

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Composição química do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi e análise *in vitro* da
atividade leishmanicida

Bianca Augusto de Souza

2024



UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
E ANÁLISE *in vitro* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

BIANCA AUGUSTO DE SOUZA

Sob a orientação do professor

Douglas Siqueira de Almeida Chaves

E co-orientação da professora

Patrícia Fampa Negreiros Lima

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2024

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

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

S719c Souza, Bianca Augusto de, 1995-
Composição química do óleo essencial de Schinus
terebinthifolius Raddi e análise in vitro da
atividade leishmanicida / Bianca Augusto de Souza. -
Seropédica, 2024.
78 f.: il.

Orientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.
Coorientadora: Patrícia Fampa Negreiros Lima.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias - PPGCV, 2024.

1. óleo essencial. 2. leishmaniose visceral. 3.
quimioterapia. 4. aroeira. I. Chaves, Douglas
Siqueira de Almeida, 1981-, orient. II. Lima, Patrícia
Fampa Negreiros , 1976-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias - PPGCV. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 549/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.012145/2024-61

Seropédica-RJ, 07 de março de 2024.

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

BIANCA AUGUSTO DE SOUZA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/03/2024

(Assinado digitalmente em 11/03/2024 14:03)
DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
ICBS (12.28.01.22)
Matrícula: ###050#5

(Assinado digitalmente em 11/03/2024 15:48)
LUCIA HELENA PINTO DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: ###458#0

(Assinado digitalmente em 11/03/2024 17:11)
IVANA CORREA RAMOS LEAL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.797-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **549**, ano: **2024**, tipo: **ATA**, data de emissão: **07/03/2024** e o código de verificação: **a83d45e414**

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosely e Augusto, com todo meu amor e gratidão, por não medirem esforços para me proporcionarem a melhor educação que eu poderia ter e por estarem presentes comigo, em todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir que eu chegasse até aqui, com saúde e determinação, vencendo todas as dificuldades ao longo do caminho.

Aos meus pais, Rosely e José Augusto por sempre terem me proporcionado as condições necessárias para que eu pudesse alcançar meus objetivos, por todo o apoio, incentivo e amor incondicional que me deram durante toda a minha vida e por todos os ensinamentos passados, que me tornaram a pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves, por ter sido um excelente orientador, atencioso e dedicado, que sempre me deu a oportunidade de trabalhar em diversos projetos do laboratório LFBioN.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Patrícia Fampa Negreiros Lima, por ter me aceitado prontamente em sua equipe e me dado a oportunidade de aprender um pouco sobre esse mundo dos parasitos e insetos vetores. Além de toda a atenção e orientação maravilhosa.

À minha amiga e companheira de bancada Dayana Rosa, por todo o ensinamento, dedicação e paciência em me auxiliar e contribuir nos experimentos para construção deste trabalho, sendo essencial na minha jornada. Obrigada por tudo!

Às minhas parceiras de bancada da equipe do Laboratório de Farmacognosia de Bioativos Naturais (LFBioN), Nayana, Neide, Nataly, Adriana e Débora. por toda a ajuda na rotina laboratorial. Além das nossas fofocas e conselhos na hora do café.

Às minhas amigas e parceiras de bancada, Ludmila Pereira e Karina Riguete da equipe do Laboratório de Parasitas e Vetores (LabP&V), por toda ajuda e momentos compartilhados durante a rotina árdua de experimentos, e estendo o agradecimento a todos os membros da equipe, por terem me recebido com tanto carinho.

Agradeço também ao Laboratório de Imunologia e Virologia e às professoras Lúcia Helena da Silva Pinto e Débora Decote Ricardo de Lima, por cederem o espaço de seu laboratório para a realização de experimentos que contribuíram para este trabalho.

Por fim agradeço aos laboratórios LEOM e LABMASS, com a supervisão das professoras Daniela Cosentino, Rosane Nora e técnica Cristiane Cardoso, por terem contribuído também com experimentos que fizeram parte desse trabalho, e ao professor Pedro Damasceno, por ter gentilmente cedido a coleta das aroeiras de sua coleção.

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

RESUMO

SOUZA, Bianca Augusto. **Composição química do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi e análise *in vitro* da atividade leishmanicida**. 2024. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias, classificadas como negligenciadas. São causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e são transmitidas pela picada de fêmeas do vetor flebotomíneo infectado. Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae e que apresentam duas formas evolutivas principais: promastigota, flagelada e extracelular, e amastigota, com flagelo diminuto, intracelular. Clinicamente, a doença se manifesta em 3 formas: visceral, cutânea e mucocutânea, podendo afetar tanto humanos quanto animais. Dentre as espécies relevantes no contexto epidemiológico, a *Leishmania infantum*, causa a forma mais grave da doença, denominada visceral. Os fármacos disponíveis atualmente não conseguem eliminar o parasito completamente e ainda podem gerar diversos efeitos colaterais aos pacientes, além de uma alta toxicidade e elevados custos. Os produtos naturais são fontes alternativas para o tratamento de diversas afecções e em diversos trabalhos, já vem sendo demonstrado atividade biológica leishmanicida em extratos e óleos essenciais de várias espécies vegetais. A espécie medicinal nativa brasileira, *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida, como aroeira-vermelha, foi selecionada para este trabalho por possuir diversas aplicações terapêuticas e propriedades já conhecidas, como anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana. Foram selecionados 4 genótipos da espécie (ARO030-F, ARO071-F, ARO078-F e ARO136-F) do banco de germoplasmas do Instituto Agronomia da UFRRJ. Foi realizada a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e detector de ionização de chama (CG-EM e CG-DIC), onde foram identificados como compostos majoritários para ARO030-F, o α -pineno (24,79%), o limoneno (17,26%) e o δ -2-careno (12,18%). Para ARO071-F, o α -pineno (36,74%), o p-cimeno (36,22%) e o óxido de cariofileno (5,54%). Para ARO078-F, o Sabineno (20,13%), Terpinen-4-ol (20,11%) e γ -terpineno (13,08%) e para ARO136-F, o β -pineno (16,53%), α -terpineol (12,29%) e *trans*-cariofileno (12,03%). Todos os OEs apresentaram atividade leishmanicida, e apresentaram para ARO030-F, ARO071-F, ARO078-F e ARO136-F, respectivamente, os valores de IC₅₀ de 32,46, 20,52, 41,61 e 32,62 μ g/mL sobre formas promastigotas de *L. infantum*. Foi avaliado também a viabilidade celular de macrófagos murinos da linhagem RAW 264,7 na presença dos óleos essenciais, onde todos os OEs apresentaram baixa toxicidade. Os resultados aqui explanados apontam uma possibilidade promissora para o uso do OE da espécie *S. terebinthifolius* como uma alternativa ao tratamento quimioterápico contra o parasito *L. infantum* e consequentemente, contra as leishmanioses viscerais e pós-calazar.

