G, SCHÖNIAN G, FELDMEIER H. Leishmaniasis in Germany. *Emerging infectious diseases*, v. 9, n. 7, p. 872, 2003.

HASHIGUCHI, Y., GOMEZ, E. L., KATO, H., MARTINI, L.R., VELEZ, L.N., UEZATO, H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical medicine and health*, v. 44, n. 1, p. 2, 2016.

HEJAZI, S., HOSEINI, S., JAVANMARD, S., ZARKESH, S., KHAMESIPOUR, A. Interleukin-10 and transforming growth factor- β in early and late lesions of patients with *Leishmania major* induced cutaneous leishmaniasis. *Iranian journal of parasitology*, v. 7, n. 2, p. 53, 2012.

HEMMI, H., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., SATO, S., SANJO, H., HOSHINO, K., AKIRA, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signalling pathway. *Nature immunology*, v. 3, n. 2, p. 196, 2002.

HERRERO-JÁUREGUI, C., CASADO, M. A., DAS GRAÇAS BICHARA ZOGHBI, M., CÉLIA MARTINS-DA-SILVA, R. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. *Chemistry & biodiversity*, v. 8, n. 4, p. 674-685, 2011.

HOLLINGSWORTH T.D., ADAMS E.R., ANDERSON R.M., ATKINS K., BARTSCH S., BASÁÑEZ M., BEHREND M., BLOK D.J., CHAPMAN L.A.C., COFFENG L., COURTENAY O., CRUMP R.E., DE VLAS S.J, DOBSON A., DYSON L., FARKAS

HUANG, X., XIAO, Y., KÖLLNER, T. G., ZHANG, W., WU, J., WU, J., ZHANG, Y. Identification and characterization of (E)- β -caryophyllene synthase and α/β -pinene synthase potentially involved in constitutive and herbivore-induced terpene formation in cotton. *Plant physiology and biochemistry*, v. 73, p. 302-308, 2013.

INICIATIVA DE MEDICAMENTOS PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS (DNDi). **Pivotal Study of Fexinidazole for Human African Trypanosomiasis in Stage 2**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01685827>. Acesso em 10 de Março de 2019.

INICIATIVA DE MEDICAMENTOS PARA DOENÇAS NEGLIGENCIADAS (DNDi). **Trial to Determine Efficacy of Fexinidazole in Visceral Leishmaniasis Patients in Sudan**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01980199>. Acesso em 10 de Março de 2019.

IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P., JÚNIOR, V. F. V., & NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural product reports**, v. 28, n. 4, p.809-823, 2011.

JAMIL, K. M., HAQUE, R., RAHMAN, R., FAIZ, M. A., BHUIYAN, A. T. M. R. H., KUMAR, A., DESJEUX, P. Effectiveness study of paromomycin IM injection (PMIM) for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004118, 2015.

JENNINGS, F. W.; URQUHART, G. M. The use of the 2 substituted 5-nitroimidazole, fexinidazole (Hoe 239) in the treatment of chronic *T. brucei* infections in mice. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 69, n. 5, p. 577-581, 1983.

JHA S. N., SINGH N. K., JHA T. K. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. The Journal of the **Association of Physicians of India**, v. 39, n. 4, p. 314-316, 1991.

JHA, T. K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 389, 2006.

JOAS, J., VULCAIN, E., DESVIGNES, C., MORALES, E., LÉCHAUDEL, M. Physiological age at harvest regulates the variability in postharvest ripening, sensory and nutritional characteristics of mango (*Mangifera indica* L.) cv. Cogshall due to growing conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 6, p. 1282-1290, 2012.

JOGLEKAR M.M., PANASKAR S.N., ARVINDEKAR A.U. Inhibition of advanced glycation end product formation by cymene—A common food constituent. **J. Funct. Foods**. V. 6, p. 107–115, 2014.

JONES, K.E.; PATE, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J.L.; DASZAK, F. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990, 2008.

JUERGENS, U. R., DETHLEFSEN, U., STEINKAMP, G., GILLISSEN, A., REPGES, R., VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory medicine**, v. 97, n. 3, p. 250-256, 2003.

JUERGENS, U. R., STÖBER, M., SCHMIDT-SCHILLING, L., KLEUVER, T., VETTER, H. Antiinflammatory effects of euclyptol (1.8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **European journal of medical research**, v. 3, p. 407-412, 1998.

KAISER, B., VOGG, G., FÜRST, U. B., & ALBERT, M. Parasitic plants of the genus *Cuscuta* and their interaction with susceptible and resistant host plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 45, 2015.

KAISER, M., MÄSER, P., TADOORI, L. P., IOSET, J. R., & BRUN, R. Antiprotozoal activity profiling of approved drugs: a starting point toward drug repositioning. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015.

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

KAMTE, S. L. N., RANJBARIAN, F., CIANFAGLIONE, K., SUT, S., DALL'ACQUA, S., BRUNO, M., HOFER, A. Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in

essential oils from the Apiaceae family. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.156, p. 154-165, 2018.

KARAKUŞ, M., NASEREDDIN, A., ONAY, H., KARACA, E., ÖZKEKLIKÇI, A., JAFFE, C. L., KUHL, K., ÖZBILGIN, A., ERTABAKLAR, H., DEMIR, S., ÖZBEL, Y., TÖZ S. Epidemiological analysis of *Leishmania tropica* strains and giemsa-stained smears from Syrian and Turkish leishmaniasis patients using multilocus microsatellite typing (MLMT). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005538, 2017.

KARTHIKEYAN, R., KANIMOZHI, G., PRASAD, N. R., AGILAN, B., GANESAN, M., & SRITHAR, G. Alpha pinene modulates UVA-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in human skin epidermal keratinocytes. **Life sciences**, v. 212, p. 150-158, 2018.

KEHRL, W., SONNEMANN, U., & DETHLEFSEN, U. Therapy for acute nonpurulent rhinosinusitis with cineole: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **The Laryngoscope**, v.114, n. 4, p.738-742, 2004.

