

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**EFEITO LEISHMANICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides* Cham. E
Aloysia gratissima (sin. *Lippia lycioides*) SOBRE *Leishmania amazonensis* *in vitro***

Maria Carolina de Freitas Garcia

2013



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

EFEITO LEISHMANICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides* Cham. E *Aloysia gratissima* (sin. *Lippia Lycioides*) SOBRE *Leishmania. amazonensis* in vitro

MARIA CAROLINA DE FREITAS GARCIA

Sob a Orientação da Professora
Dra. Lucia Helena Pinto da Silva

e Co-orientação
Dr. Deivid Costa Soares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Março de 2013

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

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

G216e GARCIA, Maria Carolina de Freitas, 1979-
 Efeito leishmanicida de óleos essenciais de *Lippia*
 sidoides Cham. e *Aloysia gratissima* (sin. *Lippia*
 lycioides) sobre *L. amazonensis* in vitro / Maria
 Carolina de Freitas GARCIA. - Seropédica, 2013.
 56 f.

 Orientadora: Lucia Helena Pinto da SILVA.
 Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
 do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Ciências
 Veterinárias, 2013.

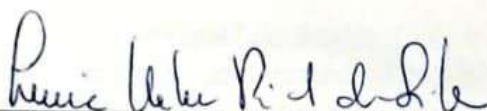
 1. *Lippia sidoides* Cham. 2. *Aloysia gratissima*
 (sin. *Lippia lycioides*). 3. timol. 4. guaiol. 5.
 Leishmania amazonensis. I. SILVA, Lucia Helena Pinto
 da, 1975-, orient. II Universidade Federal Rural do
 Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
 III. Título.

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

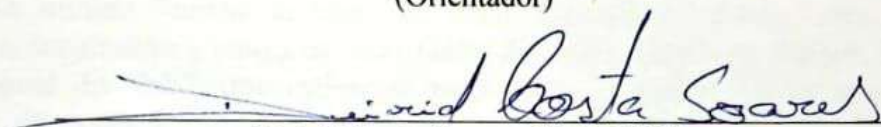
MARIA CAROLINA DE FREITAS GARCIA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

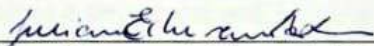
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/03/2013



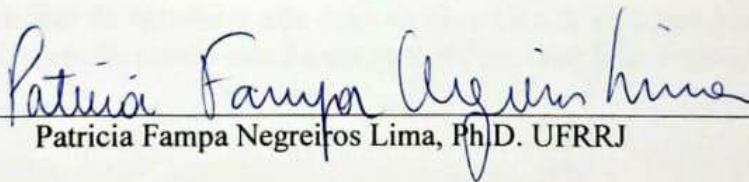
Lucia Helena Pinto da Silva, Ph.D., UFRRJ
(Orientador)



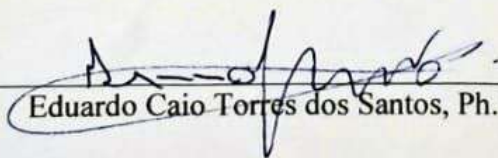
Deivid Costa Soares, Ph.D. UFRJ



Juliana Echevarria Neves de Lima, Ph.D. UFRJ



Patricia Fampa Negreiros Lima, Ph.D. UFRRJ



Eduardo Caio Torres dos Santos, Ph.D. UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha pequena e amada família! Meu pai Pedro, minha mãe Maria e meu irmão Tomás, apesar da distância sempre me deram força e apoio em qualquer coisa que me propus a realizar, e sempre torcendo acima de tudo pela minha felicidade. Sem esquecer da minha amada abuelita Concha e tia Fina.

Ao meu amor Neto, por estar comigo, mesmo que a distância, sempre me apoiando, e de forma paciente me ouvindo incansavelmente (acho eu, rs). Me incentivou e continua incentivando a continuar na vida acadêmica.

À Professora Lucia Helena, por me apresentar a maravilhosa “rural”, por me aceitar em seu laboratório, mesmo com sua trupe em casa (Raphael, Felipe e Lucas) sempre me orientou de forma atenciosa, paciente, dedicada e instrutiva. Obrigada minha chefe e amiga!

À Professora Elvira, por ter aberto seu laboratório quando eu era IC e no meu primeiro ano de mestrado, obrigada pelos ensinamentos e amizade sempre.

Aos meus “velhos amigos” do fundão Deivid (por me co-orientar), Natália, Anderson, Christian, Michelle, Eliete e todo pessoal do “lab”, pela amizade, conversas divertidas e polêmicas e momentos de descontração, sinto muita saudade da nossa convivência diária.

Às minhas “novas amigas” da rural Amanda e Aline, valeu pela convivência instrutiva, construtiva e acima de tudo muito divertida, Michelle, Bianca, Natália, Nádia e a todo pessoal do “lab”, que estiveram mais perto durante o último ano do mestrado. A presença de vocês foi muito importante na realização deste trabalho. Valeu pela amizade meninas gente fina!

Ao Dr. Antônio Siani da Fundação Oswaldo Cruz - RJ e à Dra. Mônica da UFRJ por fornecer os óleos essenciais e pela colaboração para realização deste trabalho, tirando sempre minhas dúvidas.

Não posso deixar de agradecer aos dogs de casa (aos fixos e aos que estavam e estão de passagem) que fizeram da minha estadia em Seropédica mais feliz e menos estressante.

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

RESUMO

GARCIA, Maria Carolina de Freitas. **Efeito leishmanicida de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Aloysia gratíssima* (sin. *Lippia lycioides*) sobre *L. amazonensis* in vitro.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Laboratório de Imunologia e Virologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Neste estudo testamos a atividade anti-*Leishmania* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e seu composto majoritário timol e *Aloysia gratíssima* (sin. *Lippia lycioides*) e seu composto majoritário guaiol, utilizando *Leishmania amazonensis* como modelo experimental *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que os óleos essenciais (OEs) de *L. sidoides* Cham. e *A. gratíssima* (sin. *L. lycioides*), apresentaram efeito em promastigotas, com IC₅₀ (48h) 22,2 ug/mL e 25,5 ug/mL, IC₅₀ (72h) 4,4 ug/mL e 14,2 ug/mL, respectivamente. Ambos OEs também apresentaram efeito em formas amastigotas, onde o OE de *A. gratíssima* (sin. *L. lycioides*) com IC₅₀ 1 ug/mL de forma dose-dependente, e os compostos timol e guaiol também apresentaram efeito em amastigotas, onde o guaiol apresentou um IC₅₀ 0,7 ug/mL, igual ao óleo essencial *A.gratissima* (sin. *L. lycioides*), e as concentrações testadas de timol não chegaram a concentração de 50 % de inibição. A citotoxicidade destes componentes para os macrófagos peritoneais murinos foi avaliada através do método de XTT onde não apresentaram atividade mitocondrial alterada, a integridade da membrana dos macrófagos também não foi alterada após o tratamento. Os dois óleos essenciais testados não foram capazes de alterar a capacidade fagocítica da célula hospedeira. O efeito anti-*Leishmania amazonensis* dos óleos essenciais de *L. sidoides* Cham. e *A.gratissima* (sin. *L. lycioides*), testados é independente da produção de óxido nítrico.

Nossos resultados apontam os óleos essenciais de *L. sidoides* Cham. e *A.gratissima* (sin. *L. lycioides*), além de seus componestes majoritários timol e guaiol, respectivamente, com potencial para o desenvolvimento de terapia contra as leishmanioses.

Palavras chave: óleo essencial, *Lippia sidoides* Cham., *Aloysia gratíssima* (sin. *Lippia lycioides*), timol, guaiol, *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

GARCIA, Maria Carolina de Freitas. **Efeito leishmanicida de óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Aloysia gratissima* (syn. *Lippia lycioides*) sobre *L. amazonensis* in vitro.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Laboratório de Imunologia e Virologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

In this study we tested the anti-*Leishmania* activity of essential oils from *Lippia sidoides* Cham. and its major compound thymol and *Aloysia gratissima* (syn. *Lippia lycioides*) and its major compound guaiol using *Leishmania amazonensis* as an experimental model *in vitro*. Our results demonstrated that essential oils (EOs) of *L. sidoides* Cham. and *Aloysia gratissima* (syn. *L. lycioides*) showed effect in promastigotes, with IC₅₀ (48h) 22.2 ug/mL and 25.5 ug/mL, IC₅₀ (72h) 4.4 ug/mL and 14.2 ug/mL, respectively. Both EOs also had effect on amastigotes, where the EO of *A. gratissima* (syn. *L. lycioides*) with IC₅₀ 1 ug/mL dose-dependent manner, and the compounds thymol and guaiol also showed effect in amastigotes, where guaiol showed an IC₅₀ of 0.7 ug/mL equal to essential oil of *A. gratissima* (syn. *L. lycioides*) and thymol the tested concentrations did not reach concentrations of 50% inhibition. Cytotoxicity of these components for murine peritoneal macrophages was assessed by the XTT method which did not show altered mitochondrial activity, the macrophage membrane integrity was not altered after the treatment. The two essential oils tested were not able to alter the phagocytic ability of the host cell. The anti-*Leishmania amazonensis* essential oils of *L. sidoides* Cham. and *A. gratissima* (syn. *L. lycioides*) tested is independent of nitric oxide production.

Our results indicate the essential oils of *L. sidoides* Cham. and *A. gratissima* (syn. *L. lycioides*), and its majority compound guaiol and thymol, respectively, with potential for the development of therapy against leishmaniasis.

Keywords: essential oil, *Lippia sidoides* Cham., *Aloysia gratissima* (syn. *Lippia lycioides*), thymol, guaiol, *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE ABREVAÇÕES E SÍMBOLOS

AmB: Anfotericina B
ATP: trifosfato de adenosina
CTRL: controle
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNDi Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde
GPI: glicosil fosfatidil inositol
GTP: guanosina trifosfato
HePC: hexadecilfosfatidilcolina
IC₅₀: concentração inibitória para 50% dos parasitas
ICH: Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IFN- γ : interferon gama
IL-10: interleucina -10
IL-12: interleucina -12
IL-4: interleucina -4
iNOs: óxido nítrico sintase induzida
LCD: Leishmaniose cutânea difusa
LCL: Leishmaniose cutânea localizada
LMC: Leishmaniose mucocutânea
LPG: lipofosfoglicano
LV: Leishmaniose visceral
MP: matriz peritrófica
NF- κ B: factor nuclear kappa B
NO: óxido nítrico
OE: óleo essencial
OMS: Organização Mundial de Saúde
PMS: Phenazine metho-sulfato
ROS: espécies reativas de oxigênio
Sb^{III}: antimonial trivalente
Sb^V: antimonial pentavalente
SFB: soro fetal bovino
TGF- β : fator de transformação e crescimento- β
TNF- α : fator de necrose tumoral - α
TRL-2: receptor semelhante a *Toll*-2
PI 3K: Phosphatidylinositide 3-quinase
MAP-kinase: Mitogen Activated Protein Kinases
SHP-1: Src homology phosphatase-1

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Leishmania cutânea	3
Figura 1B. Leishmania cutânea difusa	3
Figura 2. Leishmania mucocutânea	4
Figura3. Leishmania visceral	4
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>	5
Figura 5. Fármacos utilizados na terapia das leishmanias	7
Figura 6. Estrutura química da Miltefosina	10
Figura 7A. Estrutura química do Guaiol (sesquiterpeno)	14
Figura 7B. Estrutura química do Timol (monoterpeno fenol)	14
Figura 8A. <i>Lippia sidoides</i> Cham	15
Figura 8B. <i>Aloysia gratissima</i> (sin. <i>Lippia licyoides</i>)	15
Tabela 1. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	15
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de <i>Aloysia gratissima</i> (sin. <i>Lippia licyoides</i>)	16
Tabela 3. Constituintes do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	21
Tabela 4. Constituintes do óleo essencial de <i>Aloysia gratissima</i> (sin. <i>Lippia licyoides</i>)	21
Figura 9A,B. Atividade anti promastigota dos óleos essenciais	22
Figura 10. Atividade anti-amastigota na infecção de macrófagos <i>in vitro</i> tratados com óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e <i>Aloysia gratissima</i> (sin. <i>Lippia licyoides</i>)	23
Figura 11. Ensaio de morte de amastigotas tratados com óleos essenciais	24
Figura 12. Viabilidade mitocondrial de macrófagos tratados com óleos essenciais	25
Figura 13. Integridade da membrana de macrófagos tratados com óleos essenciais	26
Figura 14. Ensaio de fagocitose de promastigotas tratados com os óleos essenciais	27
Figura 15. Produção de Óxido Nítrico de macrófagos tratados com os óleos essenciais	28
Figura 16. Atividade anti-amastigota na infecção de macrófagos <i>in vitro</i> de timol e guaiol	29
Figura 17. Viabilidade mitocondrial de macrófagos tratados com timol e guaiol	30
Figura 18. Integridade da membrana de macrófagos tratados com timol e guaiol	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Leishmanioses	1
1.2 Formas Clínicas das Leishmanioses	2
1.3 Ciclo de Vida	5
1.4 Resposta Imune	6
1.5 Tratamento	6
1.5.1 Pentostam® (estibugluconato de sódio, Sb ^V) e Glucantime® (N-metil-glucamina)	8
1.5.2 Pentamidina (isotionato ou metilsulfato)	8
1.5.3 Paramomicina	8
1.5.4 Anfotericina B (AmB)	9
1.5.5 Miltefosina (hexadecilfosfocolina)	9
1.6 Produtos Naturais x Leishmaniose	11
1.7 Óleos Essenciais	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral:	17
2.2 Objetivos Específicos:	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Parasitos:	18
3.2 Obtenção de Macrófagos:	18
3.3 <i>Lippia sidoides</i> e <i>Aloysia gratissima</i> (sin. <i>L. lycioides</i>):	18
3.3.1 Obtenção das Plantas:	18
3.3.2 Extração dos Óleos Essenciais:	18
3.4 Atividade Anti-Promastigota:	18
3.5 Índice de Infectividade:	19
3.6 Ensaio de Morte Amastigota:	19
3.7 Ensaio de fagocitose de Promastigotas:	19
3.8 Citotoxicidade	20
3.8.1 Método do XTT:	20
3.8.2 Azul de Trypan:	20
3.9 Produção de Óxido Nítrico (NO):	20
3.10 Análise Estatística:	20

4 RESULTADOS	21
4.1 Composição Química dos Óleos Essenciais de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e <i>Aloysia gratissima</i> (sin. <i>Lippia lycioides</i>).	21
4.2 Atividade Anti-Promastigotas dos Óleos Essenciais de <i>Lippia sidoides</i> Cham. e <i>Aloysia gratissima</i> (sin. <i>L. lycioides</i>) .	22
4.3 Atividade Anti-Amastigota na Infecção de Macrófagos <i>in vitro</i>	23
4.4 Ensaio de Morte de Amastigotas	24
4.5 Ensaio Citotóxico	25
4.5.1 Viabilidade Mitocondrial e Integridade da Membrana de Macrófagos Tratados com OEs	25
4.5.2 Viabilidade Mitocondrial	26
4.6 Ensaio de Fagocitose de Promastigotas	27
4.7 Produção de Óxido Nítrico	28
4.8 Atividade Anti-Amastigota na Infecção de Macrófagos <i>in vitro</i> de Timol e Guaiol	29
4.9 Ensaio Citotóxico	30
4.9.1 Viabilidade Mitocondrial	30
4.9.2 Integridade da Membrana Citoplasmática	31
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são parasitoses causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, classificadas como zoonoses de grande importância em saúde pública, com incidência em todos os continentes, sendo endêmicas tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento, atingindo principalmente as regiões tropicais e subtropicais (DESJEUX, 2004).

Dados de 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que existam 350 milhões de pessoas em áreas de risco, em 98 países e 3 territórios, com uma incidência global de 700 mil-1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea e de 200-400 mil casos de leishmaniose visceral (ALVAR, et al, 2012). Dentre as doenças parasitárias, a leishmaniose é a responsável pela segunda maior carga da doença, perdendo apenas para a malária. O controle da leishmaniose continua apresentando casos crescentes em todo o mundo, e se tornou um grande foco de preocupação e um sério problema mundial, afetando as camadas mais pobres da sociedade. (<http://www.who.int/en/>), acessado em 28/02/2013).

O Brasil é o país com mais casos de leishmaniose cutânea na América do Sul. Entre os anos 2000 e 2008 foram registrados 238.749 casos de leishmaniose cutânea no Brasil, com maior número de casos confirmados ocorridos na região Norte e Nordeste, não excluindo as demais regiões do país (Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância e Saúde - MS/SVS, 2010). Em relação à leishmaniose visceral, o Brasil é o país com 90% dos casos de registrados na América Latina, e o terceiro no mundo, com cerca de 3 mil casos notificados anualmente (Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância e Saúde - MS/SVS, 2010). Entre 1998 e 2010, um total de 32.459 casos de leishmaniose visceral foi registrado, entre os 21 estados do país, sendo mais prevalente na parte nordeste do país (AZEVEDO, et al, 2006). O número médio anual de casos foi de 3.246, com uma taxa de incidência de cerca de 1,85 casos por 100.000 habitantes, e tem uma tendência a aumentar (MAIA-ELKHOURY, et al, 2008). Desde 1985, está em vigor um programa nacional de controle da leishmaniose visceral e cutânea, onde a notificação da leishmaniose é obrigatória no Brasil.