Palavras chave: leishmaniose visceral, quimioterapia, óleos essenciais

ABSTRACT

SOUZA, Bianca Augusto. **Chemical composition of *Schinus terebinthifolius* Raddi essential oil and *in vitro* analysis of leishmanicidal activity**. 2024. 76 p. Thesis (Master of Veterinary Science). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Leishmaniasis constitute a group of parasitic diseases, classified as neglected. They are caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania* and are transmitted by the bite of females of the infected sand fly vector. Protozoa of the genus *Leishmania* are parasites belonging to the Trypanosomatidae family and which have two main evolutionary forms: promastigote, flagellated and extracellular, and amastigote, with a tiny, intracellular flagellum. Clinically, the disease manifests itself in 3 forms: visceral, cutaneous and mucocutaneous, and can affect both humans and animals. Among the relevant species in the epidemiological context, *Leishmania infantum* causes the most severe form of the disease, called visceral. The drugs currently available cannot completely eliminate the parasite and can still generate several side effects for patients, in addition to high toxicity and high costs. Natural products are alternative sources for the treatment of various conditions and in several studies, leishmanicidal biological activity has already been demonstrated in extracts and essential oils from several plant species. The native Brazilian medicinal species, *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularly known as aroeira-vermelha, was selected for this work because it has several therapeutic applications and already known properties, such as anti-inflammatory, healing and antimicrobial. Four genotypes of the species (ARO030-F, ARO071-F, ARO078-F and ARO136-F) were selected from the Agronomia Institute germplasm bank. Gas chromatography coupled to a mass spectrometer and flame ionization detector (GC-MS and GC-FID) was carried out, where the main compounds for ARO030-F were identified: α -pinene (24.79%), limonene (17.26%) and δ -2-carene (12.18%). For ARO071-F, α -pinene (36.74%), p -cymene (36.22%) and caryophyllene oxide (5.54%). For ARO078-F, Sabinene (20.13%), Terpinen-4-ol (20.11%) and γ -terpinene (13.08%) and for ARO136-F, β -pinene (16.53%), α -terpineol (12.29%) and *trans*-caryophyllene (12.03%). All EOs showed leishmanicidal activity, and presented for ARO030-F, ARO071-F, ARO078-F and ARO136-F, respectively, IC₅₀ values of 32.46, 20.52, 41.61 and 32.62 μ g/ mL on promastigote forms of *L. infantum*. The cell viability of murine macrophages of the RAW 264.7 lineage was also evaluated in the presence of essential oils, where all EOs showed low toxicity. The results explained here point to a promising possibility for the use of EO from the species *S. terebinthifolius* as an alternative to chemotherapy treatment against the *L. infantum* parasite and consequently, against visceral and post-kala-azar leishmaniasis.

Keywords: visceral leishmaniasis, chemotherapy, essential oils

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo pobreza-doença. Explica a perpetuação de doenças infecto-parasitárias.....	5
Figura 2. Dados referentes aos investimentos feitos para as leishmanioses, doença de Chagas e doença do sono, entre 2013-2022.....	5
Figura 3. Esquema da classificação taxonômica atual de espécies de <i>Leishmania</i>	7
Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral em humanos.....	9
Figura 5. Lesões cutâneas da leishmaniose dérmica pós-calazar.....	10
Figura 6. Distribuição dos casos de coinfeção <i>Leishmania</i> /HIV no mundo.....	11
Figura 7. Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral no mundo em 2020.....	12
Figura 8. Sinais clínicos da leishmaniose visceral canina.....	13
Figura 9. Morfologia das formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	15
Figura 10. Microscopia das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp.....	15
Figura 11. Inseto vetor (flebotomíneo) das leishmanioses <i>Lutzomyia longipalpis</i>	16
Figura 12. Ciclo de vida de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	17
Figura 13. Ilustração das formas evolutivas do parasito <i>Leishmania</i> sp. no tubo digestório do vetor.....	18
Figura 14. Ciclo biológico da leishmaniose visceral causada por <i>Leishmania infantum</i>	19
Figura 15. Distribuição geográfica da ocorrência natural de <i>Schinus terebinthifolius</i> no Brasil.....	24
Figura 16. Folhas, frutos, árvore e tronco de <i>Schinus terebinthifolius</i>	25
Figura 17. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO030-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).....	31
Figura 18. Estruturas químicas dos componentes majoritários de ARO030-F.....	32
Figura 19. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO071-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).....	33
Figura 20. Estruturas químicas dos componentes majoritários de ARO071-F.....	34
Figura 21. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO078-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).....	35
Figura 22. Estruturas químicas dos componentes majoritários de ARO078-F.....	36
Figura 23. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO136-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).....	37
Figura 24. Estruturas químicas dos componentes majoritários de ARO136-F.....	38
Figura 25. Fotografias do ensaio XTT de formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> para melhor interpretação do método/resultados.....	39
Figura 26. Atividade leishmanicida do óleo essencial de ARO030-F.....	40
Figura 27. Atividade leishmanicida do óleo essencial de ARO071-F.....	41
Figura 28. Atividade leishmanicida do óleo essencial de ARO078-F.....	42
Figura 29. Atividade leishmanicida do óleo essencial de ARO136-F.....	43
Figura 30. Fotografia do ensaio XTT de citotoxicidade com macrófagos.....	43