KENNEDY-FEITOSA, E., OKURO, R. T., RIBEIRO, V. P., LANZETTI, M., BARROSO, M. V., ZIN, W. A., VALENCA, S. S. Eucalyptol attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation and oxidative stress in the mouse. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 41, p. 11-18, 2016.

KHAN, A., VAIBHAV, K., JAVED, H., TABASSUM, R., AHMED, M. E., KHAN, M. M., SAFHI, M. M. 1, 8-cineole (eucalyptol) mitigates inflammation in amyloid Beta toxicated PC12 cells: relevance to Alzheimer's disease. **Neurochemical research**, v. 39, n.2, p. 344-352, 2014.

KIFER, D., V., & M. Š. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1, 8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. **The Journal of antibiotics**, v. 69, n. 9, p. 689, 2016.

KIM, D. S., LEE, H. J., JEON, Y. D., HAN, Y. H., KEE, J. Y., KIM, H. J., KIM, S. J. Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF-κB pathway in mouse peritoneal macrophages. **The American journal of Chinese medicine**, v. 43, n. 04, p. 731-742, 2015.

KORDALI, S. , AHMET C., HAKAN O., RAMAZAN C., MEMIS K., EBRU M. Antifungal, Phytotoxic and Insecticidal Properties of Essential Oil Isolated from Turkish *Origanum Acutidens* and Its Three Components, Carvacrol, Thymol and P-Cymene. **Bioresource Technology** 99 (18). 2008.

KOVAR K. A, GROPPER B., FRIESS D, AMMON H. P. T. Blood levels of 1, 8-cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil. **Planta Medica**. V. 53, n.4, p. 315-18, 1987.

KPOVIESSI, B. G. K., KPOVIESSI, S. D., LADEKAN, E. Y., GBAGUIDI, F., FRÉDÉRICH, M., MOUDACHIROU, M., BERO, J. In vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activities of crude extracts and essential oils of *Ocimum gratissimum* Linn from Benin and influence of vegetative stage. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1417-1423, 2014.

KUMAR, R., BUMB, R. A., ANSARI, N. A., MEHTA, R. D., SALOTRA, P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 5, p. 896-901, 2007.

KUMARI, S., PUNDIR, S., PRIYA, P., JEENA, G., PUNETHA, A., CHAWLA, K., YADAV, G. EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. *Database (Oxford)*, v. 2014, 2014.

KUMMER R., ESTEVÃO-SILVA C.F., BASTOS R.L., GRESPAN R., DE SOUZA SILVA-COMAR F.M., SILVA E.L., SPIRONELLO R.A., ROCHA B.A., BERSANI-AMADO C.A., CUMAN R.K.N. Effect of p-cymene on chemotaxis, phagocytosis and leukocyte behaviors. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, v. 8, p. 20–27, 2015.

LANA LEJ, DA SILVA RK, KOZHEVNIKOV IV, GUSEVSKAYA EV. Synthesis of 1, 8-cineole and 1,4-cineole by isomerisation of α -terpineol catalyzed by heteropoly acid. *J. Mol. Catal. A Chem.* v. 259, n. 1,p. 99-102, 2006.

LEE, H. S., PARK, D. E., SONG, W. J., PARK, H. W., KANG, H. R., CHO, S. H., SOHN, S. W. Effect of 1,8-cineole in dermatophagoides pteronyssinus-stimulated bronchial epithelial cells and mouse model of asthma. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, n. 6, p. 946-952, 2016.

LEE, J.H., B.K. LEE, J.H. KIM, S.H. LEE AND S.K. HONG. Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obusa*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 391–396, 2009

LEHANE, M. J. The biology of blood-sucking in insects. **Cambridge University Press**, 2005.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British medical journal*, v. 1, n. 2213, p. 1252, 1903.

LEITNER, M., KAISER, R., RASMUSSEN, M. O., DRIGUEZ, H., BOLAND, W., MITHÖFER, A. Microbial oligosaccharides differentially induce volatiles and signalling components in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry*, v. 69, n. 10, p. 2029-2040, 2008.

LI, Y., XU, Y. L., LAI, Y. N., LIAO, S. H., LIU, N., & XU, P. P. Intranasal co-administration of 1, 8-cineole with influenza vaccine provide cross-protection against influenza virus infection. *Phytomedicine*, v. 34, p. 127-135, 2017.

LIMA F.V., MALHEIROS A., OTUKI M.F., CALIXTO J.B., YUNES R.A., FILHO V.C., MONACHE F.D. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 3B, p. 578-582, 2005.

LIMA, A. S., MILHOMEM, M. N., MONTEIRO, O. S., ARRUDA, A. C. P., DE CASTRO, J. A. M., FERNANDES, Y. M. L., COSTA-JUNIOR, L. M. Seasonal analysis and acaricidal activity of the thymol-type essential oil of *Ocimum gratissimum* and its major constituents against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology research*, v. 117, n. 1, p. 59-65, 2018.

LINDOSO, J. A. L., MOREIRA, C. H. V., CUNHA, M. A., & QUEIROZ, I. T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. *HIV/AIDS (Auckland, NZ)*, v. 10, p. 193, 2018.

LOPES, V. V., BELO, V. S., PEREIRA, D. A., COELHO, M. B., PENA, H. P., ALVES, N. R., DA SILVA, E. S. IgG avidity index and complete blood count as biomarkers of clinical disease in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*. *Veterinary parasitology*, v. 261, p. 96-103, 2018.