As doenças tropicais negligenciadas continuam a causar morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. No entanto, dos 1.556 novos medicamentos aprovados entre 1975 e 2004, apenas 21 (1,3%) foram desenvolvidos especificamente para doenças tropicais e tuberculose, embora estas doenças sejam responsáveis por 11,4% da carga global de doenças (<http://www.dndi.org/>).

No Brasil, são crescentes os incentivos governamentais para pesquisa e desenvolvimento em doenças negligenciadas, sendo o sexto país que mais investe nesse seguimento

(www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacao_em_pauta_6_doencas_negl.pdf). No entanto, o desenvolvimento de novos medicamentos e diagnósticos é muito lento comparado com o surgimento e propagação de doenças infecciosas em todo o mundo. Assim, pesquisas em colaboração entre países com doenças endêmicas e países desenvolvidos são urgentemente necessários para acelerar o progresso no caminho da descoberta e aceitação dos produtos, o que vem sendo amplamente discutido (PEELING; NWAKA, 2011). O desenvolvimento de novos medicamentos está atualmente focado em formas moleculares com pouco ou nenhum esforço contínuo para biofármacos (JAKOBSEN, et al, 2011). Apesar do financiamento para pesquisa relacionada às doenças negligenciadas, seus resultados não são revertidos para o avanço de novas terapias, como novos fármacos, novos métodos diagnósticos e novas vacinas. Uma das possíveis justificativas para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo imediato para a indústria, uma vez que a população atendida é de baixa renda e

presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento (Decit- Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde, 2010).

1.2 Formas clínicas das leishmanioses

As leishmanioses são classificadas de acordo com as suas manifestações clínicas em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), e leishmaniose visceral (LV) (DESJEUX, 2004; REITHINGER, et al, 2007).

A leishmaniose cutânea (LC) é causada por *Leishmania major* e *L. tropica* no Velho Mundo e por membros dos complexos mexicana (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, entre outras) e braziliensis (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, entre outras) no Novo Mundo (NEWLOVE, et al, 2012; NEUBER, et al, 2008). A leishmaniose cutânea é caracterizada pelo aparecimento de lesões únicas ou múltiplas, ulceradas ou não, em áreas do corpo expostas à picada do vetor flebotomíneo, em torno de quatro semanas apresentando cura espontânea ou não (Figura 1A) (NEUBER, et al, 2008).

Leishmania amazonensis e *L. mexicana* nas Américas e *L. aethiopica* no Velho Mundo podem causar uma forma extremamente grave da doença que é a leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizada por lesões nodulares e pápulas distribuídas por todo corpo dos pacientes, os quais não conseguem controlar a infecção, levando a uma hipossensibilidade (Figura 1B).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é causada mais frequentemente pela *Leishmania braziliensis*, porém não é uma exclusividade desta espécie, onde *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum*, também podem se tornar mucocutânea, esta forma é geralmente limitada a América do Sul (BERMAN, 2003). Esta forma da doença aparece após a cura e cicatrização de lesões primárias da forma cutânea, caracterizando-se inicialmente por inflamação e edema nasal, acompanhado de ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo, conhecido como espongiose (LAINSON; SHAW, 1983; FALQUETO; SESSA, 1996), que ocorre através da formação de lesões difusas não ulceradas, contendo grande número de amastigotas. Pode haver pluralidade das lesões devido à metástase de parasitos de um sítio para outro através de migração de macrófagos infectados, estando estreitamente associada a uma deficiência imunológica do paciente e caracterizada por um andamento crônico e progressivo, não respondendo aos tratamentos convencionais existentes, não apresentando cura espontânea, de difícil tratamento, além de possíveis associações com infecções bacterianas secundárias, agravando o quadro clínico, sendo potencialmente fatal (Figura 2) (REITHINGER, et al, 2007).

A leishmaniose visceral (LV) ou Kala-azar é causada por *Leishmania donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo (CHAPPUIS, et al, 2007) e por *L. infantum chagasi* nas Américas, se não tratada é a forma mais grave e fatal da doença (DESJEUX, 2004). Os sintomas da leishmaniose visceral são caracterizados por febre, tosse, dor abdominal, diarreia, epistaxe, caquexia, pancitopenia e hepatoesplenomegalia, que leva a perda da função do fígado e o baço (Figura 3) (SANTOS et al, 2008; ROBERTS, et al., 2001; BERN, et al, 2008).

Leishmaniose cutânea



Figure 1A. (<http://medfoco.com.br/leishmaniose-tegumentar-americana-ulcera-de-bauru/>)

Leishmaniose cutânea difusa



Figura 1B. (<http://www.brilhantels.com/dedetizacao/Leishmaniosecutaneauralafricana.jpg>)

Leishmaniose mucocutânea



Figura 2. (http://leishmanioses.blogspot.com.br/2009_08_01_archive.html)

Leishmaniose visceral



Figura 3. (<http://conhecimentofacil.blogspot.com.br/2010/03/genero-leishmania.html>)

1.3 Ciclo de vida

Os protozoários do gênero *Leishmania* (Família: Trypanosomatidae) são protozoários heteroxenos, necessitando de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para completar o seu ciclo de vida. Apresentam duas formas durante o seu ciclo de vida: uma flagelada, extracelular, presente no trato digestório do inseto-vetor, denominada promastigota e uma forma intracelular, com flagelo diminuto denominada amastigota, encontrada no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado (BATES, 2007). (Figura 4)

O parasito é inoculado por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo ou *Lutzomyia* no Novo Mundo (SAHA, et al, 2006; MISHRA, et al., 2009).

A infecção se inicia a partir da ingestão de sangue contendo amastigotas ou macrófagos infectados com amastigotas pelos flebotomíneos, sendo rapidamente envolvido pela matriz peritrófica (MP), que é uma estrutura formada por proteínas e quitina secretada por células do epitélio intestinal. Formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, que se multiplicam ativamente e alcançam o epitélio intestinal, rompendo a membrana peritrófica, haverá a secreção de quitinase, aonde irão se aderir através da inserção de seus flagelos entre as microvilosidades. Essa adesão é mediada pelo lipofosfoglicano (LPG), que é o glicoconjugado majoritário presente na superfície dos promastigotas (revisado por SACKS; KAMHAWI, 2001), impedindo assim sua expulsão durante a eliminação dos restos de sangue digerido (BATES, 2007). A fase de adesão do parasito ao epitélio é fundamental para sua colonização no inseto (PIMENTA, et al, 1992; BATES; ROGERS, 2004).

As formas promastigotas procíclicas se diferenciam em promastigotas metacíclicas à medida que migram em direção a probóscide do inseto vetor. Ao serem inoculadas no mamífero, as formas metacíclicas se ligam às células do sistema fagocítico mononuclear, sendo endocitadas. No interior dos fagolisossomas as formas metacíclicas diferenciam-se em formas amastigotas e iniciam um processo de proliferação, causando a ruptura dos macrófagos e sua liberação no meio extracelular, invadindo novos macrófagos, garantindo a manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado (CHANG; FONG, 1983). Em posteriores repastos sanguíneos em um hospedeiro infectado, o inseto vetor irá ingerir sangue contendo macrófagos infectados com formas amastigotas do parasito, reiniciando assim seu ciclo de vida (Figura 4) (RASMUSSEN; DESCOTEAUX, 2004).

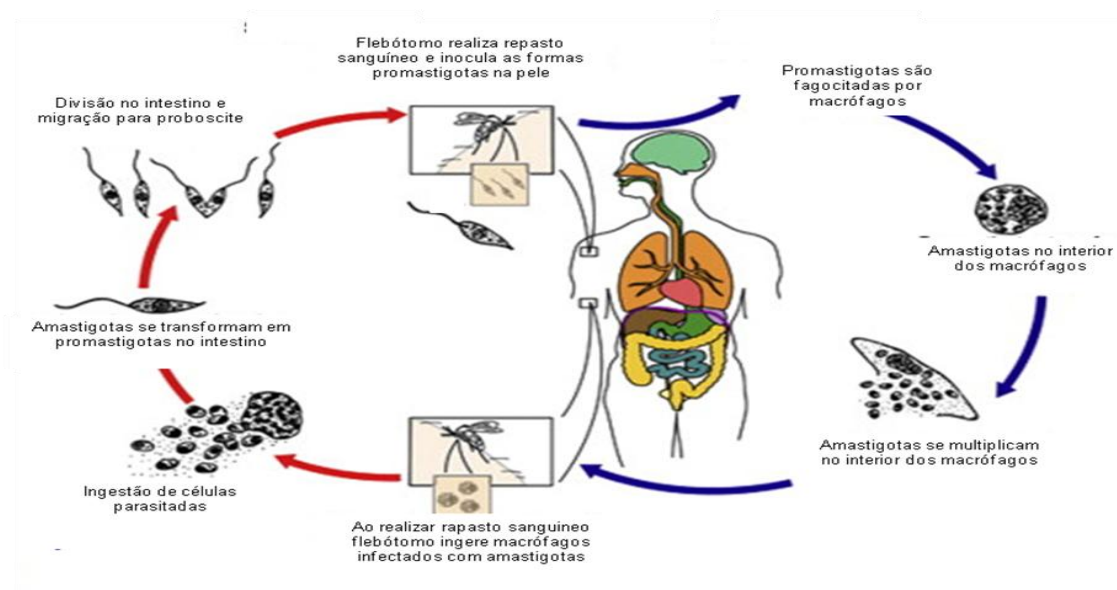


Figura 4. Ciclo de vida da *Leishmania* sp.
(<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

1.4 Resposta Imune

Está bem estabelecido para o modelo murino de infecção por *L. major*, que camundongos BALB/c são suscetíveis à doença devido a uma resposta Th2, que é caracterizada principalmente pelo aumento da produção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação e crescimento- β (TGF- β), bem como a diminuição da produção de interleucina-12 (IL-12), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Camundongos resistentes, como C57BL/6 e C3H/HeJ, apresentam cura espontânea por desenvolver uma resposta baseada em citocinas do tipo Th1, onde a ativação dos macrófagos através da produção de IFN- γ é crucial para a resolução da lesão (SACKS; ANDERSON, 2004). Nestes animais, a produção de IL-12 estimula a produção de IFN- γ que, subsequentemente ativa os macrófagos induzindo a produção de óxido nítrico (NO), um dos principais fatores de destruição do parasito. Por outro lado, a alta produção de IL-4 e IL-10 inibem a produção de NO pelos macrófagos, favorecendo o estabelecimento da infecção (NORSWORTHY, et al, 2004). A expressão de citocinas do tipo Th2 é importante para o estabelecimento da infecção, uma vez que camundongos BALB/c deficientes de IL-4 e IL-10 ou tratados com anti-IL-10 ou anti-IL-4 são capazes de curar a lesão (SACKS; ANDERSON, 2004).

Em humanos, uma clara dicotomia na resposta das células T aos parasitos *Leishmania*, como é visto em camundongos, não foi demonstrada. A resposta de citocinas de células T periféricas em pacientes com leishmaniose cutânea revelou uma imunidade Th1 e Th2 mista (SHARMA; SINGH, 2009). Os pacientes com leishmaniose cutânea e mucocutânea, devido à infecção por *L. braziliensis* tem uma forte resposta de célula T, caracterizada por uma alta resposta proliferativa de linfócitos a antígenos de *Leishmania* e produção de IFN- γ (FOLLADOR, et al, 2002). Embora o IFN- γ seja produzido durante a infecção por *L. braziliensis*, esses pacientes ainda assim apresentam lesões crônicas. Provavelmente, o aparecimento e permanência dessas lesões crônicas podem estar associados a uma forte expressão de TNF- α (SHARMA; SINGH, 2009).

Assim como na leishmaniose cutânea humana, nenhuma associação constante entre as respostas Th1 e resistência à doença, com predomínio de células que produzem o IFN- γ foi identificada na leishmaniose visceral humana (KHALIL, et al, 2005). Os níveis de IFN- γ e IL-4 são elevados durante a doença ativa e diminuem significativamente após a cura. A IL-4 não suprime a resposta proliferativa de linfócitos ou produção de IFN- γ em indivíduos que foram curados da leishmaniose. Assim, o papel proeminente da IL-4 como uma citocina Th2 na leishmaniose murina nem sempre é visto na leishmaniose humana (SHARMA; SINGH, 2009).

1.5 Tratamento

Segundo a Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), além da dengue, doença de Chagas, hanseníase, malária, tuberculose, esquistossomose, entre outras, as leishmanioses são doenças "extremamente negligenciadas", devido a sua prevalência em regiões de extrema pobreza e a falta de interesse por parte da indústria farmacêutica em desenvolver novos medicamentos para essas doenças (Decit- Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde, 2010). O DNDi relata que duas linhas de atividade leishmanicida está sendo perseguida, como o desenvolvimento de um tratamento tópico contendo anfotericina-B (um medicamento que é ativo contra todas as espécies de *Leishmania sp.* testadas) e duas formulações estariam em avaliação pré-clínica, prontas para estudos clínicos no quarto trimestre de 2012, se cumprirem todos os requisitos do ICH (Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) / Farmacopeia Europeia. Além disso, a outra linha envolve a seleção de uma

pomada já disponível para o tratamento de queimaduras e diferentes tipos de feridas para melhorar a reepitalização e curar super-infecções, onde com a ajuda de especialistas, tem por objetivo incluí-lo em ensaios para o tratamento de leishmaniose cutânea. Uma outra abordagem é a triagem de drogas orais utilizadas para outras indicações, onde drogas com melhor atividade, ausência de toxicidade e custos serão selecionadas para entrar em estudos clínicos em 2013.

O tratamento das leishmanioses é o mesmo feito desde o início do século XX pelo uso de antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha, conhecidos comercialmente como Pentostam® (estibogluconato de sódio, Wellcome Foundation, UK) e Glucantime® (antimoniato meglumina, Rhône Polenc, França). No caso desses medicamentos não surtirem efeito, opta-se pelo uso de fármacos de segunda escolha como anfotericina B, a paromomicina, a pentamidina e a miltefosina (Figura 5). Grande parte desses medicamentos apresenta uma variedade de problemas, como alta toxicidade, difícil administração por ser parenteral ou via endovenosa, levando a um longo tratamento, onde é recomendada a internação do paciente, esse quadro leva a desistência do tratamento, além de facilitar o aparecimento de cepas resistentes (BERMAN, 2003; SANTOS, et al, 2008).

O uso de antimoniais pentavalentes no tratamento foi introduzido no Brasil por Gaspar Viana em 1912, inicialmente com o uso de antimoniais trivalentes, Sb^{III} , porém, devido a sua alta toxicidade e difícil administração, levou-se ao uso da sua formulação pentavalente, Sb^V , em 1937, o estibogluconato de sódio - Sb^V - (Pentostam®), que obteve êxito na redução dos efeitos colaterais e da toxicidade quando comparado com os efeitos observados pela forma trivalente (MISHRA, et al, 2007). Mais tarde, em 1945, o N-metil-glucamina (Glucantime®), também pentavalente passou a ser utilizado, sendo esses dois compostos quimicamente similares, diferindo na dose a ser administrada (DEN BOER, et al, 2009).

Nome		Estrutura - 2D	Formula química	Massa Molecular (g/mol)
Comercial	Químico			
Pentostam®	Estibogluconato de sódio		$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$	910.9
Fungizone	Anfotericina B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924.084
Humatin	Paromomicina		$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	615.629
Pentamidina	Pentamidina isotionato		$C_{19}H_{28}N_4O_2$	340.42
Glucantime®	Antimoniato de meglumina		$C_{14}H_{29}O_{19}N_2Sb$	507.01

Figura 5. Fármacos utilizados na terapia das leishmanioses (SANTOS, et al, 2008)

1.5.1 Pentostam[®] (estibogluconato de sódio, Sb^V) e Glucantime[®] (antimoniato N-metil-glucamina)

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi completamente elucidado. Estudos sugerem que a forma pentavalente (Sb^V) precise ser convertida para sua forma trivalente (Sb^{III}), sendo exigido que este composto entre no macrófago (OULLETTE, et al, 2004). Essa conversão acontece pelo esgotamento de tiol, além de ter uma atividade direta sobre o parasito através da geração de ROS. A produção de energia é interferida em amastigotas de *Leishmania* levando a inibição da glicólise e da β -oxidação de ácidos graxos, redução dos níveis de ATP e GTP, comprometendo a viabilidade da célula (TRACY; WEBSTER JR., 1996).

As vantagens para seu uso são o baixo custo e a disponibilidade no mercado desses medicamentos, entretanto, existem desvantagens importantes como a resistência adquirida de algumas cepas, além de efeitos colaterais como mialgia, pancreatite, arritmias cardíacas, hepatite (CROFT, et al, 2006; CROFT, et al, 2011). O Glucantime tem seu exemplar sintético, produzido por Albert David, em Calcutá, Índia, com o preço mais baixo, com o intuito de abastecer ONGs e programas de controle, sendo o medicamento utilizado como tratamento de primeira linha em grandes surtos. O Pentostan, diferente do Glucantime tem seu valor elevado e não tem exemplar sintético (DEN BOER, 2011).