Figura 31. Análise de toxicidade do óleo essencial de ARO030-F.....	44
Figura 32. Análise de toxicidade do óleo essencial de ARO071-F.....	45
Figura 33. Análise de toxicidade do óleo essencial de ARO078-F.....	46
Figura 34. Análise de toxicidade do óleo essencial de ARO136-F.....	47
Figura 35. Efeito sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) de formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratadas com os óleos essenciais de ARO030-F e ARO071-F, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ após 48h de incubação.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fármacos utilizados na quimioterapia das leishmanioses.....	20
Tabela 2 - Composição química do OE do genótipo ARO030-F.....	31
Tabela 3 – Composição química do OE do genótipo ARO071-F.....	33
Tabela 4 – Composição química do OE do genótipo ARO078-F.....	35
Tabela 5 – Composição química do OE do genótipo ARO136-F.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BOD	<i>Biological Oxygen Demand</i>
CG	Cromatografia gasosa
DIC	Detector de ionização em chama
DIP	Doenças infecciosas e parasitárias
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Doenças Negligenciadas
DNDi	Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
EM	Espectrômetro de massas
FCCP	Fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-iodeto de tetrametilbenzimidazolilcarbocianina
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MP	Matriz peritrófica
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Hidrogênio de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMS	N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate
PSG	<i>Promastigote Secretory Gel</i>
RPM	Rotações por minuto
<i>S. terebinthifolius</i>	<i>Schinus terebinthifolius</i>
SFB	Soro fetal bovino
XTT	2,3-Bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxinilide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Doenças negligenciadas.....	4
2.2. Leishmanioses.....	6
2.3. Leishmaniose visceral.....	7
2.4. Leishmaniose Visceral Canina.....	12
2.5. <i>Leishmania</i> : parasito, vetor e ciclo biológico.....	14
2.6. Tratamentos.....	20
2.7. Alternativas terapêuticas e de controle.....	21
2.8. Óleos essenciais e seu potencial efeito como agentes antiprotozoários.....	22
2.9. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Geral.....	26
3.2. Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Seleção das espécies.....	27
4.2. Material vegetal.....	27
4.3. Obtenção dos óleos essenciais.....	27
4.4. Caracterização química dos óleos essenciais por CG-DIC e CG-EM.....	27
4.5. Parasitos.....	28
4.6. Macrófagos.....	28
4.7. Atividade anti-promastigota.....	28
4.8. Leitura da atividade anti-promastigota pelo método XTT.....	29
4.9. Citotoxicidade dos óleos essenciais.....	29
4.10. Leitura da citotoxicidade pelo método XTT.....	29
4.11. Efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	30
4.12. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Caracterização química dos óleos essenciais.....	39
5.2. Atividade anti-promastigota e quantificação pelo método XTT.....	40
5.2.1. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO030-F sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	40
5.2.2. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO071-F sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	40
5.2.3. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO078-F sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	41
5.2.4. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO136-F sobre formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	42
5.3. Citotoxicidade dos óleos essenciais pelo método XTT.....	43
5.3.1. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO030-F.....	44
5.3.2. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO071-F.....	44
5.3.3. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO078-F.....	45
5.3.4. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO136-F.....	46
5.4. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial de membrana mitocondrial.....	47
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	54
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças transmitidas por vetores ainda se destacam entre as enfermidades que mais causam óbitos nas populações mais pobres, presentes em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, representando mais de 17% de todas as doenças infecciosas e causando mais de 700.000 mortes anuais, configurando assim um grave problema de saúde pública (WHO, 2020). Entre essas enfermidades estão as doenças negligenciadas ou doenças tropicais negligenciadas, classificadas assim, por afetarem países mais pobres e contarem com menos investimentos da indústria farmacêutica. As doenças tropicais negligenciadas atingem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, ameaçando a saúde dessas populações. Estas doenças estão geralmente relacionadas a grupos economicamente menos favorecidos, por conta da pobreza e más condições de vida, como a falta de saneamento básico, condições de moradia e a falta de informações, tornando as comunidades pertencentes a estes grupos mais expostas e com maior risco de contrair e transmitir alguma dessas afecções (WHO, 2010). As leishmanioses estão inseridas nesse grupo, sendo um conjunto de doenças causadas por protozoários flagelados de gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de fêmeas do inseto vetor flebotomíneo (Família: Psychodidae) infectadas.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos pertencentes à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida) que abrange organismos unicelulares flagelados. Seu ciclo de vida apresenta duas formas evolutivas principais, sendo uma flagelada e extracelular, denominada promastigota, que se encontra exclusivamente no trato digestório do seu inseto vetor e a outra sem flagelo aparente, ou, com flagelo diminuto, intracelular, denominada amastigota, encontrada no interior dos macrófagos de mamíferos, seu hospedeiro vertebrado (Pimenta; Freitas; Secundino, 2012). O parasita é transmitido pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* nas Américas (Novo Mundo) e do gênero *Phlebotomus* em outros continentes, como a África, Ásia e Europa (Velho Mundo) (Bruschi; Gradoni, 2018).