- MACHADO, C. J. S., SILVA, E. G., VILANI, R. M. 2016. Use of an instrument of controversial public health policy: euthanasia of dogs contaminated by leishmaniasis in Brazil. **Saúde e Sociedade**, v. 25, n. 1, p. 247-258, 2016.
- MACHADO, P. R. L., PENNA, G. Miltefosine and cutaneous leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 25, n. 2, p. 141-144, 2012.
- MACHADO, P. R., ROSA, M. E., COSTA, D., MIGNAC, M., SILVA, J. S., SCHRIEFER, A., TEIXEIRA, M. M., BACELLAR, O., CARVALHO, E. M. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438-444, 2011.
- MAHMOUDVAND, H., DEZAKI, E. S., EZATPOUR, B., SHARIFI, I., KHEIRANDISH, F., & RASHIDIPOUR, M. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of *Pistacia vera* essential oil. **Planta Medica**, v. 82, n. 04, p. 279-284, 2016.
- MAIA C., L. CAMPINO. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in parasitology**, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011.
- MALAVIYA, P., PICADO, A., SINGH, S. P., HASKER, E., SINGH, R.P., BOELAERT, M., SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis in Muzaffarpur district, Bihar, India from 1990 to 2008. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e14751, 2011.
- MAROLI, M., PENNISI, M. G., DI MUCCIO, T., KHOURY, C., GRADONI, L., & GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 357-360, 2007.
- MARQUES, S. M., CAMPOS, P. P., CASTRO, P. R., CARDOSO, C. C., ANDRADE, S. P. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvascular research**, v. 82, n. 3, p. 246-252, 2011.
- MARSDEN, P. D. Letter from Brasilia: Mucocutaneous leishmaniasis. **BMJ. British medical journal**, v. 301, n. 6753, p. 656-657, 1990.
- MARTINDALE, W. H. Essential oil in relation to their antiseptic powers. **Purfum. Essent. Oil Rec.**, v. 1, p. 266-274, 1910.
- MATAN, NARUMOL; MATAN, NIRUNDORN; KETSA, SAICHOL. Enhanced inhibition of *Aspergillus niger* on sedge (*L. epirotonia articulata*) treated with heat-cured lime oil. **Journal of applied microbiology**, v. 115, n. 2, p. 376-381, 2013.
- MATEO, M., MAYNARD, L., VISCHER, C., BIANCIARDI, P., MIRÓ, G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitology research**, v. 105, n. 1, p. 155, 2009.
- MATHUR, R., DAS, R. P., RANJAN, A., SHAHA, C. (2015). Elevated ergosterol protects *Leishmania* parasites against antimony-generated stress. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 10, p. 4201-4213, 2015.
- MATTIN, M.J., SOLANO-GALLEGO, L., DHOLLANDER, S., AFONSO, A., BRODBELT, D.C. The frequency and distribution of canine leishmaniosis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 3, p. 410-419, 2014.

MCGWIRE B. S., SATOSKAR A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2013.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2013.

MECHERGUI K., JAOUADI W., COELHO J. P., KHOUJA M. L. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp glandulosum (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. **Ind. Crops Prod**, v. 90, p. 32–37, 2016.

MELBY, P. C., ANDRADE-NARVAEZ, F. J., DARNELL, B. J., VALENCIA-PACHECO, G., TRYON, V. V., PALOMO-CETINA, A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 3, p. 837-842, 1994.

MEYMANDI, S. S., JAVADI, A., DABIRI, S., MEYMANDI, M. S., NADJI, M. Comparative histological and immunohistochemical changes of dry type cutaneous leishmaniasis after administration of meglumine antimoniate, imiquimod or combination therapy. **Archives of Iranian Medicine (AIM)**, v. 14, n. 4, 2011

MILLÁN, J., FERROGLIO, E., SOLANO-GALLEGO, L., Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitology research**, v. 113, n. 6, p. 2005-2014, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS. 2016.** Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/leish/Ita_gve7ed_web_atual.pdf. Acessado em 31 Dezembro de 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF).** 2016 . Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_mediciniais_fitoterapicos.pdf. acesso em 06 de Fevereiro de 2019.

MIRANDA-VERASTEGUI, C., TULLIANO, G., GYORKOS, T. W., CALDERON, W., RAHME, E., WARD, B., MATLASHEWSKI, G. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 7, p. e491, 2009

MIRANDA-VERASTEGUI, C., TULLIANO, G., GYORKOS, T. W., CALDERON, W., RAHME, E., WARD, B., MATLASHEWSKI, G. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 7, p. e491, 2009

MITROPOULOU G, FITSIOU E, STAVROPOULOU E, PAPAVALASSILOPOULOU E, VAMVAKIAS M, PAPPA A, OREOPOULOU A, KOURKOUTAS Y. Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (dittany) essential oil. **Microb Ecol Health Dis**, v. 26, p. 26543, 2015;

MORADIN, N., DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 121, 2012.

MORAES, C. S., AGUIAR-MARTINS, K., COSTA, S. G., BATES, P. A., DILLON, R. J., & GENTA, F. A. Second Blood Meal by Female *Lutzomyia longipalpis*: Enhancement by

Oviposition and Its Effects on Digestion, Longevity, and *Leishmania* Infection. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

MUGNAINI L, NARDONI S, PISTELLI L, LEONARDI M, GIULIOTTI L, BENVENUTI MN, PISSERI F, MANCIANTI F. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to Trichophyton mentagrophytes. **Mycoses**. v. 56, n. 3, p. 333-7, 2013.

MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 6, p. 787-794, 2004.

MUSA, A. M., KHALIL, E. A., RAHEEM, M. A., ZIJLSTRA, E. E., IBRAHIM, M. E., ELHASSAN, I. M., MUKHTAR, M. M., EL HASSAN, A. M. The natural history of Sudanese post-kala-azar dermal leishmaniasis: clinical, immunological and prognostic. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 96, n. 8, p. 765-772, 2002.

MUSA, A., KHALIL, E., HAILU, A., OLOBO, J., BALASEGARAM, M., OMOLLO, R., ABUZAID, A. Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1674, 2012

NABAVI, S. M. Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: From farm to pharmacy. **Food chemistry**, v. 173, p. 339-347, 2015.

NADJIB BOUKHATEM, M., KAMELI, A., AMINE FERHAT, M., SAIDI, F., & MEKARNIA, M. ROSE. Geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v. 8, n. 1, p.22520, 2013.

NELSON, D. J., BUGGE, C. J., ELION, G. B., BERENS, R. L., MARR, J. J. Metabolism of pyrazolo (3, 4-d) pyrimidines in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania donovani*. Allopurinol, oxipurinol, and 4-aminopyrazolo (3, 4-d) pyrimidine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 10, p. 3959-3964, 1979.