1.5.2 Pentamidina

Conhecido como sotionato ou metilsulfato, é uma diamidina aromática, utilizada no tratamento das três formas da doença a partir da década de 50, como fármaco de segunda escolha quando os antimoniais não surtem efeito (MISHRA, et al, 2007).

Esse fármaco interfere na síntese de DNA do parasito, através de sua atuação no processo mediado por transportadores de arginina ou poliaminas (BASSELIN, et al, 2002). AMATO, et al, 2008, observaram alterações morfológicas do cinetoplasto e fragmentação da membrana mitocondrial, induzindo a morte do parasito. Alterações na fosforilação oxidativa foram observadas quando as membranas mitocondriais do parasito eram afetadas através da concentração de pentamidina nesta organela (VERSECI; DO CAMPO, 1992).

Existem inúmeras desvantagens no uso da pentamidina como o aparecimento de cepas resistentes (BASSELIN, et al, 2002), além de múltiplos efeitos colaterais, dentre eles estão náusea, vômito, dor de cabeça, hipoglicemia, hipotensão no momento da infusão do fármaco, síncope, nefrotoxicidade, diabetes, leucopenia e pancreatite. Seu uso é contra indicado durante a gravidez, em pacientes diabéticos e em casos de falha renal, hepática ou cardíaca (AMATO, et al, 2008), devido a esses problemas sua utilização é restringida.

1.5.3 Paramomicina

Também conhecido como aminosidina ou monomicina, é um antibiótico aminoglicosídeo inicialmente utilizado para o tratamento de infecções bacterianas (MISHRA, et al, 2007). Sua atividade leishmanicida foi descrita na década de 60 (CROFT; COOMBS, 2003). Apesar de utilizado no tratamento da forma cutânea da doença, seu uso é limitado no tratamento da forma visceral, apesar de excelente atividade, foi observado toxicidade renal (CROFT, et al, 2006).

O mecanismo exato de ação ainda não é conhecido, porém alguns estudos propõe que esse fármaco induza a disfunção respiratória de formas promastigotas de *L. donovani* (CROFT, et al, 2011; JHINGRAN, et al, 2009).

Suas vantagens são o baixo custo, a boa tolerância, possui sinergismo com antimoniais pentavalentes, como Glucantime, sendo essa combinação utilizada no tratamento para as formas mais graves da doença cutânea difusa (SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

1.5.4 Anfotericina B

É um antibiótico poliênico descoberto na década de 50 (SINGH; SIVAKUMAR, 2004) e usado somente a partir da década de 60 como droga de segunda escolha (CROFT, et al, 2006).

O mecanismo de ação se baseia na ligação ao episteról, sendo este precursor do ergosterol na membrana do parasito, além do colesterol da membrana do macrófago (PAILA, et al, 2010), ocasionando a formação de poros, com consequente perda íons através de canais iônicos abertos, alterando o equilíbrio osmótico na membrana do parasito, levando a uma disfunção e resultando em lise celular (MINODIER, et al, 2003; MISHRA, et al, 2007). É capaz de aumentar a expressão de receptor tipo *Toll-2* (TLR-2), levando a ativação de uma resposta inflamatória pela ativação de NF-kB, e produção de TNF- alfa e IL-10 (BELLOCCHIO, et al, 2005; MATSUO, et al, 2006).

Este tratamento também ocasiona efeitos colaterais como dor generalizada, convulsões, febre, calafrios, diminuição do hematócrito e nefrotoxicidade reversível, toxicidades pulmonares e neurológicas (MINODIER, et al, 2003; SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Além de apresentar severos problemas como a toxicidade, AmB tem sua utilização limitada havendo a necessidade de administração parenteral, devido a sua baixa absorção oral (<5%) impede sua administração por via oral; somente a infusão intravenosa é capaz de atingir a concentração terapêutica no sangue. Além disso, mais de 95% da AmB se liga a proteínas do plasma sanguíneo e nos tecidos, tendendo sua concentração, principalmente no fígado, baço, pulmões e rins, restringindo assim sua eficiência (MINODIER, et al, 2003).

Há ainda disponível para o tratamento das leishmanioses formulações lipídicas de anfotericina B, a qual pode estar envolvida por lipossoma unilamelar ou incorporada em um complexo lipídico. Essas formulações incluem AmBisome[®] (anfotericina lipossomal), Abecelt[®] (anfotericina incorporada em um complexo lipídico) e Amphocil[®] (anfotericina em dispersão coloidal) onde foi observado sua reduzida toxicidade e seu maior tempo de vida no plasma em relação a AmB convencional (MINODIER, et al, 2003; MISHRA, et al, 2007). Apesar dos estudos com várias formulações lipídicas de AmB comprovarem seu excelente potencial para o tratamento das leishmanioses apresentando 96% de cura em 5 dias de tratamento com uma concentração menor que a AmB convencional, existe a barreira de seu alto valor, se tornando um fator importante na limitação de seu uso (MISHRA, et al, 2007).

1.5.5 Miltefosina (hexadecilfosfocolina)

A miltefosina é um análogo de fosfolípídeo (alcilfosfocolina), chamado hexadecilfosfocolina [HePC], foi originalmente desenvolvido como uma droga anti-câncer e é freqüentemente usada para o tratamento tópico da metástase cutânea de carcinoma mamário. A atividade anti-neoplásica da HePC, tem sido relacionada a sua capacidade de induzir apoptose em várias linhagens de células tumorais (ENGELMAN, et al, 1996; DUISINGS, et al, 2004; RUITER, et al, 2001; KONSTANTINOV; BERGER, 1999).

Em 2002, a miltefosina foi aprovada na Índia como o primeiro fármaco por via oral para o tratamento contra leishmaniose visceral. No Brasil, estudos *in vitro* apontam que doses mais elevadas sejam necessárias das habitualmente utilizadas em países desenvolvidos, aonde esse fármaco vem sendo empregado no tratamento da forma visceral da doença (TEIXEIRA, et al, 2011), já que a miltefosina foi pelo menos 20 vezes mais eficaz contra *L. donovani*,

quando comparado com quatro espécies de relevância médica no Brasil como *L. amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. infantum chagasi* (MORAIS-TEIXEIRA, et al, 2011).

Os mecanismos de ação da miltefosina em *Leishmania* têm demonstrado semelhanças na sua atividade contra células tumorais humanas. A conexão de sua atividade está vinculada a indução de apoptose e alteração na via de sinalização dependente de lipídios.

Existem várias hipóteses para o mecanismo de ação da miltefosina, portanto nenhuma ainda foi identificado definitivamente. Diversos estudos tem proposto que exista mais de um local molecular de ação. Dentre os possíveis mecanismos de ação incluem a morte celular semelhante a apoptose causada por pela condensação nuclear, fragmentação do DNA e perda de volume da célula (MOREIRA, 2011). Alteração do metabolismo dos fosfolipídeos da membrana do parasito, alteração na biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI), com possível implicação na sua virulência e na transdução de sinal dentro do parasito (LUX, et al, 2000). Outros alvos seriam a redução dos níveis de ergosterol (RAKOTOMANGA, et al, 2005), a inibição da biossíntese de fosfatidilcolina (RAKOTOMANGA, et al, 2007), agindo também na redução do potencial da membrana mitocondrial (SANTA-RITA, et al, 2004), inibindo o citocromo *c*- oxidase (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007).

Propriedades imunomoduladoras desse fármaco têm sido propostas como um fator adicional que contribui para seu efeito leishmanicida. Foi demonstrada sua capacidade de induzir a produção de IFN- γ em macrófagos infectados com *L. donovani*, visto que a miltefosina aumenta a expressão de receptores IFN- γ , além disso o IFN- γ induz a fosforilação de STAT-1 e reduz ativação de SHP-1. Foi demonstrado que miltefosina induz também a fosforilação de p38 MAP-kinase dependente de PI3K, necessária para ativação de iNOS, sugerindo assim que miltefosina tenha uma ação indireta sobre o parasito (WADHONE, et al, 2009).

As principais preocupações com a segurança do uso de miltefosina se relacionam com o seu efeito sobre a mucosa do trato gastrointestinal (DORLO, et al, 2011) e do seu potencial teratogênico não sendo recomendado para o tratamento em grávidas e a contracepção é necessária em mulheres em idade fértil (SINDERMAN; ENGEL, 2006). Foram descritos também, a anorexia, náusea, vômito e diarreia, no entanto, esses efeitos colaterais perduram somente no início do tratamento e frequentemente resolvem com a continuidade do tratamento (MURRAY, 2004). Outro impasse é sua possível evolução para o aparecimento de cepas resistentes, visto que o tratamento pode deixar níveis sub-terapêuticos no sangue por algumas semanas pós-terapia, uma característica que pode propiciar o desenvolvimento de resistência (BERMAN, et al, 2006).

Sua formulação química esta representada na figura 6 abaixo:

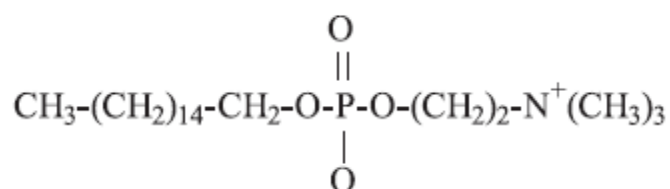


Figura 6. Estrutura química da miltefosina (CROFT, et al, 2003)

A ausência de um medicamento leishmanicida realmente eficaz é de extrema importância e torna necessária à busca de novos compostos terapêuticos com melhor atividade e com menor produção de efeitos adversos. Produtos naturais oriundos de plantas são fontes alternativas para a pesquisa de novos e seletivos agentes terapêuticos para o tratamento das leishmanioses.

1.6 Produtos naturais x leishmaniose

Estima-se que existam de 250.000 a 500.000 espécies de plantas no planeta (BORIS, 1996), onde uma porcentagem relativamente pequena de menos de 10% seja utilizada para fins medicinais. Apesar de utilizadas há séculos para fins medicinais, no tratamento de diversas patologias, incluindo infecções parasitárias, os produtos naturais começaram a ser cientificamente investigados quanto a sua atividade biológica apenas no século XX (IWU, et al, 1994), embora aproximadamente 25% dos compostos ativos dos medicamentos prescritos nos Estados Unidos e Inglaterra tenham sido isolados de plantas (ANTHONY, et al, 2005).

Na medicina popular, os produtos naturais utilizados contra leishmanioses são geralmente administrados por via oral nos casos de leishmaniose visceral e como preparações tópicas para leishmaniose cutânea. A avaliação científica desses produtos naturais vem sendo eficaz para obtenção de compostos, para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento das leishmanioses, uma vez que a ausência de um medicamento altamente eficiente e de baixo custo para o tratamento das leishmanioses influencia cada vez mais novas pesquisas (IWU, et al, 1994; ROCHA, et al, 2005; ANTHONY, et al, 2005).

Após um longo período de negligência em pesquisas com produtos naturais, inúmeros estudos envolvendo produtos naturais vêm demonstrando atividade contra diferentes doenças. BAHRI, et al (2013) descreveram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Juniperus thurifera* L.var Africana. e seu componente majoritário sabineno. A atividade antiviral do extrato aquoso de *Melissa officinalis* e de seus compostos fenólicos como o ácido cafeíco, ácido p-cumárico e ácido rosmarínico demonstrou que o ácido rosmarínico tem efeito dose-dependente contra o Vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) (ASTANI, et al, 2012).

O efeito do óleo essencial de *Xylopia laevis* extraído de três regiões diferentes da Mata Atlântica no estado de Sergipe, Brasil, demonstrou atividade anti-tumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, o óleo essencial teve efeito citotóxico e *in vivo*, a taxa de inibição do crescimento tumoral teve média de 40%. O tratamento não afetou significativamente o peso corporal, a macroscopia dos órgãos, ou contagem de leucócitos no sangue (QUINTANS, et al, 2013).

Inúmeros grupos de pesquisa avaliaram o potencial terapêutico *in vivo* de diversas plantas medicinais no tratamento de diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo óleos essenciais, além de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, terpenóides (triterpenos, sesquiterpenos, monoterpenos), taninos, lignanas, chalconas, saponinas, quinonas, lignanas, demonstrando um efeito anti-leishmanicida promissor (SEN, et al, 2011). Nosso grupo demonstrou que a piperina, uma amida, extraída de *Piper nigrum* (pimenta do reino) foi ativa contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, causando danos ultraestruturais em formas promastigotas, induzindo alterações lipídicas e afetando o ciclo celular (FERREIRA, et al, 2011). Outro estudo relatou o efeito do látex extraído de *Himatanthus sucuuba* contra formas amastigotas de *L. amazonensis* de forma dose-dependente, sendo capaz de induzir a produção de óxido nítrico, TNF-alfa e inibindo TGF-beta em macrófagos. No tratamento *in vivo* por via oral com o látex de *H. sucuuba*, a carga parasitária da lesão na pata dos camundongos BALB/c também foi reduzida quando comparada ao controle (SOARES, et al, 2010).

Dessa forma, o estudo com produtos naturais torna possível a investigação de agentes medicinais que possam ser utilizados sozinhos ou em associação com as drogas tradicionalmente utilizadas pela indústria farmacêutica, além de serem relativamente baratos.

1.7 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários de origem vegetal, presentes em vários grupos de espécies de plantas, eles definem aroma e sabor de vários vegetais e são utilizados para proteção da planta e na atração de polinizadores. A volatilidade e solubilidade dos OEs em solventes orgânicos permitem o isolamento e caracterização destes compostos. Essas substâncias apresentam-se geralmente sob forma de líquidos oleosos, de aroma agradável e intenso, todavia existem os de aroma desagradável e ainda os inodoros (COSTA, 1994). Grandes variações na composição dos óleos essenciais têm sido observadas, dependendo da origem da planta, do estágio de desenvolvimento e da parte usada para a obtenção do óleo (SIMÕES, et al, 2002). O conteúdo do OE pode variar qualitativa e quantitativamente entre as espécies, e pode variar também devido a parâmetros climáticos e fatores agronômicos (KERROLA, et al, 1994).

Os constituintes dos OEs em geral são hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre orgânico (COWAN, 1999). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores concentrações e alguns apenas com traços (SIMÕES & SPITZER, 2000). Geralmente, os terpenóides são os constituintes preponderantes nos OEs, sendo os mais freqüentes os monoterpenos e os sesquiterpenos. (SIMÕES, et al, 2002).

Devido as suas fragrâncias delicadas, persistentes e agradáveis, os OEs possuem grande aplicação nas indústrias de perfume e alimentos. Em aromas, é muito importante reconhecer que, mesmo quando um componente está presente em grande concentração, não é ele necessariamente o responsável pelo aroma do produto. Este componente pode ser inodoro ou mesmo um realçador de odor. Este fato ocorre com óleos cítricos, onde os terpenos oxigenados, que são os constituintes em menores quantidades, contribuem com maior intensidade no aroma dos óleos (YABIKU & LARA, 1986).

Recentemente, vários trabalhos tem mostrado que óleos essenciais isolados de diferentes espécies de plantas possuem efeitos antimicrobianos (NOGUEIRA, et al, 2007; BAHRI, et al, 2013; ASHOUR, 2008; MONZOTE, et al, 2009; CAVALCANTI, et al, 2010; MACHADO, et al, 2010; ESCOBAR, et al, 2010). Óleos essenciais de *Cimnapogon nardus* (L.) Rendle (citronela), *Mentha pulegium* L. (poejo), *Melissa officinalis* L. (erva cidreira), *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga), *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (lipia) e *Mentha piperita* L. (hortelã) apresentaram atividade antimicrobiana em *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* (NOGUEIRA, et al, 2007). De forma semelhante, foi mostrado que o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. exibiu potente atividade acaricida contra *Tetranychus urticae* Koch (CAVALCANTI, et al, 2010).

O papel dos óleos essenciais em outros modelos de estudo, mostrou que o óleo essencial de *Senecio rufinervis* D.C (Asteraceae) possui atividade analgésica dose-dependente em camundongos, sendo este efeito atribuído à presença de terpenos (MISHRA, et al, 2010) e que o tratamento com o óleo essencial de *Alpinia speciosa* Schum. em ratos, apresentou ação anti-espasmódica e relaxante no íleo do animal, de forma dose-dependente (BEZZERA, et al, 2000). Óleo essencial de *Callitris neocaledonia*, tendo o guaiol (Figura 7A) como composto majoritário, apresentou atividade fungicida (WAIKEDRE, et al, 2012).

No estudo com agentes causadores de doenças parasitárias, foram testados os efeitos de óleos essenciais ricos em fenol de *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* e *Lippia graveolens* em *Giardia lamblia*. O óleo essencial de *T. capitata* se mostrou mais ativo na inibição do crescimento do parasito do que os outros óleos. Todos os óleos induziram a morte do parasito devido à perda da osmorregulação causada por alterações ultraestruturais

na primeira hora de tratamento, sendo tempo dependente, e não apresentaram citotoxicidade nas células de mamíferos *in vitro* (MACHADO, et al, 2010).