A leishmaniose pode se manifestar clinicamente, em 3 formas principais (visceral, cutânea e mucocutânea), que variam de acordo com a espécie do parasito, onde mais de 20 espécies, apresentam potencial infeccioso ao homem (Cattand *et al.*, 2021; WHO, 2023). As leishmanioses no Brasil são recorrentes, apresentando uma elevada incidência e aparecendo nas listas de países com maiores números de casos, podendo ser encontrado em 6º lugar na lista de países com maior incidência de casos de leishmaniose visceral (Alvar *et al.*, 2012).

Das mais de 20 espécies de *Leishmania* descritas, ao menos 13 espécies são capazes de infectar cães e 6 são potencialmente infecciosas para gatos. Dentre estas espécies um agente etiológico importante é a *Leishmania (Leishmania) infantum*, causadora da forma mais grave da doença, a forma visceral, causando uma enfermidade severa em regiões da Europa, Ásia, África e Américas (Baneth; Solano-Gallego, 2022).

No Brasil o tratamento para a doença está disponível no SUS, segundo o Ministério da Saúde (MS), porém os medicamentos oferecidos atualmente para tratar a doença não conseguem eliminar o parasito por completo em humanos e animais, além de gerar diversos efeitos colaterais aos pacientes. O MS disponibiliza um manual de recomendações clínicas para o tratamento da leishmaniose, onde encontram-se listados os fármacos de escolha, sendo eles a anfotericina B lipossomal, miltefosina e antimoniais pentavalentes (Lira-Pimenta *et al.*, 2023). Vale ressaltar também que no Brasil, os cães são os principais reservatórios, desempenhando um grande papel na epidemiologia da doença, demonstrando o desafio no tratamento desses animais para os médicos veterinários, devido à complexidade do parasita e à diversidade da doença. Atualmente para a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) está disponível também a Miltefosina, como fármaco de escolha no tratamento da doença (Mergen; Souza, 2023).

Alguns avanços foram realizados para a melhoria na quimioterapia da leishmaniose, como a reformulação de fármacos antigos, o encapsulamento da anfotericina B e a introdução de novos protocolos de tratamentos. Nenhum novo fármaco foi introduzido para o tratamento destas afecções nos últimos anos, com exceção a Miltefosina, um análogo de lipofosfolípídio, utilizado no tratamento da leishmaniose visceral na Índia (Dorlo *et al.*, 2012; Fampa *et al.*, 2021; Santiago; Pita; Guimarães, 2021). Além de toda a problemática relacionada aos poucos medicamentos utilizados para o tratamento das leishmanioses, há a questão de que a quimioterapia gera diversos efeitos colaterais e reações desfavoráveis, como, toxicidade, baixa eficácia, custos elevados e tratamentos muito longos, levando até ao abandono pelos pacientes. Sendo assim, novas formas terapêuticas devem ser desenvolvidas visando à redução destes problemas (Severino *et al.*, 2022).

Os produtos naturais são fontes alternativas para o tratamento de diversas afecções. Nesse contexto o estudo da diversidade de substâncias presentes em espécies vegetais está em ascensão atualmente, onde, segundo a OMS, sua investigação farmacológica, vem sendo considerada como uma prioridade nas áreas de pesquisa (WHO, 2011). Em diversos trabalhos, já vem sendo demonstrada atividade biológica leishmanicida em extratos de várias espécies

vegetais, associadas à presença de substâncias químicas como flavonoides, alcaloides, taninos, esteroides, chalconas e naftoquinonas (Klein *et al.*, 2009; Oliveira; Gilbert; Villas-Bôas, 2013).

Os óleos essenciais surgem como alternativa ao tratamento de diversas doenças, por possuírem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiparasitárias e antipruriginosas, já descritas. São constituídos por substâncias voláteis, de baixo peso molecular, derivadas do metabolismo secundário (especial) de plantas, como os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, que trazem menos impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana e animal (Rodrigues *et al.*, 2017; Cavalcante *et al.*, 2021).

A família Anacardiaceae, dentre muitas outras existentes, é amplamente representada por diversas espécies de importância econômica, produtoras de óleos essenciais e vários estudos já foram realizados a partir de espécies dessa família e, em alguns, se pode verificar atividade antimicrobiana e inseticida (Correia *et al.*, 2006). Dentro dessa família pode-se destacar a espécie medicinal nativa brasileira, *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida, como aroeira-vermelha ou aroeira-pimenteira, que possui diversas aplicações terapêuticas e propriedades já conhecidas, como anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana (Azevedo *et al.*, 2015). Estudos recentes comprovaram as atividades, antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória e também atividades antitumoral e inseticida, presentes nesta espécie (Medeiros *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2013; Khan, 2013; Queires *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013).

Portanto, levando em consideração toda a problemática citada referente ao tratamento das leishmanioses, a busca por alternativas a quimioterapia existente, torna-se cada vez mais imprescindível, visando um tratamento mais natural, menos tóxico, de menor custo e com maior eficácia, inclusive contra as cepas mais resistentes aos fármacos em uso, com reduzidos ou ausentes efeitos colaterais. O trabalho objetivou caracterizar quimicamente os óleos essenciais extraídos de 4 genótipos ARO030-F; ARO071-F; ARO078-F e ARO136-F pertencentes à coleção de germoplasmas do Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade/Instituto de Agronomia, UFRRJ da espécie *S. terebinthifolius*, avaliar o seu potencial leishmanicida sobre a cepa MAP263 de *L. infantum* e sua toxicidade em células do hospedeiro vertebrado, utilizando a linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7, podendo representar uma ferramenta no combate dessa doença negligenciada e de grande impacto mundial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças negligenciadas

Segundo o Ministério da Saúde (MS), as doenças tropicais negligenciadas (DTN) ocorrem em 149 países de regiões localizadas entre a latitude 35°N e 35°S, com altitudes abaixo de 2.200 metros e temperaturas que variam entre 15°C a 40°C. As mesmas acometem populações de baixa renda, afetando mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo. Suas medidas de controle, prevenção e tratamento representam gastos de bilhões de dólares anuais (SVS, 2021).