NEVES, L. O., TALHARI, A. C., GADELHA, E. P. N., JÚNIOR, S., GUERRA, J. A. D. O., FERREIRA, L. C. D. L., TALHARI, S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NIKOLIĆ, B., VASILJEVIĆ, B., MITIĆ-ĆULAFIĆ, D., VUKOVIĆ-GAČIĆ, B., & KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J. Comparative study of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic activities of monoterpenes camphor, eucalyptol and thujone in bacteria and mammalian cells. **Chemico-biological interactions**, v. 242, p. 263-271, 2015.

NISSEN, L., ZATTA, A., STEFANINI, I., GRANDI, S., SGORBATI, B., BIAVATI, B., & MONTI, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 413-419, 2010.

NOLI, C., AUXILIA, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary dermatology**, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.

NOVAIS, F. O., CARVALHO, L. P., PASSOS, S., ROOS, D. S., CARVALHO, E. M., SCOTT, P., BEITING, D. P. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions

identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 1, p. 94-101, 2015.

NOYES, H., PRATLONG, F., CHANCE, M., ELLIS, J., LANOTTE, G., & DEDET, J. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. **Parasitology**, v. 124, n. 1, p. 17-24, 2002.

OLIVEIRA, F. A., VIEIRA-JÚNIOR, G. M., CHAVES, M. H., ALMEIDA, F. R., FLORÊNCIO, M. G., LIMA JR, R. C., RAO, V. S. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p.105-111, 2004.

OLIVEIRA, W. N., RIBEIRO, L. E., SCHRIEFFER, A., MACHADO, P., CARVALHO, E. M., BACELLAR, O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127-132, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA Saúde (OMS). Control of the leishmaniasis: **Report of the meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, Switzerland, 22-26 March 2010**. Vol. 9492010, 2010. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=04946FDC751C40A2534524D4291ECFFA?sequence=1. Acesso em 20 Dezembro de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**. 2018 Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5. Acesso em: 2 de Dezembro de 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Weekly epidemiological record (WER)**. 2015. Disponível em: <https://www.who.int/wer/2018/en/>. Acesso: 20 de dezembro de 2018.

ORTEGA, V., GIORGIO, S., DE PAULA, E. Liposomal formulations in the pharmacological treatment of leishmaniasis: A review. **Journal of liposome research**, v. 27, n. 3, p. 234-248, 2017.

OWENS, S. D., OAKLEY, D. A., MARRYOTT, K., HATCHETT, W., WALTON, R., NOLAN, T. J., NEWTON, A., STEURER, F., SCHANTZ, P., GIGER, U. 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

PAILA, Yamuna Devi; SAHA, Bhaskar; CHATTOPADHYAY, Amitabha. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 399, n. 3, p. 429-433, 2010.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. 2012. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 69, 2012.

PALUMBO, E. Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 147, 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas: Washington; Pan American Health Organization**. Disponível em:

http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34856/LeishReport6_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 5 de Janeiro de 2018.

PASSOS, S.R., RODRIGUES, T., DE, A., MADUREIRA, A.P., GIUNCHETTI, R.C., ZANINI, M.S. Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 5, p. 463-465, 2014.

PAULA, C. D. R. D., SAMPAIO, J. H. D., CARDOSO, D. R., SAMPAIO, R. N. R. A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-methyl-glucamine in a dose of 20mgSbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 365-371, 2003.

PAVLI, A., MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. e1032-e1039, 2010.

PEARSON, R. D., SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, p. 1-11, 1996.

PECETTI, L., TAVA, A., ROMANI, M., CECOTTI, R., MELLA, M. Variation in terpene and linear-chain hydrocarbon content in yarrow (*Achillea millefolium* L.) germplasm from the Rhaetian Alps, Italy. **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 10, p.2282-2294, 2012.

PEREIRA, L. I., DORTA, M. L., PEREIRA, A. J., BASTOS, R. P., OLIVEIRA, M. A., PINTO, S. A., GALDINO, H. JR., MAYRINK, W., BARCELOS, W., TOLEDO, V. P. Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/Leishmania antigens. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 3, p. 378-383, 2009

PETERS, N. C., DEBRABANT, A., SACKS, D. L. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002536, 2012.

PETERS, N. C., EGEN, J. G., SECUNDINO, N., DEBRABANT, A., KIMBLIN, N., KAMHAWI, S., LAWYER, P., FAY, M. P., GERMAIN, R. N., SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PIMENTA, P. F. P., SECUNDINO, N. F. C., BLANCO, E. E. N. Interação *Leishmania*-hospedeiro invertebrado. **Flebotomíneos no Brasil**. p. 275-289, 2003.

POLI, A., SOZZI, S., GUIDI, G., BANDINELLI, P., MANCIANTI, F. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 71, n. 4, p. 263-271, 1997.

POOT, J., JANSSEN, L.H., VAN KASTEREN-WESTERNENG, T.J., VAN DER HEIJDEN-LIEFKENS, K.H., SCHIJNS, V.E., HECKEROTH, A. Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 33, p. 4439-4446, 2009

PORRES-MARTÍNEZ, M., GONZÁLEZ-BURGOS, E., CARRETERO, M. E., & GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and

1, 8-cineole against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 71, n. 7-8, p. 191-199, 2016.

PORRES-MARTÍNEZ, M., GONZÁLEZ-BURGOS, E., CARRETERO, M. E., GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Major selected monoterpenes α -pinene and 1, 8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 6, p. 921-929, 2015.

RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology research**, v. 90, n. 1, p. S19-S39, 2003.

RAKSHANPOUR, A., MALMASI, A., MOHEBALI, M., NABIAN, S., MIRHENDI, H., ZAREI, Z., AZARM, A. Transmission of leishmania infantum by *rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs. **Iranian journal of parasitology**, v. 12, n. 4, p. 482, 2017.

RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2677-2686, 2005.

RAMESH, V., MUKHERJEE, A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 34, n. 2, p. 85-91, 1995.

RAMESH, V., MUKHERJEE, A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 34, n. 2, p. 85-91, 1995.

RANGEL, E. F., SOUZA, N. A., WERMELINGER, E. D., BARBOSA, A. F., ANDRADE, C. A. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longypalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Phychodidae), em condições experimentais. I. aspectos da alimentação de larvas e adultos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 431-438, 1986..