A utilização popular de OEs no tratamento de leishmanioses tem sido relatada (KVIST, et al, 2006). Os OEs e seus isolados podem atuar diretamente no parasito, causando danos estruturais e/ou funcionais em *Leishmania sp.*, ou podem atuar de modo indireto por ativação do sistema imune (ANTHONY, et al, 2005). A caracterização do óleo essencial de *Piper auritum* foi avaliada quanto a sua citotoxicidade e sua atividade leishmanicida. O safrole foi revelado como componente mais abundante com 87% de abundância relativa, presente no óleo, que mostrou atividade contra formas promastigotas de *Leishmania major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, inibindo o crescimento de amastigotas intracelulares de *L. donovani* com um IC₅₀ de 22.3 µg/mL (MONZOTE, et al, 2010).

O tratamento oral com óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* em camundongos infectados com *L. amazonensis*, mostrou ser mais eficaz quando comparado com animais tratados com glucantime, anfotericina B ou pentamidina (MONZOTE, et al, 2009). Um estudo anterior com o mesmo óleo essencial mostrou uma atividade sinérgica após tratamento em associação com pentamidina contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, porém, não foi observado este mesmo efeito em combinação com antimoniato N-metil-glucamina ou anfotericina B em associação com o óleo essencial (MONZOTE, et al, 2007). De forma semelhante, o tratamento *in vitro* de *L. amazonensis* com o óleo essencial de *Achillea millefolium* demonstrou efeito nas formas promastigotas e amastigotas do parasito com IC₅₀ de 7,8 µg/mL e 6,5 µg/mL, respectivamente. As formas promastigotas tiveram alterações ultraestruturais na sua forma e tamanho quando tratadas com IC₅₀ de 7,8 µg/mL (SANTOS, et al, 2010).

Outro óleo essencial com atividade leishmanicida é o *Ocimum gratissimum*, rico em eugenol, quando testado em *L. amazonensis* mostrou atividade para as formas promastigotas e amastigotas, com IC₅₀ de 135 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E seu componente majoritário, o eugenol com IC₅₀ de 80 µg/mL em formas promastigotas. Tanto as formas promastigotas e amastigotas tiveram alterações ultraestruturais importantes quando tratados com as concentrações do IC₅₀ do óleo essencial bruto. Além de não apresentar citotoxicidade para a célula hospedeira, seguida por um aumento na produção de óxido nítrico nas células infectadas (UEDA-NAKAMURA, et al, 2006). OLIVEIRA E COLABORADORES (2008) verificaram que esse óleo essencial também foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi* de maneira dose-dependente, além de causar danos ultraestruturais.

A atividade leishmanicida dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e de seu principal componente, o monoterpene citral, foram avaliadas por SANTIN E COLABORADORES (2009) e observaram que tanto o OE, quanto citral apresentaram atividade leishmanicida de forma dose-dependente, com IC₅₀ 3,2 µg/ml e 25 µg/ml, respectivamente. Além de causar danos ultraestruturais, como alterações nas mitocôndrias, no flagelo, na bolsa flagelar, e o aparecimento de múltiplos vacúolos no citoplasma de promastigotas de *L. amazonensis*.

A atividade biológica dos óleos essenciais de 19 espécies de *Lippia spp.* e sete dos seus principais compostos (geraniol, nerol, limoneno, nerol, carvacrol, p-cimeno, gamma-terpineno, carvona e timol) foram testados contra as formas livres e intracelulares de *L. chagasi* e *Trypanosoma cruzi*. O óleo essencial de *Lippia alba* mostrou ser capaz de matar formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, e o óleo essencial de *Lippia origanoides* exibiu ter a mesma atividade contra formas promastigotas de *L. chagasi*. Os constituintes, timol e S-carvona, são os dois componentes majoritários ativos presentes nesses OEs (ESCOBAR, et al, 2010).

Lippia sidoides Cham. cujo óleo essencial é rico em timol (Figura 7B) (56.7%), e carvacrol (16.7%), ambos monoterpênóides fenolíticos (LACOSTE, 1996 & LEMOS,1990), é conhecida popularmente como “alecrim pimenta”, encontrada no Nordeste do Brasil, é usada na medicina popular no tratamento de moléstias cutâneas, como anti-séptico oral e na

preparação de sabonete líquido usado na prevenção de infecção fúngica e no tratamento de picada de insetos. Estudos com este óleo essencial mostrou um potente efeito microbida contra o crescimento de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* (BOTELHO, et al, 2007). *Lippia sidoides* Cham., *Lippia origanoides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Justicia pectorales* e *Vitex agnus-castus* apresentaram atividade contra formas epimastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi*, sendo o óleo essencial de *L. sidoides* Cham. o mais efetivo contra as formas amastigotas do parasito (BORGES, et al, 2012). O efeito do óleo essencial bruto de *Lippia sidoides* Cham. e de seu composto majoritário timol, também foi testado em *L. amazonensis*, nestes dados o óleo essencial foi tóxico para formas promastigotas e amastigotas do parasita sem apresentar toxicidade para as células hospedeiras. Entretanto, o composto majoritário, timol, apresentou-se tóxico para as células do hospedeiro (MEDEIROS, et al, 2011). (Tabela 1)

Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc., é conhecida como “alfazema do Brasil”, é um arbusto com inflorescências de cheiro agradável de distribuição predominantemente tropical e subtropical. Esta espécie possui a sinonímia de *Lippia lycioides* Cham Steud. (Gillies & Hook), pertence à família das Verbenáceas (<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-113597>) *Nomencl. Bot. ed. 2, 2: 54 1841*. É utilizada na medicina popular brasileira, no combate de resfriados, catarros, dores da bexiga e de estômago, como excitante e melífera, e suas flores utilizadas na fabricação de perfumes. Ocorrendo principalmente em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul, chegando até o norte do país (<http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/cidrao.html>). Na literatura, há registro da composição química do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (coletada no Uruguai). SOLER E COLABORADORES (1986) descreveram 36 compostos (Tabela 2), em que o sabineno se apresentou como majoritário deste óleo, com 29,95% de sua composição.

Foi descrito para o óleo essencial de *A.gratissima* (sin. *L.lycioides*) atividade fungicida contra *Ascophaera apis*, onde inibiu seu crescimento *in vitro* (DELLACASA, et al, 2003), além de apresentar atividade virucida contra o vírus Junin (JUN), onde apresentou o cariofileno como seu composto majoritário com 15,84% (GARCIA, et al, 2003) e efeito antipasmódico em óleo de ratos (CONSOLINI, et al, 2011).

Considerando o repertório de compostos leishmanicidas existentes limitado, é essencial preservar a sua eficácia junto com o desenvolvimento contínuo de novos compostos. Conhecendo cada vez mais as características moleculares e bioquímicas dos compostos naturais, é fundamental esse conhecimento a fim de minimizar as possibilidades de resistência às drogas utilizadas tradicionalmente, existindo a possibilidade do uso de combinação de novos compostos com os convencionais, sendo uma opção quimioterápica futura atraente (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009).

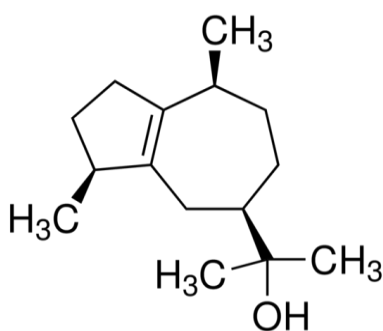


Figura 7A. Estrutura química do Guaiol
(Sesquiterpeno)

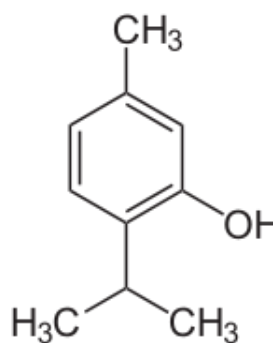


Figura 7B. Estrutura química do Timol
(Monoterpeno fenolítico)



Figura 8A. *Lippia sidoides* Cham.

<http://saude-joni.blogspot.com.br/2011/01/alecrim-pimenta.html>



Figura 8B. *Aloysia gratissima* (sin. *L. lycioides*)

<http://www.amwua.org>

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (MEDEIROS, et al, 2011)

Componentes químicos	Quantidade relativa %
Mirceno	0,38
Alfa- terpineno	0,4
p-cimeno	6,32
Limoneno	0,39
1,8-cineol	1,6
y-terpineno	1,06
Terpineno	0,62
Metil éter timol	1,44
Timol	78,37
E-cariofileno	6,17
(+) aromadendreno	0,46
Alfa-humuleno	0,32
Viridifloren	0,42
(+) espatulenolo	0,37
(-) óxido de cariofileno	1,68

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (sin. *L. lycioides*) (SOLER, et al, 1986).

Componentes químicos	Quantidade relativa %
Alfa-pineno	2,64
beta-pineno	9,66
Sabineno	29,95
Alfa-terpineno	1,38
Limoneno	1,31
1,8-cineol	1,39
Beta-cimeno	0,54
Alfa-elemenol	1,69
Pinocanfona	1,71
iso-pinocanfona	2,14
Alfa-cedreno	3,35
Beta-cariofileno	2,08
Hidrocarbono	7,38
Beta-cardineno	2,08
Beta-bisaboleno	5,81
Alfa-curcumeno	2,57
calameneno	1,28
Epóxido de cariofileno	0,5
Copaenona	3,59
Globulol ou ledol	3,48
Espatulenol	1,10
Copaenol	4,29
C ₁₅ álcool	3,87

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Identificar novos compostos com atividade leishmanicida, utilizando os óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Aloysia gratissima* (sin. *L. lycioides*) e seus constituintes majoritários contra *L. amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Aloysia gratissima* (sin. *L. lycioides*) e de seus constituintes majoritários em formas promastigotas e amastigotas do parasito *in vitro*;

- Verificar a citotoxicidade dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários para as células hospedeiras *in vitro*;

- Avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos tratados com os óleos essenciais e/ou de seus constituintes majoritários;

- Estudar o papel dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários na modulação da produção de óxido nítrico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1 Parasitos:

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas em meio Schneider's (*Schneider Insect Medium*, Sigma Aldrich) pH 6.8 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion) a 26 °C, utilizados na fase estacionária de crescimento (5-6dias).

3. 2 Obtenção de macrófagos:

Camundongos BALB/c foram inoculados com 1,5 ml de tioglicolato 3% por via intraperitoneal e no quarto dia após a estimulação, os macrófagos foram obtidos através de lavagem peritoneal com meio RPMI 1640 (Biochrom KG, Germany) pH 7,2 a 4°C. As células foram incubadas em lamínula de vidro de 13 mm² em placas de 24 poços e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ por pelo menos uma hora e meia. A seguir, as culturas foram lavadas com PBS (0,1M tampão fosfato – 0,85% salina) a 37°C para a remoção de células não aderentes e incubadas "overnigh" em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, nas mesmas condições acima descritas.

3.3 *Lippia sidoides* e *Aloysia gratissima*:

3.3.1 Obtenção das plantas:

Aloysia gratissima (Gill. & Hook.) Tronc. (sin. *Lippia lycioides* Steud) e *Lippia sidoides* Cham. foram coletadas no campus da Fundação Oswaldo Cruz, Rio Janeiro, em Fevereiro de 2001. Amostras foram depositadas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob registro RB 3237302 e 354749, respectivamente.

3.3.2 Extração dos óleos essenciais:

As amostras dos óleos essenciais e de seus componentes majoritários foram extraídas de folhas frescas de *Aloysia gratissima* (sin. *Lippia lycioides* Steud) e *Lippia sidoides* Cham., por hidrodestilação e analisadas pelo método de cromatografia de gás (ADAMS, 2007) e doadas pelos Drs. Mônica Freiman de S. Ramos (Fac. Farmácia - Dep. Medicamentos – UFRJ) e Antônio C. Siani (Instituto de Tecnologia em Fármacos, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, RJ) e diluídos em DMSO (SIGMA). Anfotericina B comercial foi adquirida da Cristália, Brasil e dissolvida em água.

3.4 Atividade anti-promastigota:

Promastigotas de *L. amazonensis* (1x10⁶) foram incubadas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino, na presença ou não de 1 µg/ml, 10 µg/ml e 100µg/ml de *Lippia sidoides* Cham. e *Aloysia gratissima* (sin. *L. lycioides*) adicionados no primeiro dia de cultivo. A sobrevivência dos parasitos foi estimada através da contagem dos parasitos viáveis/móveis em câmara de Neubauer durante três dias consecutivos.

3.5 Atividade anti-amastigota:

Macrófagos peritoneais aderidos em lamínulas foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (fase estacionária) em uma proporção de parasito:macrófago de 10:1 e incubados por 1 hora a 34°C em 5% de CO₂. Após esse período, os parasitos não aderidos foram removidos através de lavagens de PBS a 37°C e as culturas incubadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone). Após 24 horas de interação a 34°C em 5% de CO₂ a cultura foi tratada com as concentrações de 0,001 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 50 µg/mL do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. e 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 50 µg/mL do óleo essencial de *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*) e também foram utilizados os compostos majoritários dos óleos essenciais timol e guaiol (SIGMA), respectivamente. A anfotericina B (1µg/ml) foi usada como controle positivo. Após 24 horas nas mesmas condições descritas acima, as células foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas com metanol (100%) a temperatura ambiente, coradas com Giemsa e montadas com Enthellan (Merck). O índice de infectividade (% de macrófagos infectados x número médio de amastigota por macrófago) foi determinado microscopicamente através da contagem de no mínimo 200 células em duplicata.

3.6 Ensaio de morte de amastigota:

Macrófagos peritoneais foram plaqueados como descrito acima, em seguida foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* (fase estacionária) em uma proporção parasito:macrófago de 10:1. Após 1 hora de infecção, os parasitos não aderidos foram removidos através de lavagens com PBS a 37°C e em seguida foram incubados com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, onde ficaram interagindo por 24 horas a 34°C em 5% de CO₂. Após esse período, a cultura foi tratada ou não com as concentrações de 2µg/mL e 50µg/mL dos óleos essenciais de *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*) e *L. sidoides* Cham. e incubados por mais 24 horas. Após 24h de incubação, foi adicionado as células 0,01% de SDS (sulfato dodecil de sódio) por 10 minutos e em seguida adicionado o meio Schneider suplementado com soro fetal bovino a 10%. Após 48h a 26°C, o número de promastigotas foi estimado através da contagem dos parasitos viáveis/móveis em câmara de Neubauer.

3.7 Ensaio de fagocitose de promastigotas:

Macrófagos peritoneais obtidos como descrito anteriormente foram tratados com a concentração de 50 µg/mL de *L. sidoides* Cham. e *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*) e incubados por 24 horas. Após esse período, os macrófagos foram então infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária na proporção parasito:macrófago de 10:1, onde interagiram por 1 hora, em seguida as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. O índice de associação (% de macrófagos infectados x número médio de promastigotas por macrófago) foi determinado microscopicamente através da contagem de no mínimo 200 células em triplicata.

3.8 Citotoxicidade

3.8.1 Método do XTT:

Macrófagos peritoneais obtidos como descrito anteriormente foram plaqueados em placa de 96 poços (2×10^5 /poço) e incubados a $34^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ por 2 horas. As células não aderentes foram removidas através da lavagem com PBS, e incubados “*overnight*” em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após esse período, os macrófagos foram tratados com 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ dos óleos essenciais e com 100 $\mu\text{g/mL}$ de seus compostos majoritários timol e guaiol por 24 horas a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Após os tratamentos, os macrófagos foram lavados e incubados com PBS contendo 1.48 mM XTT (2,3-Bis [2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt, Sigma) ativado com 200mM de PMS (Phenazine Methosulfate, Sigma). Após 3 horas de incubação, o produto dessa reação foi lido e a atividade mitocondrial das células foi determinada 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 1% foi usada como controle positivo da reação. Os experimentos foram feitos em triplicata.

3.8.2 Azul de Trypan:

Macrófagos peritoneais obtidos como descrito anteriormente foram tratados ou não com 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ dos óleos essenciais e seus compostos majoritários timol e guaiol por 24 horas a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Os macrófagos foram lavados e incubados com solução de 0.03% de Azul de Trypan e o número de células viáveis foi determinada pela contagem de no mínimo 200 células em triplicata.

3.9 Produção de óxido nítrico (NO):

Macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato foram obtidos como descrito anteriormente. As células foram ativadas ou não com 200ng/mL de LPS (LPS-L3755- de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6; Sigma) e 200ng de IFN- γ recombinante murino (Prepothec) e tratados simultaneamente com os óleos essenciais de *L. sidoides* Cham. e *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*) nas concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. Após 48 horas, os sobrenadantes foram coletados e a concentração de NO foi estimada indiretamente pela quantificação de nitrito no sobrenadante pelo reagente de Griess (Sigma).