A classificação de doença negligenciada foi proposta pela OMS, por não despertarem o interesse das empresas farmacêuticas em desenvolver terapias medicamentosas voltadas a essas enfermidades, por conta de baixos investimentos e recursos destinados a essas doenças (SVS, 2021). As doenças negligenciadas consistem então em um conjunto de doenças que são causadas por agentes infectoparasitários, que podem gerar danos físicos, cognitivos e socioeconômicos nas populações afetadas, que são geralmente grupos ou comunidades de baixa renda (Mathers *et al.*, 2012).

No Brasil, em 2006, as doenças negligenciadas foram definidas como sendo aquelas que não só prevalecem em condições de pobreza, mas que também corroboram para o aumento e a manutenção do cenário de desigualdade. O termo doenças negligenciadas, foi originalmente proposto em 1970, com a criação do programa *The Great Neglected Diseases*, pela Fundação Rockefeller, que surgiu da Organização Médicos Sem Fronteiras e propôs um documento em que as doenças seriam divididas em globais, negligenciadas, e mais negligenciadas. Desde então, este termo vem sendo utilizado para tratar dos conjuntos de enfermidades causadas por agentes infectoparasitários que são endêmicos em populações de baixa renda, mais comumente encontradas em localidades da Ásia, África e Américas (Souza, 2010; Oliveira, 2018).

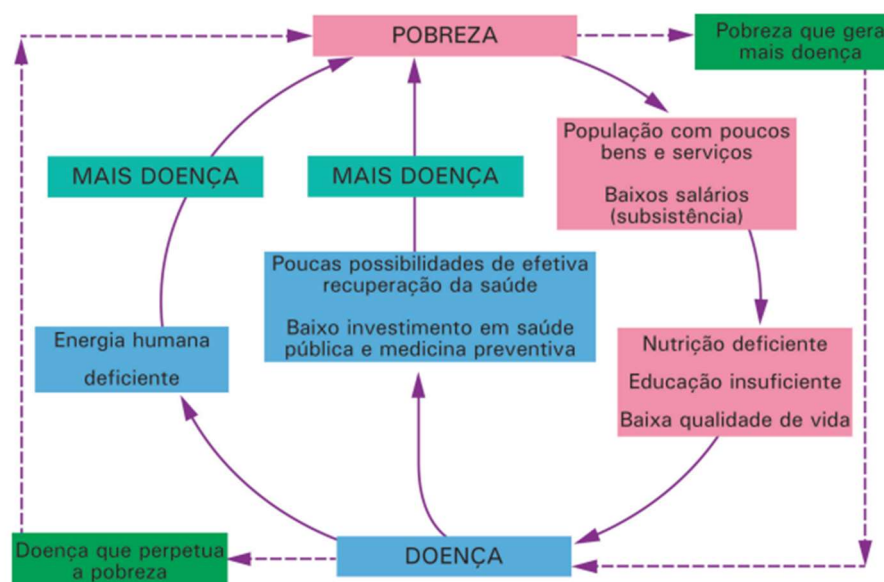


Figura 1. Ciclo pobreza-doença. Explica a perpetuação de doenças infecto-parasitárias. Fonte: https://midia.atp.usp.br/plc/ju0004/impressos/ju0004_01.pdf.

Portanto, as doenças negligenciadas se encontram no grupo de doenças infectoparasitárias (DIP's), que englobam patologias relacionadas às condições socioambientais em que a população está inserida, como, condições precárias de moradia, alimentação e higiene, e, sobretudo a disseminação destas DIP's está relacionada à pobreza e qualidade de vida, onde a perpetuação dessas condições citadas (Figura 1) se tornam fatores determinantes para o aumento da disseminação desses agentes infecciosos e consequentemente no maior número de casos destas enfermidades (IOC, 2019).

O grupo independente *Policy Cures*, é responsável pelo relatório anual, desde 2008, G-FINDER, que traz informações e dados estatísticos sobre as doenças negligenciadas no mundo. Esse grupo tem o objetivo de gerar informações e fornecer ideias e análises inovadoras concisas que acelerem o desenvolvimento e incorporação de novas formas de tratamento e prevenção das doenças negligenciadas, como o desenvolvimento de novos fármacos, vacinas e métodos de diagnóstico.