RAO V.S., MAIA J.L., OLIVEIRA F.A., LEMOS T.L.G., CHAVES M.H., SANTOS F.A. Composition and antinociceptive activity of the essential oil from *Protium heptaphyllum* resin. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1199-1202, 2007.

RATHER, M. A., DAR, B. A., DAR, M. Y., WANI, B. A., SHAH, W. A., BHAT, B. A., QURISHI, M. A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1185-1190, 2012.

RATTANACHAIKUNSOPON, P., PHUMKHACHORN, P. Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 5, p. 420-425, 2010.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 147, 2014.

REAL, F., FLORENTINO, P. T. V., REIS, L. C., RAMOS-SANCHEZ, E. M., VERAS, P. S. T., GOTO, H., MORTARA, R. A. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549-1564, 2014 RIBEIRO-GOMES, F. L.,

REARDON, A. J., ELLIOTT, J. A., & MCGANN, L. E. Investigating membrane and mitochondrial cryobiological responses of HUVEC using interrupted cooling protocols. **Cryobiology**, v. 71, n. 2, p. 306-317, 2015.

- REGUERA, R. M., MORAN, M., PEREZ-PERTEJO, Y., GARCIA-ESTRADA, C., & BALANA-FOUCE, R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 227, p. 98-114, 2016.
- REIS, L. P., RUSCHEL, A. R., COELHO, A. A., DA LUZ, A. S., & MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. Avaliação do potencial madeireiro na Floresta Nacional do Tapajós após 28 anos da exploração florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 30, n. 64, p. 265, 2010.
- RIBEIRO-SANTOS R., ANDRADE M., DE MELO N.R., DOS SANTOS F.R., DE ARAÚJO NEVES I., DE CARVALHO M.G., SANCHES-SILVA A. Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. **Ind. Crops Prod.**, v. 97, p. 201–210, 2017.
- RIDLEY, D. S., DE MAGALHAES, A.V., MARSDEN, P. D. Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of pathology**, v. 159, n. 4, p. 293-299, 1989.
- RIJAL, S., OSTYN, B., URANW, S., RAI, K., BHATTARAI, N. R., DORLO, T. P. C., BEIJNEN, J. H., VANAERSCHOT, M., DECUYPERE, S., DHAKAL, S. S., DAS, M. L., KARKI, P., SINGH, R., BOELAERT, M., DUJARDIN, J. C. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 11, p. 1530-1538, 2013.
- RITMEIJER, K., VEEKEN, H., MELAKU, Y., LEAL, G., AMSALU, R., SEAMAN, J., DAVIDSON, R. N. Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6, p. 668-672, 2001
- RIVERA-YAÑEZ, C. R., TERRAZAS, L. I., JIMENEZ-ESTRADA, M., CAMPOS, J. E., FLORES-ORTIZ, C. M., HERNANDEZ, L. B., CANALES-MARTINEZ, M. M. Anti-Candida Activity of Bursera morelensis Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene—An In Vitro Study. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2095, 2017.
- ROTUREAU, B., MORALES, M. A., BASTIN, P., SPÄTH, G. F. The flagellum–mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development?. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 5, p. 710-718, 2009.
- ROUSSEL, M., NACHER, M., FREMONT, G., ROTUREAU, B., CLYTI, E., SAINTE-MARIE, D., COUPPIE, P. Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 4, p. 307-314, 2006.
- SABATÉ, D., LLINÁS, J., HOMEDES, J., SUST, M., FERRER, L. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. **Preventive veterinary medicine**, v. 115, n. 1-2, p. 56-63, 2014.
- SABZEVARI, S., RAZMI, G., NAGHIBI, A., KHOSHNEGAH, J. Serological study on visceral leishmaniasis in asymptomatic stray dogs in Mashhad, Iran. **Archives of Razi Institute**, v. 72, n. 4, p. 231-235, 2017
- SABZEVARI, S., RAZMI, G., NAGHIBI, A., & KHOSHNEGAH, J. A molecular and
- SACKS, D., ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice. **Immunological reviews**, v. 201, n. 1, p. 225-238, 2004

SAHA, S., MONDAL, S., RAVINDRAN, R., BHOWMICK, S., MODAK, D., MALLICK, S., PRAMANIK, N. IL-10-and TGF- β -mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5592-5603, 2007.

SAMPATH, S., SUBRAMANI, S., JANARDHANAM, S., SUBRAMANI, P., YUVARAJ, A., CHELLAN, R. Bioactive compound 1, 8-Cineole selectively induces G2/M arrest in A431 cells through the upregulation of the p53 signaling pathway and molecular docking studies. **Phytomedicine**, 2018.

SANTOS F. A, R. V. S. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother Res.** v. 14, n. 4, p. 240-44, 2000.

SANTOS FA, RAO VS. 1, 8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci**, v.46, n.2, p. 331-7, 2001.

SAPRA B, JAIN S, TIWARY AK. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. **The AAPS journal**, v. 10, n. 1, p. 120, 2008.

SARAVOLATZ, L. D., BERN, C., ADLER-MOORE, J., BERENGUER, J., BOELAERT, M., DEN BOER, M., RITMEIJER, K. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 7, p. 917-924, 2006.

SAROUFIM, M., CHARAFEDDINE, K., ISSA, G., KHALIFEH, H., HABIB, R. H., BERRY, A., GHOSN, N., RADY, A., KHALIFEH, I. Ongoing epidemic of cutaneous leishmaniasis among Syrian refugees, Lebanon. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 10, p. 1712, 2014.

SATYAL, P., POWERS, C. N., PARDUCCI V, R., MCFEETERS, R. L., & SETZER, W. N. Chemical Composition, Enantiomeric Distribution, and Antifungal Activity of the Oleoresin Essential Oil of *Protium amazonicum* from Ecuador. **Medicines**, v. 4, n. 4, p.70, 2017.

SCALAS, D., MANDRAS, N., ROANA, J., TARDUGNO, R., CUFFINI, A. M., GHISSETTI, V., TULLIO, V. Use of *Pinus sylvestris* L.(Pinaceae), *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae), and *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae) essential oils and their main components to enhance itraconazole activity against azole susceptible/not-susceptible *Cryptococcus neoformans* strains. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 143, 2018.