3.10 Análise estatística:

Os dados foram analisados pelo teste *t de Student* para comparação de dois grupos ou análise de variância (one-way ANOVA), para mais de dois grupos. As análises serão feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O valor de *P* será considerado significativo quando menor ou igual a 0.05.

4 RESULTADOS

4.1 Composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Aloysia gratissima* (sin. *Lippia lycioides*).

As atividades dos OEs são geralmente atribuídas à presença dos componentes químicos presentes, onde neste presente estudo, a composição química de *Lippia sidoides* Cham. (OE-10) (Tabela 3) e *Aloysia gratissima* (sin. *Lippia lycioides*) (OE-12) (Tabela 4), 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, o timol se apresentou como o componente majoritário do OE de *Lippia sidoides* Cham. com 79,3%. (Tabela 3).

Tabela 3. Constituintes do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.

Constituintes	Abundância relativa
p-cimeno	5,4%
γ -terpineno	3,4%
eter metil timol	1,6%
timol	79,3%
β -cariofileno	10,2%

A análise do OE de *Aloysia gratissima* (*Lippia lycioides*) mostrou o guaiol como o componente majoritário, com 19,7%. (Tabela 4).

Tabela 4. Constituintes do óleo essencial de *Aloysia gratissima* (sin. *Lippia lycioides*).

Constituintes	Abundância relativa
1,8 cineol	8,2%
sabineno	1,6%
δ -elemeno	3%
β -elemeno	2%
β -carofileno	4%
germacreno D	10,9%
biciclogermacreno	12,5%
germacreno B	12,6%
guaiol	19,7%
5-azulenemetanol	8%
desconhecidos	2,2%

4.2 Atividade anti-promastigotas dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Aloysia gratissima* (sin. *L. lycioides*).

Nossos resultados comprovaram que os óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. (OE-10) e *Aloysia gratissima* (sin. *L. lycioides*) (OE-12) nas concentrações 1, 10 e 100 µg/mL foram capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* *in vitro*. Verificamos que em 48 horas de tratamento com as concentrações 1, 10 e 100 µg/mL do OE-10 e OE-12 houve inibição de 24,9%, 30,6%, 70,5%, e 30,3%, 38,5%, 96% no crescimento do parasito, respectivamente. As concentrações inibitórias para 50% da população (IC₅₀) para os OE-10 e OE-12 em 48 horas são 22,2 µg/mL e 25,5 µg/mL, respectivamente. (Figuras 8A, B)

Em 72 horas foi observada uma inibição do crescimento de promastigotas de 42%, 64%, 64,7%, e de 31%, 44%, 85%, dos OE-10 e OE-12, respectivamente. As concentrações inibitórias para 50% da população (IC₅₀) para os OE-10 e OE-12 em 72 horas são 4,3 µg/mL e 14,2 µg/mL, respectivamente. (Figuras 9A, B). DMSO 1% usado como controle negativo inibiu 10,75 em 48 horas e 5,1% em 72 horas (dado não mostrado).

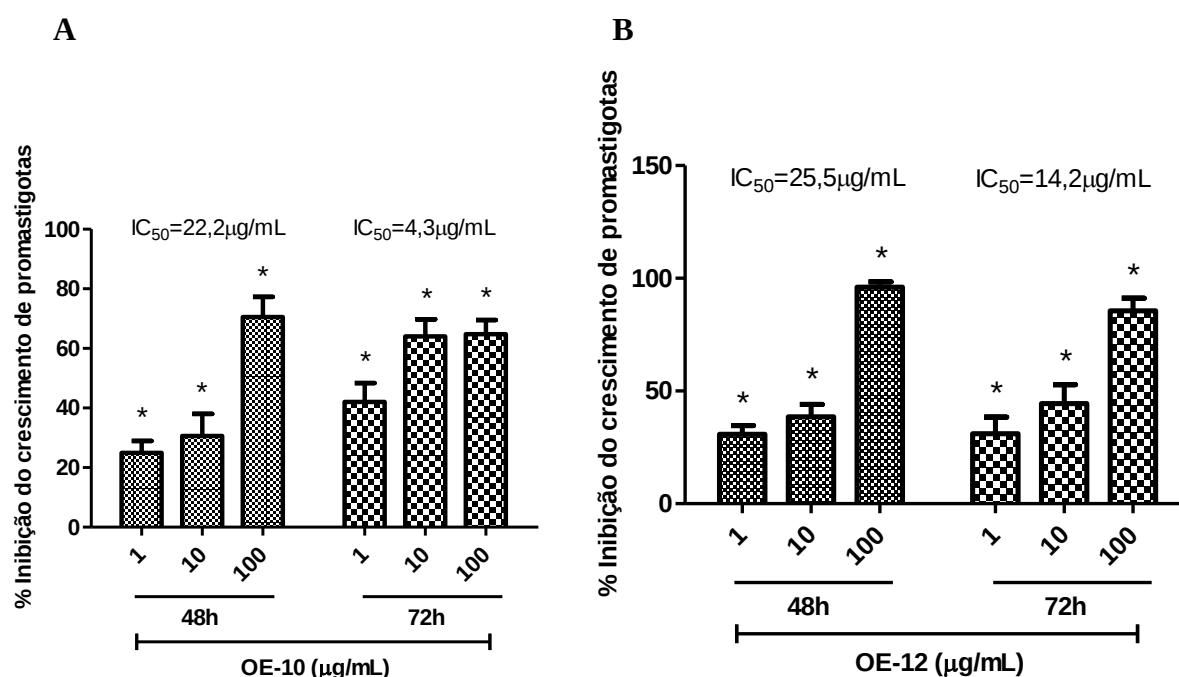


Figura 9. Efeito dos óleos essenciais de *L. sidoides* (OE-10) (A) e *A. gratissima* (OE-12) (B) no crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas (10⁶/mL) foram cultivados em meio *Schneider* suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência dos OE-10 e 12 nas concentrações 1, 10 e 100 µg/mL. A atividade anti-promastigota foi determinada através da contagem dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer durante 3 dias consecutivos. Resultados representam 6 experimentos independentes em relação ao controle e realizados em triplicata. * p<0.05 em relação ao CTRL.

4.3 Atividade anti-amastigota na infecção de macrófagos *in vitro*

A atividade anti-amastigota foi avaliada através da sobrevivência de formas intracelulares no interior de macrófagos infectados *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que o OE-10 nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 50 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram, 45,6%, 43,8%, 47% e as 2 últimas concentrações 51%, de inibição na sobrevivência de formas amastigotas, respectivamente, em relação com o controle não tratado. Atividade anti-amastigota do óleo essencial OE-12 mostrou ter uma atividade dose-dependente, onde as concentrações 0,01; 0,1; 1 e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram, respectivamente, 35,5%, 50%, 61% e 67,8% de inibição da sobrevivência de formas amastigotas com um IC_{50} de 0,7 $\mu\text{g/mL}$. A anfotericina B (AmB) foi utilizada como controle positivo na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, para ambos os óleos essenciais, onde apresentou a média de 88% de inibição (dado não mostrado). O DMSO a 1% foi utilizado como controle negativo, onde mostrou inibição de 15,5%.

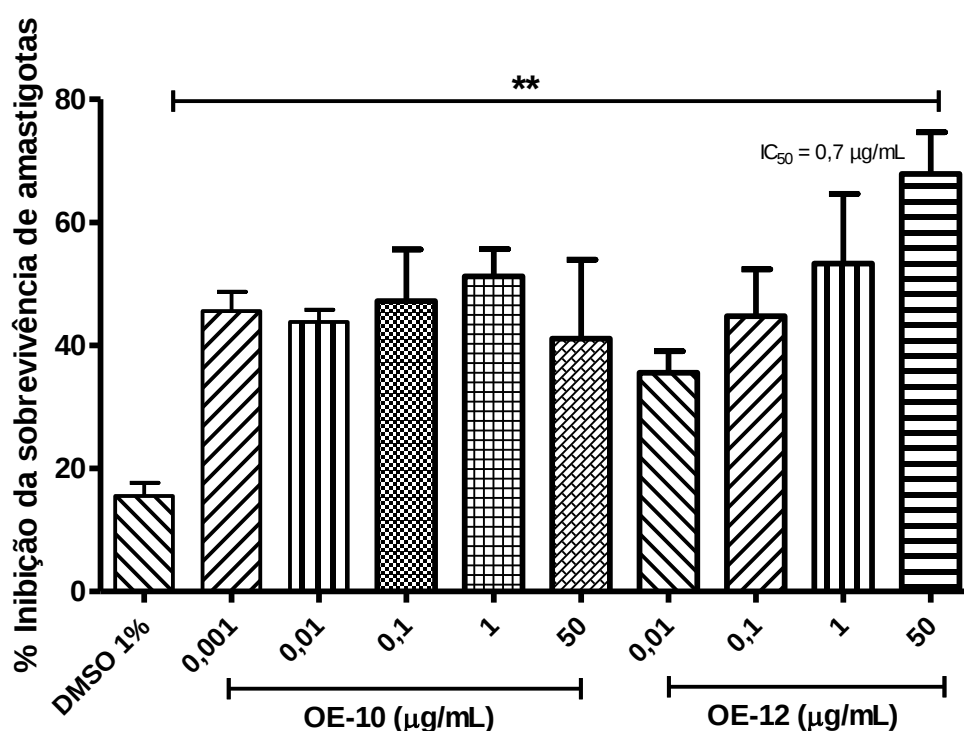


Figura 10. Efeito dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (OE-10) e *Aloysia gratissima* (OE-12) na sobrevivência de amastigotas de *Leishmania amazonensis* em macrófagos *in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas (10p:1mo) por 24 horas e posteriormente foram tratados com 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 50 $\mu\text{g/mL}$ dos OE-10 e OE-12 por 24h. Resultados representam a média de três experimentos $\pm$ SEM realizados em triplicatas. ** $p < 0,001$ em relação ao DMSO.

4.4 Ensaio de morte de amastigotas

A fim de verificarmos se as formas amastigotas de *L. amazonensis* presentes em macrófagos infectados e tratados com os OE-10 e OE-12 eram capazes de se diferenciar em formas promastigotas, após o tratamento, as células infectadas foram incubadas por 48 horas a 27°C em meio de cultura *Schneider* suplementado com soro fetal bovino. Nossos dados mostram que os parasitos não se encontravam viáveis após o tratamento, havendo uma inibição de 76%, 77% e 85% e 91% na diferenciação dos amastigotas em promastigotas, com os óleos OE-10 e OE-12 nas concentrações de 2 e 50 µg/mL, respectivamente. (Figura 11)

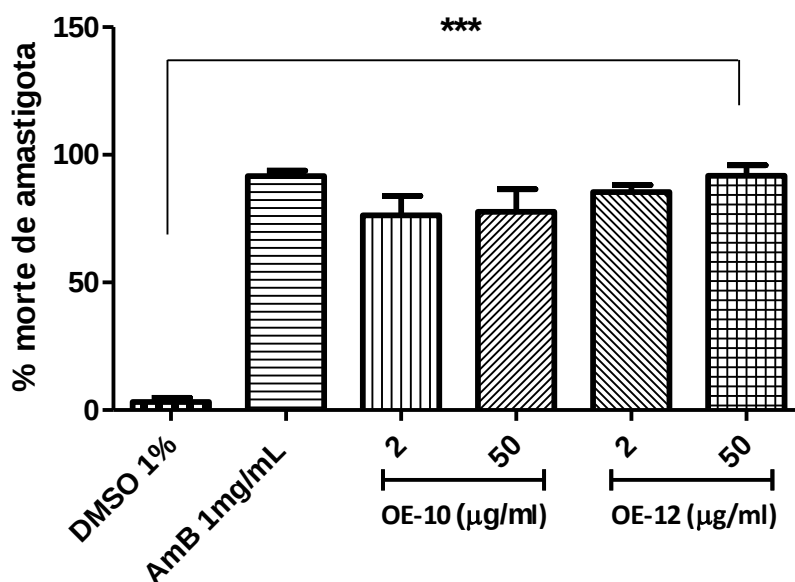


Figura 11. Efeito dos OE-10 e 12 na morte das formas amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas por 24 horas e posteriormente tratados por 24 horas com os OEs nas concentrações 2 e 50 µg/mL. Após a infecção e tratamento dos macrófagos, eles foram cultivados em meio *Schneider* suplementado com 10% de SFB a 26°C por 48 horas, em seguida o número de promastigotas foi determinado através da contagem dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer. DMSO 1% foi utilizado como controle e anfotericina B (AmB) 1 µg/mL foi utilizado como controle positivo. Resultados representam a média $\pm$ SEM de 3 experimentos independentes em relação ao controle e realizados em triplicata. *** $p < 0.05$ em relação ao DMSO.

4.5 Ensaio Citotóxico

4.5.1 Viabilidade Mitocondrial de macrófagos tratados com OEs

Para verificar a citotoxicidade dos OE-10 e OE-12 em macrófagos murinos peritoneais, a atividade mitocondrial foi avaliada por meio da atividade das desidrogenases mitocondriais das células. Nossos resultados mostraram que os macrófagos, após o tratamento com os OEs 10 e 12 nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram 77%, 84% e 69% para o OE-10 e 89,2%, 75,9% e 73,8% para o OE-12 de células viáveis, respectivamente. O diluente DMSO a 0,4% apresentou 90,1% de células viáveis. A azida sódica a 1% foi utilizada como controle positivo, por apresentar toxicidade para os macrófagos, onde foi observado apenas 22% de macrófagos viáveis.

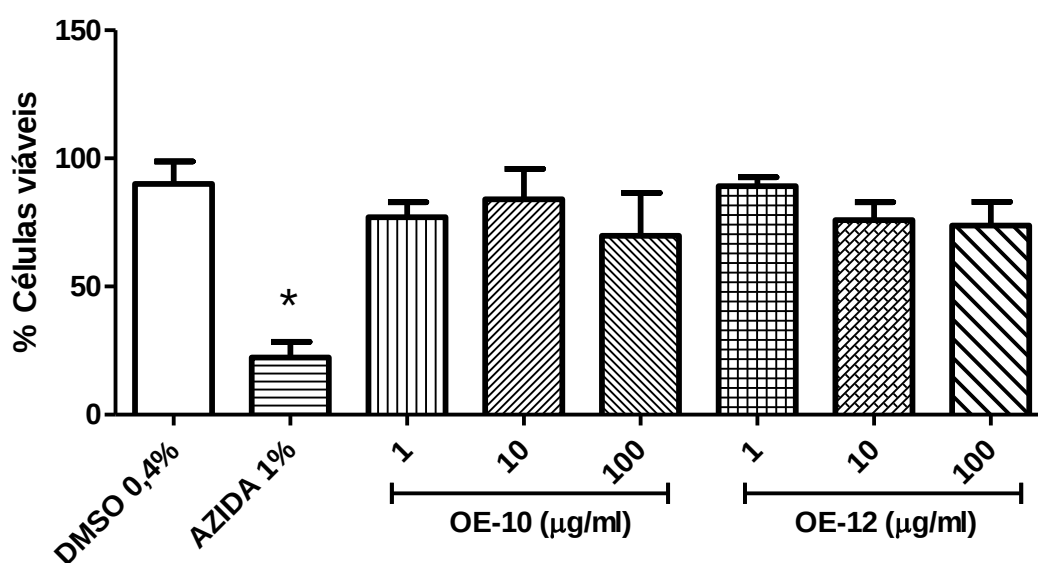


Figura 12. Citotoxicidade dos OE-10 e OE-12 para macrófagos peritoneais murinos *in vitro*. Macrófagos foram incubados com 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de OE-10 e OE-12 por 24 horas a 37°C, 5% CO_2 . O DMSO a 0,4% foi utilizado como controle. A azida sódica a 1% foi utilizada como controle positivo. A viabilidade foi medida utilizando o método de XTT. Os resultados são representativos de três experimentos realizados em triplicatas e expresso como percentagem de células viáveis $\pm$ SEM.* $p < 0.05$ em relação à azida sódica.

4.5.2 Integridade da membrana citoplasmática de macrófagos tratados com OEs

Outro método utilizado para averiguar a citotoxicidade dos OEs para os macrófagos murinos foi o teste de exclusão do corante azul de Trypan, que permite verificar a viabilidade celular através de danos a sua membrana citoplasmática. Nossos resultados demonstraram que os macrófagos tratados com OE-10 e OE-12 nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ permaneceram viáveis em 95%, 94% e 89%, e 90%, 91% e 89%, respectivamente, quando comparados ao controle não tratado e ao DMSO a 1%, diluente dos compostos, sugerindo que os OEs não são capazes de alterar a integridade da membrana celular em nenhuma das concentrações testadas. O diluente dos óleos essenciais, o DMSO a 1% também não apresentou danos para a membrana citoplasmática dos macrófagos, onde 94% dos macrófagos estavam viáveis (Figura 13).