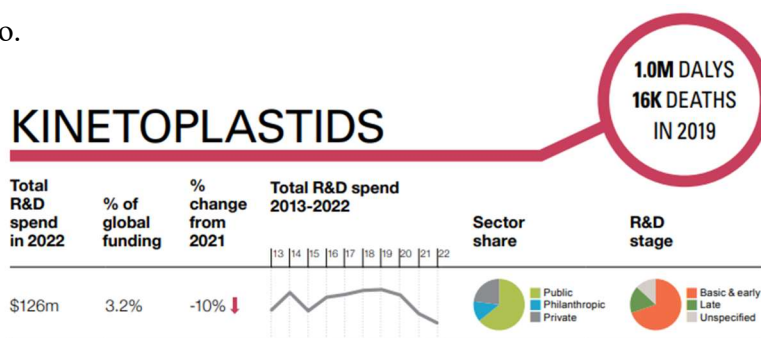


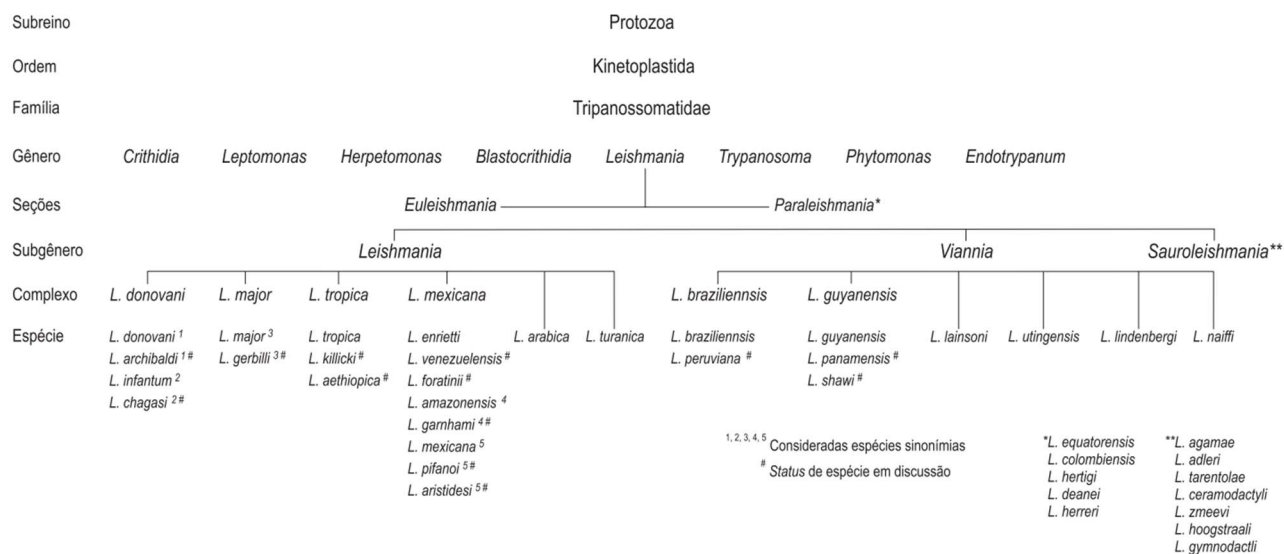
Figura 2. Dados referentes aos investimentos feitos para as leishmanioses, doença de Chagas e doença do sono, entre 2013-2022. Adaptado de: *Policy Cures Research - GFINDER*, 2023.

O relatório G-FINDER agrupa as leishmanioses no grupo “*Kinetoplastid diseases*” juntamente com a Doença de Chagas e a Doença do Sono (tripanossomíase africana). Em 2019 este grupo, em que as leishmanioses estão inseridas, gerou aproximadamente 1,0 milhão de DALY’s (*disability-adjusted life year* – anos de vida ajustados por incapacidade) e 16 mil mortes nos países em desenvolvimento (Figura 2). Em 2022, o financiamento para as doenças do grupo caiu pelo terceiro ano consecutivo, tendo uma baixa de investimento recorde no valor de US\$ 126 milhões, com cada uma das enfermidades do grupo tendo uma baixa recorde individualmente, onde as leishmanioses foram as mais afetadas, foram menos US\$ 8,1 milhões (-18%) investidos no desenvolvimento de melhorias no tratamento e prevenção da doença (G-FINDER, 2023).

2.2. Leishmanioses

As leishmanioses consistem em um grupo de doenças parasitárias causadas por mais de 20 espécies dos protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, classe Trypanosomatida e família Trypanosomatidae. Sua transmissão ocorre pela picada de fêmeas do inseto vetor flebotomíneo infectado (WHO, 2023) e suas manifestações clínicas podem ocorrer de três formas distintas, de acordo com a espécie causadora da infecção (Corman; McNamara; Bakowski, 2023).

O gênero *Leishmania* pode ser dividido em dois subgêneros, que são o subgênero *Viannia* e o *Leishmania*, baseados nas diferenças de desenvolvimento dos parasitos no interior dos insetos, onde no subgênero *Viannia* os parasitos se desenvolvem no intestino posterior de seu inseto vetor, enquanto que no subgênero *Leishmania*, os parasitos irão se desenvolver no intestino anterior do inseto vetor (Lainson, 2010). Dentro desses subgêneros as espécies listadas abaixo (Figura 3) podem ser destacadas:



Números sobrescritos identificam as espécies em que há discussão quanto à validade taxonômica (possíveis sinónimas).

**Espécie questionada quanto à sua validade taxonômica dentro do gênero.

Figura 3. Esquema da classificação taxonômica atual de espécies de *Leishmania*. Adaptado de: Cupolillo; Boité; Porrozzi, 2014.

As leishmanioses, como dito anteriormente, podem se manifestar clinicamente, dependendo da espécie do parasito presente no vetor infectado, em três formas, sendo elas, a cutânea, mucocutânea e visceral, onde em todas as formas, as células-alvo, ou seja, as células preferenciais de infecção pelo parasito são os macrófagos (Murray *et al.*, 2005).

No Brasil, as manifestações clínicas da doença geralmente são causadas pelas espécies *L. (V). braziliensis*, *L. (L). mexicana*, *L. (L). amazonensis*, que causam as formas cutânea e mucocutânea e também a espécie *L. (L). infantum*, que causa a forma mais grave, onde o parasito apresenta um tropismo maior pelas vísceras, sendo preferencialmente encontrado em macrófagos do baço, fígado, medula óssea e órgãos linfóides (Costa *et al.*, 2005).