SCHINK, A., NAUMOSKA, K., KITANOVSKI, Z., KAMPF, C. J., FRÖHLICH-NOWOISKY, J., THINES, E., LUCAS, K. Anti-inflammatory effects of cinnamon extract and identification of active compounds influencing the TLR2 and TLR4 signaling pathways. **Food & function**, v. 9, n. 11, p. 5950-5964, (2018).

SCHLEIN, Y., JACOBSON, R. L., MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 20, p. 9944-9948, 1992.

SCHUBACH, A., HADDAD, F., OLIVEIRA-NETO, M. P., DEGRAVE, W., PIRMEZ, C., GRIMALDI, G. JR., FERNANDES, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 3, p. 911-914, 1998.

SCHUBACH, A., MARZOCHI, M. C., CUZZI-MAYA, T., OLIVEIRA, A. V., ARAUJO, M. L., OLIVEIRA, A. L., PACHECO, R. S., MOMEN, H., CONCEICAO-SILVA, F., COUTINHO, S. G. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of

Leishmania (Viannia) braziliensis persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 6, p. 824-827, 1998.

SCORZA, BREANNA; CARVALHO, EDGAR; WILSON, MARY. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SERAFIM, T. D., COUTINHO-ABREU, I. V., OLIVEIRA, F., MENESES, C., KAMHAWI, S., VALENZUELA, J. G. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature microbiology**, p. 1, 2018..

SERENO D., HOLZMULLER P., MANGOT I., CUNY G., OUAISSI A., LEMESRE J. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.

SHAKED-MISHAN, P., ULRICH, N., EPHROS, M., ZILBERSTEIN, D. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3971-3976, 2001.

SHARIFI-RAD, J., SALEHI, B., SCHNITZLER, P., AYATOLLAHI, S. A., KOBARFARD, F., FATHI, M., SHARIFI-RAD, M. Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oil of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia royleana* Benth. and *Pulicaria vulgaris* Gaertn. **Cell Mol Biol (Noisy le Grand)**, v. 63, n. 8, 2017.

SHARIFI-RAD, M., SALEHI, B., SHARIFI-RAD, J., SETZER, W. N., & IRITI, M. *Pulicaria vulgaris* Gaertn. essential oil: an alternative or complementary treatment for Leishmaniasis. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, n. 8, p. 18-21, 2018.

SHAW, J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, 1997.

SHUKLA R, SINGH P, PRAKASH B, DUBEY NK. Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. **Food Control**, v.25, n.1, p. 27-33, 2012.

SIANI A.C., RAMOS M.F.S., DA MONTEIRO S.S., RIBEIRO-DOS-SANTOS R., SOARES R.O.A. Essential oils of the oleoresins from *Protium Heptaphyllum* growing in the Brazilian Southeastern and their cytotoxicity to neoplastic cells lines. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 3, p. 373-378, 2011.

SIANI, A. C., MORAES, R., & JUNIOR, V. F. V. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57-69, 1999.

SIANI, A. C., RAMOS, M. D. S., MENEZES-DE-LIMA JR, O., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., FERNADEZ-FERREIRA, E., SOARES, R. O. A., HENRIQUES, M. D. G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57-69, 1999.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S., SAMPAIO, A. L.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. 2000.

SILVA, A. R., SCHER, R., SANTOS, F. V., FERREIRA, S. R., CAVALCANTI, S. C., CORREA, C. B., DOLABELLA, S. S. Leishmanicidal activity and structure-activity relationships of essential oil constituents. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 815, 2017.

SILVA, F. L., OLIVEIRA, R. G., SILVA, T. M., XAVIER, M. N., NASCIMENTO, E. F., & SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, R. B. S., PORTO, M. L., BARBOSA, W. D. O., SOUZA, H. C. D., MARQUES, N. F. D. S. P., AZEVEDO, S. S., MELO, M. A. D. Seroprevalence and risk factors associated with canine visceral leishmaniasis in the State of Paraíba, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 683-688, 2018.

SINGH, G., DEY, C. S. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. **Acta tropica**, v. 103, n. 3, p. 172-185, 2007.

SINGH, N., MISHRA, B. B., BAJPAI, S., SINGH, R. K., & TIWARI, V. K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18-45, 2014.

SINGH, Nisha; KUMAR, Manish; SINGH, Rakesh Kumar. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SMELCEROVIC, A., DJORDJEVIC, A., LAZAREVIC, J., & STOJANOVIC, G. (2013). Recent advances in analysis of essential oils. **Current Analytical Chemistry**, 9(1), 61-70.

SOARES MCMS, DAMIANI CEN, MOREIRA CM, STEFANON I, VASSALLO DV. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Braz J Med Biol Res**. 2005;38(3):453-61.

SOLANO-GALLEGO L., RODRÍGUEZ-CORTÉS, A., INIESTA, QUINTANA L., PASTOR J., ESPADA J., ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2007

SOUMYA, N., KUMAR, S. I. S. SHIVAPRASAD, L. N. GORAKH, N. DINESH, K. K. SWAMY, S. SINGH. AMP-acetyl CoA synthetase from *Leishmania donovani*: Identification and functional analysis of 'PX4GK' motif. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 364-372, 2015.

SOUMYA, N., PANARA, M. N., NEERUPUDI, K. B., & SINGH, S. Functional analysis of an AMP forming acetyl CoA synthetase from *Leishmania donovani* by gene overexpression and targeted gene disruption approaches. **Parasitology international**, 66(1), 992-1002, 2017.

SOUZA, A. D., NUNES, V. L. B., BORRALHO, V. M., ISHIKAWA, E. A. Y. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. 359-365, 2009.

SOUZA, R. M. F., CARLOS, S. A., ROMERO, T. M. R., CAVALCANTE, G. A., LAHOZ DA SILVA, R. J. E. Essential oils from oleoresins of *Protium spp.* of the Amazon region. **Flavour and fragrance journal**, v. 15, n. 6, p. 383-387, 2000.

STEIGER, R. F. On the ultrastructure of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *brucei* in the course of its life cycle and some related aspects. **Acta tropica**, v. 30, n. 1, p. 64, 1973.