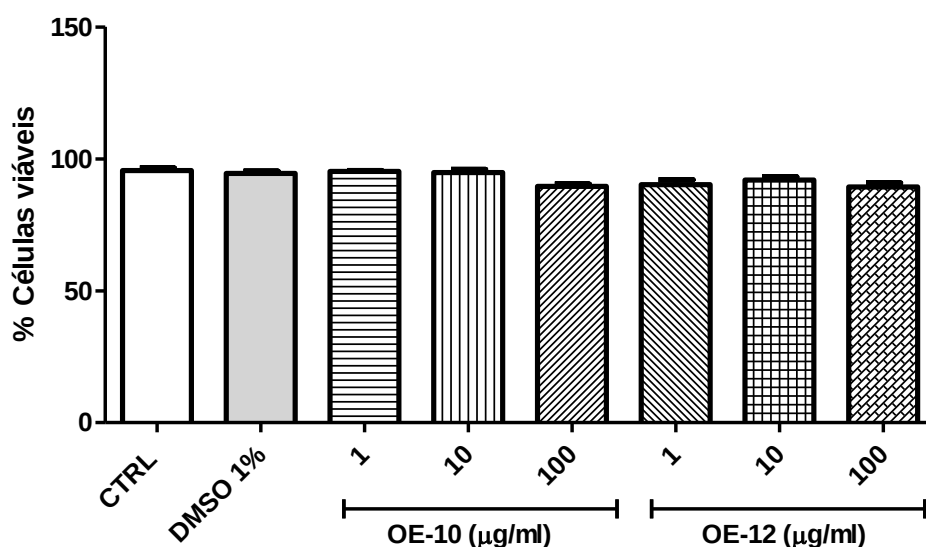


Figura 13. Citotoxicidade dos OE-10 e 12 para macrófagos murinos peritoneais *in vitro*. Macrófagos murinos foram incubados com 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de OE-10 e OE-12, por 24 horas a 37°C, 5% CO_2 . A viabilidade de membrana citoplasmática da célula foi avaliada por meio do teste de exclusão do corante azul de Trypan. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata e expresso como porcentagem de células viáveis.

4.6 Ensaio de fagocitose de promastigotas tratados com os OEs

O índice de associação dos macrófagos peritoneais murinos foi avaliado através da incubação das células com formas promastigotas de *L. amazonensis*, que serviu como partícula a ser fagocitada. Foi observado que a funcionalidade fagocítica dos macrófagos não foi alterada após pré-tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo esta a maior concentração utilizada nos testes anti-amastigota dos OE-10 e OE-12. Embora não haja diferença estatística, foi observado um aumento de 19% e 23% na capacidade fagocítica dos macrófagos tratados com OE-10 e OE-12, respectivamente, em relação ao controle. O diluente DMSO a 1%, foi utilizado como controle, e também não foi capaz de alterar a funcionalidade fagocítica da célula. (Figura 14)

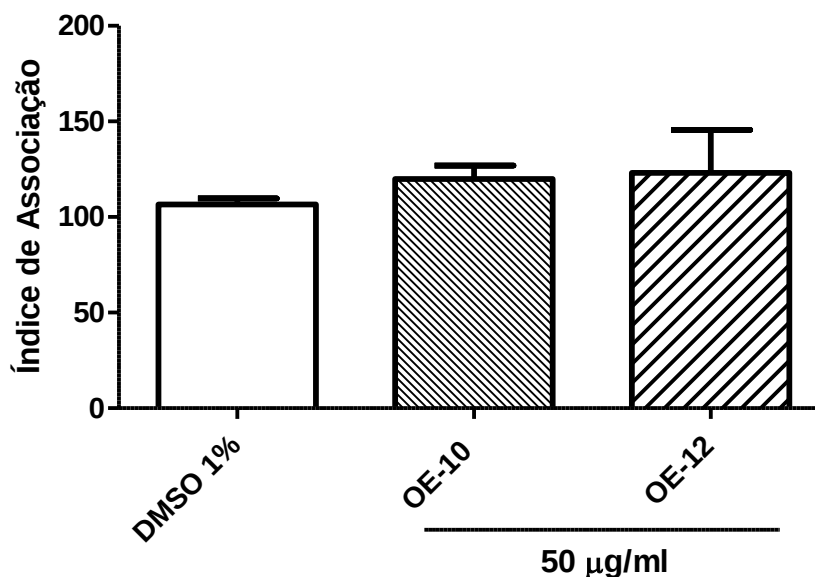


Figura 14. Efeito dos OE-10 e 12 na fagocitose de *L. amazonensis* em macrófagos. Macrófagos peritoneais foram tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ do OE-10 e 12, após 24 horas de tratamento, os macrófagos foram infectados por 1 hora com formas promastigotas na proporção de 1:10 parasitos por macrófago. As células foram fixadas após 1 hora de incubação, fixadas e coradas. O índice associação (% células infectadas x número de parasitos/célula) foi determinado após contagem de pelo menos 200 células em triplicata.

4.7 Produção de Óxido Nítrico de macrófagos tratados com os OEs

Como o óxido nítrico (NO) é um potente agente microbicida produzido por macrófagos ativados, o qual é capaz de matar as formas intracelulares do parasito, nós avaliamos a capacidade dos OEs em modular a produção de NO em macrófagos em repouso e em macrófagos ativados.

Verificamos que a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais apresentou um aumento de aproximadamente 4 vezes, quando estes foram ativados com 200 ng/mL de LPS e 100 µg/mL de Interferon gamma (IFN- γ) por 48 horas, quando comparados ao controle não ativado. Entretanto, quando incubamos os macrófagos ativados com OE-10 e OE-12 nas concentrações de 1 µg/ml e 50 µg/ml foi observada uma inibição da produção de NO pelos macrófagos ativados, da mesma forma foi observado que os OE-10 e OE-12 não são capazes de estimular a produção de NO em macrófagos em repouso. Assim, além dos OEs não se mostrarem capazes de induzir a produção de NO pelos macrófagos também inibem essa produção em macrófagos ativados, sugerindo assim que o efeito leishmanicida observado independe da produção de NO.

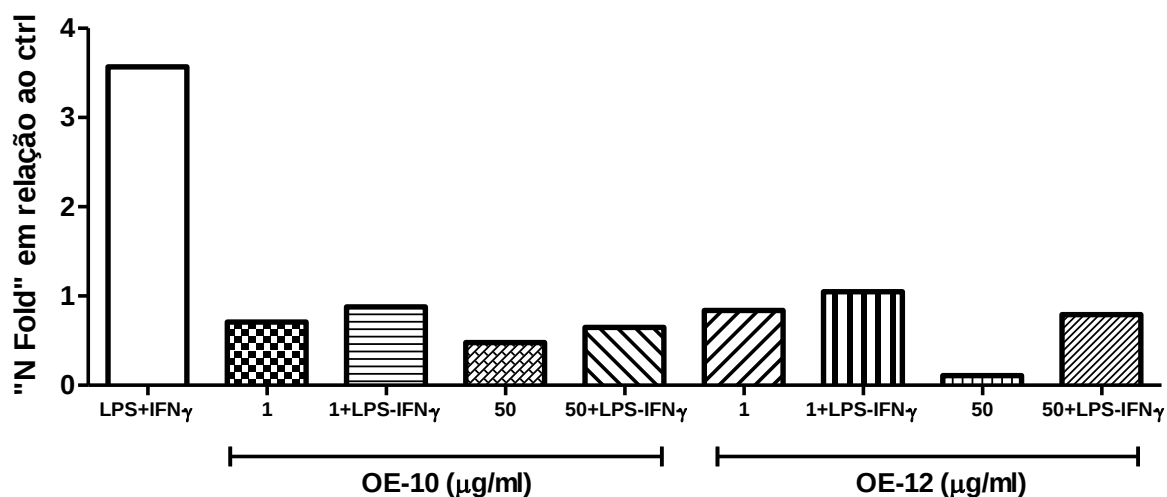


Figura 15. Efeito dos OE-10 e 12 na produção de óxido nítrico (NO). Macrófagos peritoneais murinos ativados ou não com LPS e IFN- γ foram incubados na presença ou ausência de 1 e 50 µg/mL dos OE-10 e OE-12. A produção de NO foi avaliada após 48 horas de tratamento, onde o sobrenadante foi recolhido e a produção de NO foi mensurada pela concentração de nitrito pela metodologia de Griess. Os resultados são apresentados em formato de “N fold” em relação ao controle não-ativado.

4.8 Atividade anti-amastigota na infecção de macrófagos *in vitro* de timol e guaiol

A fim de avaliarmos se os constituintes majoritários dos OE-10 e 12, timol e guaiol, respectivamente, eram responsáveis pelo efeito leishmanicida observado nos OEs, nós verificamos a atividade anti-amastigota através da sobrevivência de formas intracelulares de *L. amazonensis in vitro*. Nossos resultados demonstraram que o composto majoritário do OE-10, o timol, nas concentrações de 0,01, 0,1 e 50 $\mu\text{g/mL}$ inibiram 22,3%, 39,9% e 46,2% a sobrevivência dos amastigotas, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as concentrações testadas e novos testes devem ser feitos a fim de determinar uma curva de concentração-efeito e o IC_{50} (Figura 16A).

A atividade anti-amastigota do composto majoritário do OE-12, o guaiol, mostrou ter uma atividade dose-dependente, semelhante ao que foi observado no uso do óleo essencial bruto. As concentrações 0,1, 1 e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram, respectivamente, 20,8%, 60,1% e 75,6% de inibição da sobrevivência de formas amastigotas. A concentração capaz de inibir 50% dos parasitas intracelulares (IC_{50}) foi de 0,7 $\mu\text{g/mL}$. (Figura 16B). O DMSO 1% inibiu 13,7%.

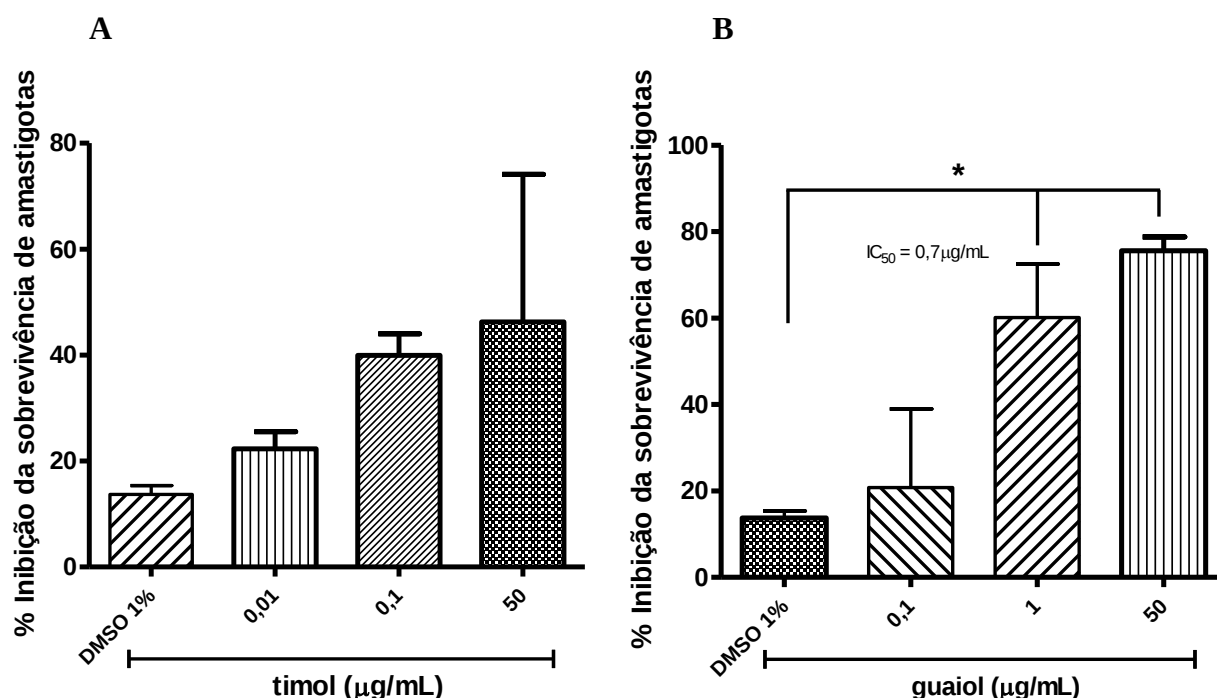


Figura 16. Efeito de timol e guaiol na sobrevivência de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos *in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas (10p:1m) por 24 horas e posteriormente foram tratados com diferentes concentrações de timol ou guaiol por 24 horas. Resultados representam a média de três experimentos $\pm$ SEM realizados em triplicatas. * $p < 0,05$ 1 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao DMSO.

4.9 Ensaio Citotóxico

4.9.1 Viabilidade Mitocondrial de macrófagos tratados com timol e guaiol

Verificamos que a maior concentração de timol e guaiol testada de 100 $\mu\text{g/mL}$ em macrófagos murinos peritoneais, não foi capaz de alterar atividade das desidrogenases mitocondriais das células. Nossos resultados mostraram que os macrófagos após o tratamento com timol e guaiol apresentaram 100 % e 99,2% de células viáveis, respectivamente. (Figura 17)

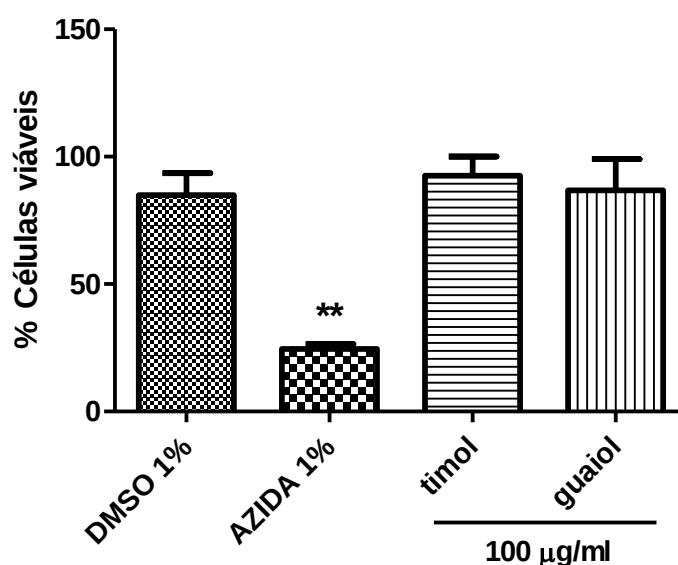


Figura 17. Citotoxicidade de timol e guaiol para macrófagos peritoneais murinos *in vitro*. Macrófagos foram incubados com 100 $\mu\text{g/mL}$ dos por 48 horas a 37°C, 5% CO_2 . O DMSO a 1% foi utilizado como controle. A azida sódica a 1% foi utilizada como controle positivo. A viabilidade foi medida utilizando o método de XTT. Os resultados são representativos de três experimentos realizados em triplicatas e expresso como percentagem de células viáveis.** $p < 0,05$ em relação ao DMSO.

4.9.2 Integridade da Membrana citoplasmática de macrófagos tratados com timol e guaiol

Outro método utilizado para averiguar a citotoxicidade dos componentes timol e guaiol para os macrófagos murinos foi o teste de exclusão de azul de Trypan. Nossos resultados demonstraram que os macrófagos tratados com timol e guaiol nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ permaneceram viáveis em 92,9%; 94,3%; 90,1 e 88,6%, 88,6; 88%, respectivamente, quando comparados ao controle não tratado e ao DMSO, indicando que o timol e guaiol não são capazes de afetar a integridade da membrana celular em nenhuma das concentrações testadas. (Figura 18)

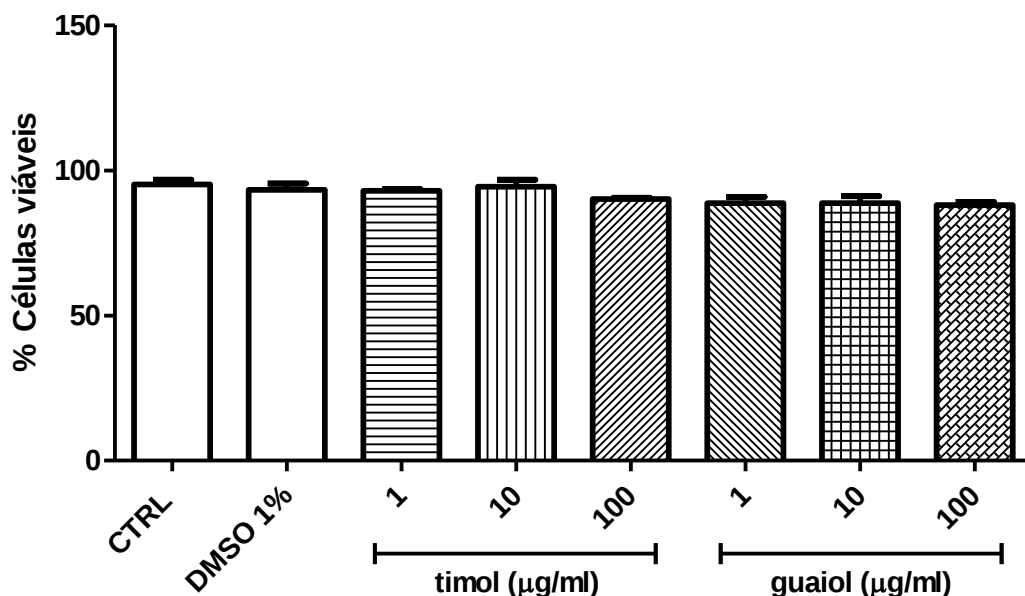


Figura 18. Citotoxicidade do timol e guaiol para macrófagos murinos peritoneais *in vitro*. Macrófagos foram incubados com 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de timol ou guaiol por 24 horas a 37°C, 5% CO_2 . A viabilidade de membrana citoplasmática da célula foi avaliada por meio do teste de exclusão do corante azul de Trypan. Os resultados representam três experimentos independentes realizados em triplicata expressos em % células viáveis.