2.3. Leishmaniose visceral

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) a leishmaniose visceral (LV) ocorre em áreas tropicais e subtropicais, é uma doença sistêmica que afeta em maior número faixas etárias mais vulneráveis, como crianças menores de 5 anos de idade, adultos/idosos maiores de 50 anos e também pessoas com algum tipo de comorbidade ou doenças que suprimem a imunidade. Caso não seja tratada com antecedência, pode evoluir rapidamente para óbito em mais de 90% dos casos. Estima-se que aproximadamente 500 mil novos casos ocorrem anualmente, onde 90% dos mesmos ocorrem na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal, Etiópia e Brasil. Muitos fatores contribuem para a disseminação e modificação das características

epidemiológicas dessa enfermidade, como o fluxo migratório de hospedeiros infectados, desmatamento e alterações no ecossistema provocadas pelo homem. A susceptibilidade do hospedeiro também é outro fator contribuinte. Pacientes imunossuprimidos ou desnutridos aumentam consideravelmente suas chances de infecção ou coinfecção com a LV (Aguilar; Rodrigues, 2017).

Segundo Pessoa (1982), Cunningham, em 1885, foi o primeiro a observar o parasita, em um caso suspeito de leishmaniose visceral, na Índia. Entretanto os primeiros achados à possível existência da LV na América do Sul, foram de Carlos Chagas, que entre 1911 e 1912, por sua passagem ao vale do Rio Amazonas, começou a suspeitar da ocorrência da doença nessa região, por ter encontrado diversos pacientes com esplenomegalia sem uma causa procedente. No ano seguinte foi identificado, durante a autópsia de um indivíduo, pertencente ao estado de Mato Grosso do Sul, a presença do parasito. Alguns anos depois, em 1926, a LV também foi identificada por Mazza, na Argentina, que notificou os primeiros casos da doença em humanos na província de Salta. Somente em 1934 a doença foi confirmada como autóctone, e de grande ocorrência nas Américas, por Penna, que após muitas pesquisas, conseguiu demonstrar do ponto de vista epidêmico, que a doença, considerada antes inexistente, já se manifestava no continente Americano. No ano de 1936, Evandro Chagas conseguiu realizar por meio de uma punção esplênica, o primeiro diagnóstico *in vivo* da LV, classificando a *L. chagasi*, como uma nova espécie do gênero *Leishmania* (Chagas *et al.*, 1937; Cunha; Chagas, 1937).

Posteriormente, a doença foi descrita também no México, Argentina, Honduras, Colômbia, Venezuela e Paraguai (Alvar *et al.*, 2012). Muitos fatores podem ter contribuído para a disseminação da doença no Brasil, como a movimentação de animais, como cães, que eram de áreas endêmicas para áreas não endêmicas e também, modificações ambientais, como a urbanização de áreas rurais, favorecendo mudanças na ecologia do vetor flebotômico, ou seja, a introdução desses animais em áreas não endêmicas, mas que já possuíam a presença dos vetores, resultou em novos focos potenciais de distribuição da doença (Dantas-Torres, 2009).

Segundo o MS, os sintomas da Leishmaniose Visceral Humana (LVH) podem incluir febre de longa duração, inchaço do abdômen devido ao aumento do fígado e baço, perda de peso, fraqueza, redução da força muscular e anemia. Alguns desses sintomas podem ser observados abaixo (Figuras 4A e 4B):

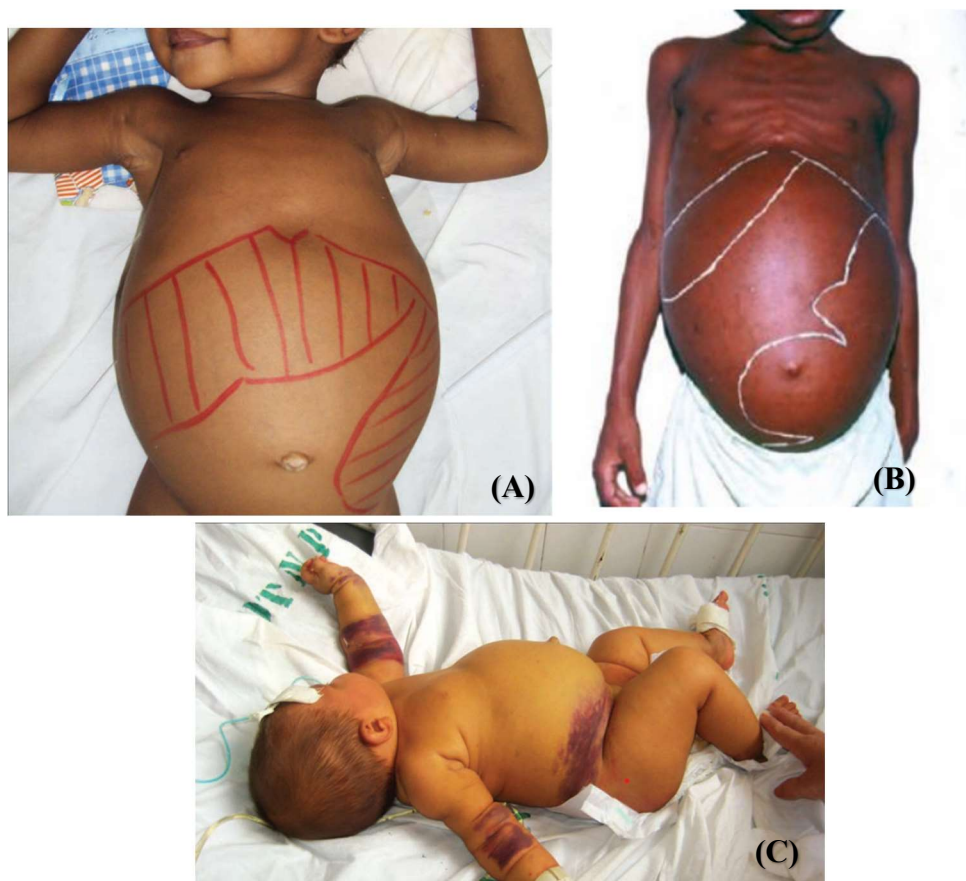


Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral em humanos: **A-** Inchaço do abdômen (hepatoesplenomegalia) em paciente criança; **B-** Inchaço do abdômen e perda de peso em paciente adulto; **C-** Inchaço do abdômen e manchas escurecidas na pele. Adaptado de: Costa, D.; Costa, C. 2014. Leishmanioses do continente americano.