STIMPFL T., NAŠEL B., NAŠEL C., BINDER R., VYČUDILIK W., BUCHBAUER G. Concentration of 1, 8 cineole in blood during prolonged inhalation. **Chemical Senses**, v. 20, n.3, p. 349-50, 1995

STRAUSS-AYALI, D., BANETH, G., SHOR, S., OKANO, F., JAFFE, C. L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 1, p. 63-73, 2005.

SUNDAR S, MONDAL D, RIJAL, S., BHATTACHARYA, S., GHALIB, H., KROEGER, A., HARMS, G. Implementation research to support the initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal—the challenges for diagnosis and treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n. 1, p. 2-5, 2008.

SUNDAR S., MORE D. K., SINGH M. K., SINGH, V. P., SHARMA, S., MAKHARIA, A., MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical infectious diseases**, v. 31, n. 4, p. 1104-1107, 2000.

SUNDAR, S. AND CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237-252, 2015.

SUNDAR, S., JHA, T. K., THAKUR, C. P., SINHA, P. K., BHATTACHARYA, S. K. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571-2581, 2007.

SUNDAR, S., MURRAY, H, W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. 2005.

SUNDAR, S., SINGH, A. , RAI, M., PRAJAPATI, V. K., SINGH, A. K., OSTYN B., BOELAERT, M., DUJARDIN, J. C., CHAKRAVARTY J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012.

SUNDAR, S., SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481-489, 2018.

SUNDAR, S., SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 3, n. 3-4, p. 98-109, 2016.

SUNDAR, S., SINGH, A., TIWARI, A., SHUKLA, S., CHAKRAVARTY, J., RAI, M. Efficacy and safety of paromomycin in treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **ISRN parasitology**, v. 2014, 2014.

SUNDAR, S., SINHA, P. K., RAI, M., VERMA, D. K., NAWIN, K., ALAM, S., CHAKRAVARTY, J., VAILLANT, M., VERMA, M., PANDEY, K., KUMARI, P., SHEKHAR LAL, S., ARORA, R., SHARMA, B., ELLIS, S., STRUB-WOURGAFT, N., BALASEGARAM M., OLLIARO, P., DAS, P., MODABBER, F. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477-486, 2011.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 3, n. 5, p. 733, 2007.

TACCHINI-COTTIER, F., WEINKOPFF, T., LAUNOIS, P. Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 32, 2012.

TAMARGO, B., MONZOTE, L., PIÑÓN, A., MACHÍN, L., GARCÍA, M., SCULL, R., & SETZER, W. N. *In vitro* and *in vivo* evaluation of essential oil from *Artemisia absinthium* L. formulated in nanocochleates against cutaneous leishmaniasis. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 38, 2017

TEIXEIRA, D. E., BENCHIMOL, M., RODRIGUES, J. C. F., CREPALDI, P. H., PIMENTA, P. F. P., DE SOUZA, W. **Atlas didático: ciclo de vida da Leishmania**. 1º ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ. 2013. E-book.

THOMPSON, A., COOPER, J., INGRAM JR, L. L. Distribution of terpenes in heartwood and sapwood of loblolly pine. **Forest products journal**, v. 56, n. 7-8, p. 46-49, 2006.

TOMAI, M. A., MILLER, R. L., LIPSON, K. E., KIEPER, W. C., ZARRAGA, I. E., & VASILAKOS, J. P. Resiquimod and other immune response modifiers as vaccine adjuvants. **Expert review of vaccines**, v. 6, n. 5, p. 835-847, 2007.

TORREELE, E., TRUNZ, B. B., TWEATS, D., KAISER, M., BRUN, R., MAZUE, G., PECOUL, B. Fexinidazole—a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e923, 2010.

TORRES, M., BARDAGÍ, M., ROURA, X., ZANNA, G., RAVERA, I., FERRER, L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The veterinary journal**, v. 188, n. 3, p. 346-351, 2011.

TROTTA, T., FASANELLA, A., SCALTRITO, D., GRADONI, L., MITOLO, V., BRANDONISIO, O., ACQUAFREDDA, A., PANARO, M. A. 2010. Comparison between three adjuvants for a vaccine against canine leishmaniasis: *In vitro* evaluation of macrophage killing ability. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 33, n. 2, p. 175-182, 2010.

TUREK, C., STINTZING, F. C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.

TURETZ, M. L., MACHADO, P. R., KO, A. I., ALVES, F., BITTENCOURT, A., ALMEIDA, R. P., MOBASHERY, N., JOHNSON, W. D. JR., CARVALHO, E. M. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, 2002.

TWEATS, D., BOURDIN T. B., TORREELE, E. Genotoxicity profile of fexinidazole—a drug candidate in clinical development for human African trypanomiasis (sleeping sickness). **Mutagenesis**, v. 27, n. 5, p. 523-532, 2012.

U.S FOOD DRUG & DRUG ADMINISTRATION. CFR - Code of federal regulations title 21- chapter I--Food and Drug Administration. Department of health and human services. Subchapter B--food for human consumption (continued). Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=172.515>.

Acesso em 15 de Dezembro de 2018.

UNITED NATIONS HIGH COMMISSIONER FOR REFUGEES. **UNHCR country operations profile—Lebanon**. 2014. Disponível em: <http://www.unhcr.org/cgi-bin/texis/vtx/page?page=49e486676&submit=GO>. Acesso em 20 de dezembro de 2018

URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, n. 7, p. 91-99, 1997.

VAN GRIENSVEN, J., DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VAN ZANDBERGEN, G., KLINGER, M., MUELLER, A., DANNENBERG, S., GEBERT, A., SOLBACH, W., LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.

VÉLEZ, I., LÓPEZ, L., SÁNCHEZ, X., LAUREANO, M., ROJAS, C., RODRÍGUEZ, E. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 2, p. 351-356, 2010.

VERWEIJ, J., PLANTING, A., VAN DER BURG, M., STOTER, G. A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 118, n. 8, p. 606-608, 1992.