5 DISCUSSÃO

No panorama atual, os fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses apresentam inúmeros problemas limitando seu uso, tais como: alto custo, severos efeitos adversos, difícil administração, surgimento de cepas resistentes (BERMAN, 2003; SANTOS, et al, 2008). Estes problemas vêm incentivando pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes com efeito leishmanicida, que sejam mais eficientes, menos tóxicos e de fácil administração (FAGHIHI & KIA, 2003; DEMICHELII, et al, 2004). Os óleos essenciais assim como seus componentes possuem um amplo espectro de efeitos farmacológicos, tais como: fungicida (MESA ARANGO, et al, 2009), ação anti-pasmódica (BEZZERRA, et al, 2000), analgésica (MISHRA, et al, 2010), anti-inflamatória (VERAS, et al, 2013), antimicrobiana (NOGUEIRA, et al, 2007), acaricida (LEBOUVIER, et al, 2013), bacteriana (BAHRI, et al, 2013), tripanossomicida (BORGES, et al, 2012), entre outros. Essas propriedades tem sido atribuída a presença de uma mistura de constituintes, onde o mais abundante composto químico são os terpenóides, especificamente os monoterpenos e sesquiterpenos.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a atividade leishmanicida de diversos óleos essenciais de plantas e seus componentes majoritários contra formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA, et al, 2006; SANTIN, et al, 2009; MONZOTE, et al, 2007, 2010; OLIVEIRA, et al, 2009; ESCOBAR, et al, 2010; SANTOS, et al, 2010; MEDEIROS et al, 2011; MACHADO, et al, 2012).

As atividades dos óleos essenciais são geralmente atribuídas à presença dos componentes químicos presentes, em nosso estudo, a composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. (OE-10) (Tabela 4) e *Aloysia gratissima* (*Lippia lycioides*) (OE-12) (Tabela 5), foi extraída por hidro-destilação e analisada pelo método de cromatografia gasosa, igualmente utilizado por MEDEIROS, et al, 2011 e CRAVEIROS, 1981. O timol (Figura 7B) foi identificado como o principal constituinte do OE-10, atingindo cerca de 80% da sua composição, dados semelhantes foram encontrados em outros estudos, como por exemplo: 78,37% (MEDEIROS, et al, 2010), 68,3% (OLIVEIRA, et al, 2009), 78,4% (BORGES, et al, 2012) e 84,9% (VERAS, et al., 2013). Outros quatro compostos foram também detectados, ainda que em quantidades menores. Na outra espécie de *Lippia* estudada, *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*), o guaiol (Figura 7A) foi identificado como o principal constituinte do OE-12, atingindo 19,7% de sua composição, porém, outros estudos investigando a composição química do OE de *A. gratissima* obtiveram 15,84% de cariofileno (GARCIA, et al, 2003) e 29,95% de sabineno (SOLER, et al, 1986) como seus componentes majoritários, em nosso estudo obtivemos 4% e 1,6% destes compostos, respectivamente. Em um estudo com OEs de outras espécies, 30,2% de guaiol foi descrito como majoritário no OE de *Callitris neocaledonia*, onde este óleo apresentou efeito fungicida (WAIKEDRE, et al, 2012) e 13.1% foi encontrado no OE de *Calycorectes sellowianus* que possui efeito anti-inflamatório (APEL, et al, 2010), mostrando que este constituinte está presente em óleos essenciais de plantas com algum tipo de efeito biológico.

A diferença na quantidade dos componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais se mostra muito variável, essas diferenças entre os rendimentos descritos por outros grupos de pesquisa e aqueles obtidos por nosso grupo pode ser atribuída a fatores como características físicas do solo, clima, idade da planta, época de coleta e diâmetro da árvore. Esses fatores tem sido amplamente descritos na literatura para ervas aromáticas, tais variações podem dificultar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, porém mesmo apresentando diferenças quantitativas, eles mantêm seu efeito qualitativo (VELASCO-NEGUERUELA, et al, 1993; RIGAMONTE-AZEVEDO, WADT & WADT, 2004). De qualquer forma, os OEs e seus constituintes são uma fonte alternativa para obtenção de substâncias ou fitoterápicos para terapia de diversas doenças, inclusive da leishmaniose, o

que nos estimulou a estudar a atividade leishmanicida de OEs dessas duas espécies de *Lippia* bem como suas propriedades biológicas e de seus compostos majoritários.

Em nossos estudos demonstramos que os OE-10 e 12 obtidos de *Lippia sidoides* e *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*), respectivamente, são ativos contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Conforme estudo anterior de MEDEIROS E COLABORADORES (2011), OE de *L. sidoides* se mostrou efetiva contra formas promastigotas, no entanto em nossa avaliação, este OE-10 foi cerca de 2 vezes mais efetivo contra formas promastigotas, quando comparado ao IC₅₀/48h descrito em *L. amazonensis* por MEDEIROS E COLABORADORES (2011). Já no estudo utilizando *L. chagasi*, OLIVEIRA E COLABORADORES (2009), obtiveram um efeito dose-dependente do OE de *L. sidoides*, apresentando um IC₅₀/72h em *L. chagasi*, 20 vezes menos eficaz que o IC₅₀/72h de *L. amazonensis* obtido em nosso estudo. Esta diferença pode ser atribuída aos constituintes presentes nos OEs e sua quantidade relativa, que pode variar mesmo dentro da mesma espécie, dependendo das condições e o local de coleta, assim como a espécie de parasito usado e as condições experimentais. O OE-12 de *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*), se mostrou eficaz contra promastigotas de *L. amazonensis*, com IC₅₀/48 horas de 25,5 µg/mL próximo do IC₅₀/48h da *L. sidoides*, que foi de 22µg/mL.

A análise da viabilidade dos macrófagos na presença dos OEs 10 e 12 e, de seus compostos majoritários, timol e guaiol, mostrou que mesmo nas maiores concentrações testadas, nenhum dos compostos apresentou toxicidade para o macrófago, não alterando sua atividade mitocondrial, tampouco a integridade de sua membrana citoplasmática. O mesmo efeito foi observado por MEDEIROS E COLABORADORES (2011) utilizando macrófagos peritoneais murinos tratados com OE de *L. sidoides* e timol. Entretanto, RONDON E COLABORADORES observaram que óleo essencial de *L. sidoides* a 100µg/mL foi tóxica para cerca de 40% das células RAW 264.7, que pode ser explicado pela diferença dos constituintes encontrados, que é altamente variável. A avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos tratados também não foi alterada mesmo na maior concentração testada de ambos os OEs 10 e 12.

O OE de *L. sidoides* e seu constituinte majoritário, timol, mostraram efeito anti-amastigota em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, no entanto até as concentrações testadas, não conseguimos atingir índice inibitório acima de 50%, o que inviabilizou o cálculo do IC₅₀. Por outro lado, MEDEIROS E COLABORADORES (2011) demonstraram um IC₅₀ de 34µg/mL do OE bruto para formas amastigotas intracelulares, mas não demonstraram IC₅₀ do timol para esse estágio de vida do parasito. Em nossos estudos novos experimentos devem ser realizados para determinar os ICs₅₀ tanto do OE-10 quanto de seu constituinte majoritário.

O OE-12 de *A. gratissima* e o constituinte guaiol, apresentaram uma atividade anti-amastigota, de forma dose-dependente, com um IC₅₀ igual, tanto para o OE-12 bruto como para o seu constituinte majoritário, indicando que o guaiol por estar presente em maior quantidade no OE-12, seja um possível responsável pelo efeito observado contra a forma intracelular do parasito. Até o momento, nenhum estudo avaliou a capacidade anti-parasitária do OE de *A. gratissima* (sin. *L. lycioides*), os poucos trabalhos com este OE mostra efeito fungicida e anti-viral (DELLACASA et al, 2003; GARCIA et al, 2003). O mesmo ocorre com o guaiol, uma vez que não há relatos de efeito anti-parasitário, apenas um estudo mostrando a transformação do guaiol por fungos em compostos que apresentam efeito antibacteriano (CHOUDHARY et al, 2007). A análise do IC₅₀ de promastigotas e amastigotas, nos mostra que o OE-12 apresentou atividade mais efetiva contra formas amastigotas em comparação com as formas promastigotas, sugerindo um efeito específico sobre as formas intracelulares, que são as responsáveis pela manutenção da infecção nos hospedeiros vertebrados.

Considerando a inibição da sobrevivência dos amastigotas nos macrófagos infectados tratados com os OEs 10 e 12, nós decidimos investigar se essas formas intracelulares eram capazes de romper o macrófago e 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 de 76,5% do OE-10 e 87% do OE-12 na concentração de 2µg/mL, indicando assim que os amastigotas presentes nos macrófagos tratados estavam inviáveis.

Uma vez que observamos uma diminuição na sobrevivência dos amastigotas e uma menor viabilidade dessas formas, nós avaliamos se o efeito microbicida observado nos macrófagos tratados com os OEs 10 ou 12 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 resultados demonstraram que a inibição da sobrevivência de formas amastigotas independe da modulação da produção de NO pelos macrófagos. Ao contrário, os OEs inibiram a produção de NO nos macrófagos ativados, diferente do que foi observado por UEDA-NAKAMURA (2006), onde macrófagos peritoneais murinos infectados ou não por *L. amazonensis*, pré-tratados e pós-tratados ou não com o óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, o qual apresenta o eugenol como seu composto majoritário, foram capazes de estimular a produção de NO comparado ao controle não tratado e não infectado com o parasito. De forma semelhante, o óleo essencial de *Croton cajucara*, rico em linalool, aumenta em 60% a concentração de NO em macrófagos infectados (SOCORRO et al, 2003). No entanto, diversos estudos sobre produtos naturais com efeito leishmanicida, tem mostrado que muitos desses produtos são ativos contra o parasito, sem necessariamente envolver o mecanismo de produção de NO (SOARES et al, 2007; MARTÍN-QUINTAL et al, 2010; DANELLI et al, 2009; FERREIRA et al, 2011)

É sabido que os constituintes terpênicos são responsáveis pelas características hidrofóbicas dos OEs, que permite que estes permeiem livremente as membranas celulares e matem os parasitos, afetando vias metabólicas e organelas (BURT et al, 2005; BAKKALI et al, 2008; KNOBLOCH et al, 1989). A ausência de modulação da atividade microbicida dos macrófagos pela produção de NO, sugere que um possível efeito direto dos OE-10 e 12 deva ser investigado, uma vez que já foi comprovado que óleos essenciais são capazes de causar alterações ultraestruturais, gerando lesões na mitocôndria, cinetoplasto, núcleo e flagelo de promastigotas de *Leishmania sp.*, além da capacidade de alterar sua divisão celular (SANTOS, et al, 2010; MEDEIROS, et al, 2011; UEDA-NAKAMURA et al, 2006). No entanto, apesar de não se observar a modulação da produção de NO, não pode ser descartado que outros mecanismos do macrófago possam ser modulados pelos OEs, como a produção de citocinas, produção de ROS e a atividade da enzima arginase.

6 CONCLUSÕES

- Os óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham. e *Aloysia gratissima* (sin. *Lippia lycioides*) e seus componentes majoritários timol e guaiol, apresentaram efeito anti-*Leishmania amazonensis* *in vitro*;
- Os óleos essenciais de *L. sidoides* e *A. gratissima* apresentaram efeito anti-promastigota e anti-amastigota, porém o óleo essencial de *A. gratissima* de forma dose dependente;
- Os compostos majoritários timol e guaiol apresentaram efeito anti-amastigota;
- Não foi observado toxicidade para as células hospedeiras como demonstrado pela atividade mitocondrial e a integridade da membrana após tratamento com os óleos essenciais e os dois compostos testados neste estudo;
- Óleos essenciais de *L. sidoides* e *A. gratissima* não alteraram a capacidade fagocítica da célula hospedeira;
- O efeito anti-*Leishmania amazonensis* dos óleos essenciais testados é independente da produção de óxido nítrico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation**, 2007. Carol Stream, IL.

ALVAR, J; VELEZ, I; BERN, C; HERRERO, M; DESJEUX, P; CANO, J; JANNIN, J; DEN BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**. 2012. The WHO Leishmaniasis Control Team.

AMATO, V.S., TUON, F.F., BACHA, H.A., NETO, V.A. NICODEMO, A.C. Mucosal leishmaniosis Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**. 2008. 105: 1.

ANTHONY, J. P., FYFE, L. AND SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? **Trends Parasitology**., 2005. 21(10):462-468.

APEL MA, LIMA ME, SOBRAL M, YOUNG MC, CORDEIRO I, SCHAPOVAL EE, HENRIQUES AT, MORENO PR. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**. 2010. 48(4):433-8.

ASHOUR HM. Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*. **Cancer Biology and Therapy**. 2008. 7(3):399-403.

ASTANI A, REICHLING J, SCHNITZLER P. *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus *in vitro*. **Chemotherapy**. 2012; 58 (1): 70-7.

AZEVEDO ACR, SOUZA NA, MENESES CRV, COSTA WAC, COSTA SM. Ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the north of the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, 2002. 97:459-64.

AZEVEDO C, SAIARDI A. Extraction and analysis of soluble inositol polyphosphates from yeast. **Nature Protocols**. 2006;1 (5):2416-22.

BAHRI F, HARRAK R, ACHAK N, ROMANE A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from *Juniperus thurifera* L. var. *Africana*. **Natural Product Research**. 2013

BAKKALI, F., AVERBERK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., Biological effects of essential oils - a review. **Food Chemistry Toxicology**. 2008. 46, 446–475.

BASSELIN, M., DENISE, H., COOMBS, G.H. BARRETT, M. Resistance to Pentamidine in *Leishmania mexicana* Involves Exclusion of Drug from Mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2002. 46: 3731.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigote by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, 2007. 37: 1097-1106.

BATES, P.A. & ROGERS, M.E. New insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**. 2004. 4: 601.

BELLOCHIO S; GAZIANO R; BOZZA S; ROSSI G; MONTAGNOLI, C; PERRUCIO, K; CALVITTI M; PITZURRA L & ROMANI L. Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 2005. 55 (2), 214-22.

BERMAN, J. BRYCESON, A.D.M., CROFT, S., ENGEL, J., GUTTERIDGE, W., KARBWANG, J., SINDERMAN, H., SOTO, J., SUNDAR, S., URBINA, J.A. Miltefosine: issues to be addressed in the future. **The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 2006. 100: 41.

BERMAN, J.D. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Disease**., 2003. 16: 397.

BERN C; MAGUIR JH & ALVAR J. Complexities for assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**. 2008. 2 (10), e313.

BEZERRA MA; LEAL-CARDOSO, JH; COELHO-DE-SOUZA, AN; CRIDDLE DN; FONTELES, MC. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytotherapeutic Research**. 2000. 14 (7):549-51.

BORGES AR; AIRES JRA; HIGINO TMM; MEDEIROS MGF; LOPES CITÓ AMG; LOPES JAD; FIGUEIREDO CBQ. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**. 2012.

BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**. 1996. 51:29–38.

BOTELHO MA, NOGUEIRA NA, BASTOS GM, FONSECA SG, LEMOS TL, MATOS FJ, MONTENEGRO D, HEUKELBACH J, RAO VS, BRITO GA. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal Medicine Biology Research**. 2007; 40(3): 349-56.

BURT SA, VLIELANDER R, HAAGSMAN HP, VELDHUIZEN EJ. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. **Journal Food Protection**. 2005 ;68(5):919-26.

CAVALCANTI SC, NICULAU EDOS S, BLANK AF, CÂMARA CA, ARAÚJO IN, ALVES PB. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**. 2010. 101(2):829-32.

CHANG, K. P. & FONG, D. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. **Ciba Foundation Symposium**., 1983. 99, 113-137.

CHAPPUIS F; SUNDAR S.; HAILU A; GHALIB, H RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J; BOELART, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature**, England, 2007.v.5, p.7-16.

CHOUDHARY MI, BATOOL I, ATIF M, HUSSAIN S, ATTA-UR-RAHMAN. Microbial transformation of (-)-guaiol and antibacterial activity of its transformed products. **Journal Natural Products**. 2007; 70(5):849-52.

CONSOLINI AE; BERARDI A; ROSELLA MA, VOLONTÉ MG. Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetylcholine and calcium. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2011. 21(5): 889-900.

COSTA AF. (1994). **Farmacognosia**. Vol. 1, 5ª Lisboa: Ed. Fundação Caloutre Gulbenkian, 1031p.p.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. 1999. 12: 564.

CRAVEIRO AA, ALENCAR JW, MATOS FJA, ANDRADE CHS, MACHADO MIL. Essential oils from Brazilian Verbenaceae — Genus *Lippia*. **Journal Natural Products** 1981;44:598–601.

CROFT SL, OLLIARO P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**. 2011, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x.

CROFT, S. L. AND COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitology**. 2003. 19: 502-508.

CROFT, S., SUNDAR, S. FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, 2006. Vol. 19, No.1, p. 11.

(Decit- Departameto de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde, 2010).

DELLACASA AD; BAILAC PN; PONZI MI. In vitro activity of Essential Oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*. **Journal Essential Oil Research**. 2003. 15, 282-285.

DEMICHELLI, C., OCHOA, R., DA SILVA, J. B. B., FALCÃO, C. A. B., ROSSI-BERGMANN, B., DE MELO, A. L., SINISTERRA, R. D. FRÉZARD, F. Oral delivery of meglumine antimoniate- β -cyclodextrin complex for treatment leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 2004. 48: 100.

DEN BOER M., D. ARGAW, J. JANNIN AND J. ALVAR. Leishmaniasis impact and treatment access. **Leishmaniasis Control Programme**. 2011. WHO/IDM.

DEN BOER, M. L., ALVAR, J., DAVIDSON, R. N., RITMEIJER, K. AND BALASEGARAM, M. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, 2009. 14(3), 395-410.

DESJEUX, J. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 2004. 27: 305.

DORLO TPC, VAN THIEL PPAM, SCHOONE GJ. Dynamics of parasite clearance in cutaneous leishmaniasis patients treated with miltefosine. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011; 5: e1436.

DUIJSINGS D, HOUWELING M, VAANDRAGER AB, MOL JA, TEERDS KJ. Hexadecylphosphocholine causes rapid cell death in canine mammary tumour cells. **European Journal of Pharmacology**. 2004. 502(3):185-93.

ENGELMANN, J., HENKE, J., WILLKER, W., KUTSCHER, B., NOSSNER, G., ENGEL, J., LEIBFRTZ, D. Early stage monitoring of miltefosine induced apoptosis in KB cells by multinuclear NMR spectroscopy. **Anticancer Research**. 1996. 16, 1429—1439.

ESCOBAR P.; LEAL, SM; HERRERA, LV; MARTINEZ, JR; STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2010.

FAGHIHI, G. KIA, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. **Clinics in Dermatology**. 2003. 28: 13.

FALQUETO, A. & SESSA, P. A. Leishmaniose tegumentar americana. Em Veronesi, R & Focaccia, R., eds, "**Tratado de infectologia**". 1996. São Paulo, Ed. Atheneu, págs. 11221-1233.

FERREIRA C., SOARES D.C., BARRETO-JUNIOR C.B., NASCIMENTO M.T., FREIRE-DE-LIMA L., J.C. DELORENZI, LIMA M.E.F., ATELLA G.C., FOLLY E., CARVALHO T.M.U., SARAIVA E.M. PINTO-DA-SILVA. L.H. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**. 2011. 72(17).

FOLLADOR, I., ARAÚJO, C., BACELLAR, O., ARAÚJO, C. B., CARVALHO, L. P., ALMEIDA, R. P., CARVALHO, E. M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. **Clinical Infect Disease Journal**. 2002. 34(11): E54-8.

GARCIA CC; TALARICO L; ALMEIDA N; COLOMBRES S; DUSCHATZKY C; DAMONTE EB. Virucidal Activity of Essential Oils from Aromatic Plants of San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**. 2003.17, 1073–1075.

IWU, M.M, JACKSON, J.E AND SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis. **Parasitology Today**. 1994. 10:65-68.

JAKOBSEN PH; WANG PH; NWAKA S. Innovative Partnerships for Drug Discovery against Neglected Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2011, 5(9): e1221.

JHINGRAN A, CHAWLA B, SAXENA S, BARRETT MP, MADHUBALA R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 2009. 164(2):111-7.

KERROLA KM; KALLIO HP. Characterization of volatile composition and odor of Angelica (*A. archangelica* Subsp. *archangelica* L.) root extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 1994. 42:1979-1988.

KHALIL, E. A., AYED, N. B., MUSA, A. M., IBRAHIM, M. E., MUKHTAR, M. M., ZIJLSTRA, E. E., ELHASSAN, I. M., SMITH, P. G., KIENY, P. M., GHALIB, H. W., ZICKER, F., MODABBER, F. AND ELHASSAN, A. M. Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, 2005. 140(2): 349-53.

KNOBLOCH, K., PAULI, A., IBERL, B., WEIGAND, H., WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal Essential Oil Research**. 1989. 1, 118–119.

KONSTANTINOV SM, BERGER MR. Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines. **Cancer Lett**. 1999. 1;144(2):153-60.

KVIST LP; CHRISTENSEN SB; RASMUSSEN HB; MEJIA K GONZALEZ A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **Journal Ethnopharmacology**. 2006. 19;106 (3), 390-402.

LACOSTE E, CHAUMONT JP, MANDIN D, PLUMEL MM, MATOS FJ. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, 1996; 54:228–30.311 [8].

LAINSON, R. & SHAW, J. J. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical**, 1983. 77: 569-596.

LEBOUVIER N, HUE T, HNAWIA E, LESAFFRE L, MENUT C, NOUR M. Acaricidal activity of essential oils from five endemic conifers of New Caledonia on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, 2013.

LUQUE-ORTEGA JR, RIVAS L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2007; 51: 1327–32.

LUX H, HEISE N, KLENNER T, HART D, OPPERDOES FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2000; 111(1):1-14.

MACHADO A,B, P. PIRES A,B, A.M. DINIS C, M. SANTOS-ROSA D, V. ALVES D, L. SALGUEIRO, C. CAVALEIRO, M.C. SOUSA. Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**. 2012.

MACHADO, M; DINIS, AM; SALGUEIRO, L; CAVALEIRO, C; CUSTÓDIO, JBA; SOUZA, MC. Anti-giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis subsp. sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. **Parasitology Research**. 2010:1205–15.

MAIA-ELKHOURY AN, ALVES WA, SOUSA-GOMES ML, SENA JM, LUNA EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno Saúde Pública**. 2008. 24(12):2941-7.

MARTÍN-QUINTAL Z; DEL ROSARIO GARCÍA MISS M; MUT-MARTÍN M; MATUS-MOO A; TORRES-TAPIA LW; PERAZA-SÁNCHEZ SR. The leishmanicidal effect of (3S)-16,17-didehydrofalcarninol, anoxylipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of NO production. **Phytotherapy Research**, 2010. 24, 1004–1008.

MATSUO K; HOTOKEZAKA H; OHARA N; FUJIMURA Y; YOSHIMURA A; OKADA Y; HARA Y; YOSIDA N & NAKAYAMA K. Analysis of amphotericin B-induced cell signaling with chemical inhibitors of signaling molecules. **Microbiology and Immunology**, 2006. 50 (4), 337-47.

MEDEIROS MGF; SILVA AC; LOPES CITÓ AMG; BORGES AR; LIMA SG; LOPES JAD; FIGUEIREDO CBQ. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**. 2011.

MESA AC, MONTIEL J, ZAPATA B, DURÁN C, BETANCUR L, STASHENKO E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 2009, 104: 878-884.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2010. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. 10(2): 11-15. www.saude.gov.br/svs.

MINODIER, P., ROBERT, S., RETORNAZ, K., GARNIER, J.M. Liposomal Amphotericin B in treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. **Fundamentos Clinic Pharmacol**, 2003. 17 : 183.

MISHRA D, BISHT G, MAZUMDAR PM, SAH SP. Chemical composition and analgesic activity of Senecio rufinervis essential oil. **Pharmaceutical Biology**, 2010 Nov;48(11):1297-301. 2010 Aug 26.

MISHRA, B.B., SINGH, R.K., SRIVASTAVA, A., TRIPATHI, V.J., TIWARI, V.K. Fighting Against Leishmaniasis: Search of Alkaloids as Future True Potential Anti-Leishmanial Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2009. 9:107.

MISHRA, J., SAXENA, A. AND SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, 2007. 14(10): 1153-69.

MONZOTE, L., GARCÍA, M., MONTALVO, A.M., SCULL, R., MIRANDA, M. Chemistry cytotoxicity and anti leishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 2010.105,168–173.

MONZOTE, L., MONTALVO, A.M., SCULL, R., MIRANDA, M., ABREU, J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. 2007. 61: 148.

MONZOTE, L; GARCÍA, M., MONTALVO, A.M., LINARES, R., SCULL, R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. **Forsch Komplementmed**, 2009.16,334–338.

MORAIS-TEIXEIRA ED, DAMASCENO QS, GALUPPO MK, ROMANHA AJ, RABELLO A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 2011;106 (4):475-8.

MOREIRA W, LEPROHON P, OUELLETTE M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. **Cell Death Diseases**. 2011. 2: e201.

MURRAY, H.W. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2004. 71: 787.

NEUBER H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, 2008. 6 (9), 754-65.

NEWLOVE T, ROBINSON M, MEEHAN SA, POMERANTZ R. Old World cutaneous leishmaniasis. **Dermatology Online Journal**, 2012, 15;18(12):32.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, M.G.; TAGAMI, P.M.; LORSCHIDE, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 2007.v. 28, n.1, p.93-97.

NORSWORTHY, N. B., SUN, J., ELNAIEM, D., LANZARO, G. AND SOONG, L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, 2004. 72: 1240-1247.

OLIVEIRA VCS; MOURA DMS; LOPES JAD; ANDRADE PP; SILVA NH; FIGUEIREDO CBQ. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, 2009, 104:1053–1059.

OLIVEIRA, V.C.S., MOURA, D.M.S., LOPES, J.A.D., DE ANDRADE, P.P., DA SILVA, N.H., FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (CD) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigote. **Parasitology Research**, 2008. 104: 1053.

OULLETTE, M., DRUMMELSMITH, J. PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Update**, 2004. 7: 257.

PAILA YD, SAHA B, CHATTOPADHYAY A. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2010; 399: 429-433.

PEELING RW, NWAKA S. Drugs and diagnostic innovations to improve global health. **Infectious Disease Clinic of North America**, 2011. 25(3):693-705.

PIMENTA, P.F. TURCO, S.J. Mc CONVILLE, M.J. LAWYER, P.G. PERKINS, P.V. SACKS, D.L.. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, 1992, 256: 1812.

QUINTANS JD, SOARES BM, FERRAZ RP, OLIVEIRA AC, DA SILVA TB, MENEZES LR, SAMPAIO MF, PRATA AP, MORAES MO, PESSOA C, ANTONIOLLI AR, COSTA EV, BEZERRA DP. Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia laevigata*. **Planta Medica**, 2013.

RAKOTOMANGA M, BLANC S, GAUDIN K. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2007; 51: 1425–30.

RAKOTOMANGA M, SAINT-PIERRE-CHAZALET M, LOISEAU PM. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug–membrane interactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2005; 49: 2677–86.

RASMUSSEN, B. DESCOTEAUX, A. Contribution of Electron and Confocal Microscopy in the Study of Leishmania-Macrophage Interactions. **Microscopy and Microanalysis**, 2004. 10: 656.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J-C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Disease**, 2007. 7: 581.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C., WADT, P.G.S, WADT, L.H.O. Copaíba: Ecologia e Produção de óleo-resina. **Embrapa Acre. Documentos**, 2004. 91. 28p.

ROBERTS, L.J., HANDMAN, E. FOOTE, S.J. Science, medicine, and the future leishmaniasis. 2001. **British Medicine Journal**, 321: 801.

ROCHA, L.G., ALMEIDA, J.R.G.S., MACÊDO, R.O AND BARBOSA-FILHO J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, 2005. 12: 514–535.

RUITER, G.A., VERHEIJ, M., ZERP, S.F., VAN BLITTERSWIJK, W.J. Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 2001. 49, 415-419.

SACKS, D. L. AND ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunological Reviews**, 2004. 201: 225-238.

SACKS, D. L. AND KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasites-vector e and vector host interection in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, 2001. 55: 453-483.

SAHA, S., MONDAL, S., BANERJEE, A., GHOSE, J., BHOWMICK, S., ALI, N. Immune responses in Kala-azar. **Indian Journal Medicine Research**, 2006. 123: 245.

SANTA-RITA RM, HENRIQUES-PONS A, BARBOSA HS. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, 2004. 54: 704–10.

SANTIN, M.R., DOS SANTOS A.O., NAKAMURA C.V., DIAS FILHO, B.P., FERREIRA I.C., UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of of essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citril) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, 2009. 105: 1489.

SANTOS DO, COUTINHO CE, MADEIRA MF, BOTTINO CG, VIEIRA RT, NASCIMENTO SB, BERNARDINO A, BOURGUIGNON SC, CORTE-REAL S, PINHO RT, RODRIGUES CR, CASTRO HC (2008) Leishmaniasis treatment— a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, 103:1–10.

SANTOS, A. C. SANTIN, M. U. YAMAGUCHI, L. E. R. CORTEZ, T. UEDA-NAKAMURA, B. P. DIAS-FILHO, C. V. NAKAMURA. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of *Achillea millefolium*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. 2010. Vol. 104, No. 6, 475–483.

SANTOS, D.O., COUTINHO, C E.R, MADEIRA, M.F., BOUTINHO, C.G., VIEIRA, R.T., NASCIMENTO, S.B., BERNARDINO, A., BOURGUIGNON, S.C., CORTE-REAL, S., PINHO, R.T., RODRIGUES, C.R. CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, 2008. 13: 1.

SEN R, CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **India Phytomedicine**, review. (2011).

SHARMA, U. AND SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal Experimental Biology**. 2009. 47: 412-423.

SIMÕES CMO; SCHENKEL EP; GOSMAM G; MELLO JCP; MENTZ LA, PETROVICK PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento**.4.ed. Florianópolis: Editora da UFSC; 2002. 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**, cap. 18, Porto Alegre, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

SINDERMAN H, ENGEL J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2006; 100: S17–20.

SINGH, S. AND SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2004. 10: 307-315.

SOARES, D. C., ANDRADE, A. L., DELORENZI, J. C., SILVA, J. R., FREIRE-DE-LIMA, L., FALCÃO, C. A., PINTO, A. C., ROSSI-BERGMANN, B. AND SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology International**, 2010. 59(2): 173-177.

SOARES, D. C., PEREIRA, C. G., MEIRELES, M. A. M. AND SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, 2007. 56: 135-139.

SOCORRO,S.; ROSA MDO,S.; MENDONÇA FILHO,R.R.; BIZZO,H.R.; ALMEIDA RODRIGUES, I.; SOARES,R.M.; SOUTO-PADRÓN,T.; ALVIANO,C.S.; LOPES,A.H. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**, 2003.47; 1895–1901.

SOLER E, DELLACASA E, MOYNA P. Composition of *Aloysia gratissima* leaf essential oil. **Phytochemistry**. 1986, 25: 1343-1345.

TEIXEIRA, E; DAMASCENO, Q; GALUPPO, MK; ROMANHA, AR. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2011. Vol. 106(4): 475-478.

TRACY, J.B.; WEBSTER JUNIOR, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN A.G.; LIMBIRD L.E., eds. *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. McGraw-Hill Companies, 1996. p. 987-1008.

UEDA-NAKAMURA, T., MENDONÇA-FILHO, R. R., MORGADO-DÍAZ, J. A., MAZA, P. K., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A. G., ALVIANO, D. S., ROSA, M. S. S., LOPES, A. H. C. S., ALVIANO, C. S., NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, 2006. 55: 99.

VELASCO-NEGUERUELA A, PÉREZ-ALONSO MJ. Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). **Journal of Essential Oil Research**, 1993. 5:513–24.

VERAS, HN; ARARUNA, MK; COSTA, JG; COUTINHO, HD; KERNTOPF, MR; BOTELHO, MA; MENEZES, IR. Topical Antiinflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action. **Phytotherapy Research**, 2013 27(2):179-85.

WADHONE P., MAITI M., AGARWAL R., KAMAT V., MARTIN S., SAHA B. Miltefosine promotes IFN-gamma- dominated anti-leishmanial immune response. **Journal of Immunology**, 2009. 182: 7146.

VERCESI A.E. & DOCAMPO R. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. **Biochemical Journal**, 1992. 284 (Pt 2):463.

WAGNER H.; ULRICH-MERZENICH G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, 2009. 16, 97–110 (review).

WAIKEDRE J, VITTURO CI, MOLINA A, THEODORO PN, DO ROSÁRIO RODRIGUES SILVA M, ESPINDOLA LS, MACIUK A, FOURNET A. Antifungal Activity of the Essential Oils of *Callitris neocaledonica* and *C. sulcata* Heartwood (Cupressaceae). **Chemistry & Biodiversity**, 2012. 9 (3):644-53.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2002. **TDR strategic direction: Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>.

YABIKU HY & LARA WH. Técnicas cromatográficas para diferenciação de óleos essenciais cítricos de limão siciliano e tahiti. **Revista do Instituto Adolpho Lutz**. 1986. 46:45-51.