VIANNA, G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Arch Bras Med**, v. 1, p. 36-38, 1912

VICTOR, V. M., & DE LA FUENTE, M. Changes in the superoxide production and other macrophage functions could be related to the mortality of mice with endotoxin-induced oxidative stress. **Physiological research**, v. 52, n. 1, p. 101-110, 2003.

VIOL, M. A., GUERRERO, F. D., DE OLIVEIRA, B. C. M., DE AQUINO, M. C. C., LOIOLA, S. H., DE MELO, G. D., GOMES, A. H. S., KANAMURA, C. T., GARCIA, M. V., ANDREOTTI, R., LIMA, V. M. F., BRESCIANI K. D. S., DE LIMA, V. M. F. Identification of *Leishmania spp.* promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. **Parasitology research**, v. 115, n. 9, p. 3479-3484, 2016.

VITORIANO-SOUZA, J., MOREIRA ND MENEZES-SOUZA, D., ROATT, B. M., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R.D., SIQUEIRA-MATHIAS, F. A., DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M., GIUNCHETTI, R. C., DE SÁ, R. G., CORRÊA-OLIVEIRA, R., CARNEIRO, C. M., REIS, A. B. Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4, CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis. **Molecular immunology**, v. 56, n. 4, p. 540-548, 2013.

WAGNER, H., ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WANDERLEY, J. L. M., THORPE, P. E., BARCINSKI, M. A., & SOONG, L. Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates *in vivo* infection and dendritic cell function. **Parasite immunology**, v. 35, n. 3-4, p. 109-119, 2013.

WANG, W., LI, N., LUO, M., ZU, Y., EFFERTH, T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, v. 17, n. 3, 2012.

WASAN, E. K., GERSHKOVICH, P., ZHAO, J., ZHU, X., WERBOVETZ, K., TIDWELL, R. R., WASAN, K. M. A novel tropically stable oral amphotericin B formulation (iCo-010) exhibits efficacy against visceral Leishmaniasis in a murine model. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e913, 2010.

WASEEM, RABIA; LOW, KAH HIN. Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 38, n. 3, p. 483-501, 2015.

WASUNNA, M., NJENGA, S., BALASEGARAM, M., ALEXANDER, N., OMOLLO, R., EDWARDS, T., KIRIGI, G. Efficacy and safety of AmBisome in combination with sodium stibogluconate or miltefosine and miltefosine monotherapy for African visceral leishmaniasis: phase II randomized trial. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004880, 2016.

WERNECK, G. L., COSTA, C. H., DE CARVALHO, F. A. A., E CRUZ, M. D. S. P., MAGUIRE, J. H., & CASTRO, M. C. Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3172, 2014.

WINKELMANN, E.; RAETHER, W. New chemotherapeutically active nitroimidazoles. *Curr Chemother Infect Dis. Proc 11th Int Congr Chemother*, v. 2, p. 969-70, 1980.

WIWANITKIT, V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). **Therapeutics and clinical risk management**, v. 8, p. 323, 2012.

WORTH, H., SCHACHER, C., DETHLEFSEN, U. Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: a placebo-controlled double-blind trial. **Respiratory research**, v.10, n.1, p.69, 2009.

WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, 2004.

WYLLIE, S., PATTERSON, S., STOJANOVSKI, L., SIMEONS, F. R., NORVAL, S., KIME, R., FAIRLAMB, A. H. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. **Science translational medicine**, v. 4, n. 119, p. 119re1-119re1, 2012.

XU, Q., LI, M., YANG, M., YANG, J., XIE, J., LU, X., CHEN, W. α -pinene regulates miR-221 and induces G2/M phase cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells. **Bioscience reports**, v. 38, n. 6, p. BSR20180980, 2018.

YADAV, N., CHANDRA, H. Suppression of inflammatory and infection responses in lung macrophages by eucalyptus oil and its constituent 1, 8-cineole: Role of pattern recognition receptors TREM-1 and NLRP3, the MAP kinase regulator MKP-1, and NF κ B. **PLoS one**, v. 12, n. 11, p. e0188232, 2017.

YANG T. S., CHAO L. K., LIU T.T. J. Antimicrobial activity of the essential oil of *Glossogyne tenuifolia* against selected pathogens. **Sci Food Agric**. 2014 Nov; v. 94, n.14, p. 2965-71.

YAO, C., & WILSON, M. E. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania spp.* parasites to their virulent form. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 200, 2016.

YIMER M., ABERA B., MULU W., ZENEBE Y., BEZABIH B. Proportion of Visceral leishmaniasis and human immune deficiency virus co-infection among clinically confirmed visceral leishmaniasis patients at the endemic foci of the Amhara National Regional State,

north-west Ethiopia. **American Journal of Biomedical and Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

YU, N., SUN, Y. T., SU, X. M., HE, M., DAI, B., & KANG, J. Eucalyptol protects lungs against bacterial invasion through attenuating ciliated cell damage and suppressing MUC5AC expression. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 5, p. 5842-5850, 2019.

ZERPA, O., ULRICH, M., BLANCO, B., POLEGRE, M., AVILA, A., MATOS, N., MENDOZA, I., PRATLONG, F., RAVEL, C., CONVIT, J. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. **British journal of Dermatology**, v. 156, n. 6, p. 1328-1335, 2007.

ZHAO, Y, Chen R., Wang Y., Yang . α -Pinene inhibits human prostate cancer growth in a mouse xenograft model. **Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 1-7, 2018.

ZHONG, Weiting et al. p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 529-537, 2013.

ZHOU, J. Y., WANG, X. F., TANG, F. D., ZHOU, J. Y., LU, G. H., WANG, Y., BIAN, R. L. Inhibitory effect of 1, 8-cineol (eucalyptol) on Egr-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells 1. **Acta pharmacologica sinica**, v. 28, n.6, p.908-912, 2007.

ZIJLSTRA, E. E., MUSA, A. M., KHALIL, E. A., EL-HASSAN, I.M., EL-HASSAN, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.

ZORAN K, IVICA A, IVANA M, GORANKA PM, SONJA PR, TEUTA M. Antibacterial Activity of Halothane, Eucalyptol and Orange Oil. **Acta Stomatol Croat**. 2000;34(3):307-9.