A LV, também chamada de calazar, possui uma ampla distribuição mundial e é classificada primeiramente como uma zoonose, por serem doenças que são transmitidas entre animais e seres humanos. É caracterizada por sintomas clínicos como febre irregular que perdura por um longo tempo, perda de peso, palidez das mucosas cutâneas, gerando manchas escurecidas na pele (Figura 4C), hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia, sendo fatal se não tratada em 95% dos casos (Aguiar; Rodrigues, 2017). O principal reservatório da doença nas Américas é o cão (*Canis familiaris*) e no ambiente silvestre a raposa-do-mato e cachorro-do-mato (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyn thous*) e os marsupiais, como o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) (Costa, D.; Costa, C. 2014).

Na LV pode ocorrer também a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), que é geralmente uma sequela da enfermidade que causa uma erupção cutânea, papulosa, macular ou nodular, frequentemente da face, braços e tronco (Figuras: 5A, 5B e 5C). Encontra-se em maior número de casos da África Oriental e no subcontinente indiano, onde aproximadamente 10% dos

pacientes com LV são notificados por terem desenvolvido a PKDL. Pessoas com essa condição podem ser possíveis fontes de infecção por *Leishmania*, a PKDL pode ocorrer de 6 meses a 1 ano após a aparentemente cura da LV, porém em alguns casos também pode ocorrer mais cedo. As lesões da PKDL possuem o mesmo parasito que causa a LV e por isso pode contribuir para a transmissão da doença para outras pessoas. Um estudo publicado pela Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) América Latina em 2019, confirmou que a PKDL nodular e macular podem ser capazes de infectar o vetor e esse vetor transmitir a doença para outras pessoas (DNDi, 2019; WHO, 2023).

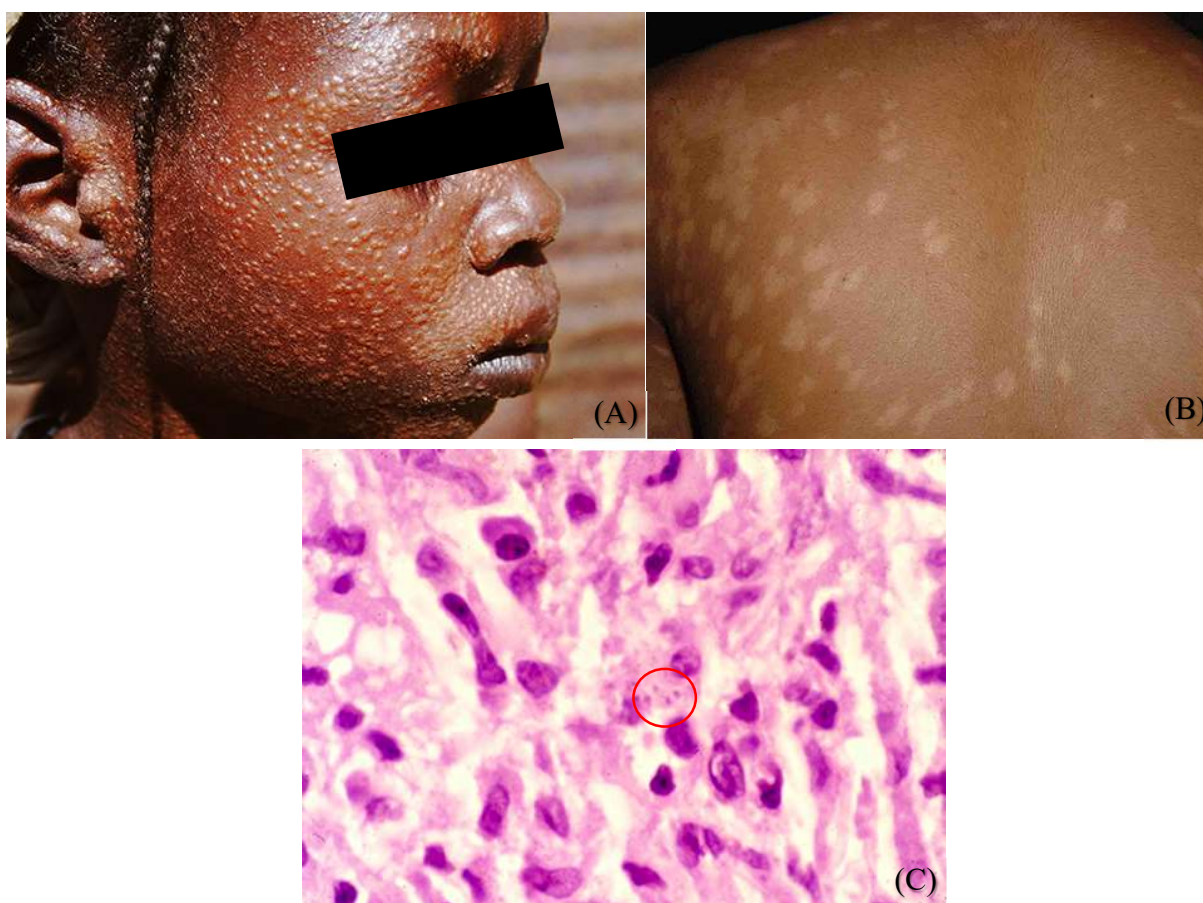


Figura 5. Lesões cutâneas da leishmaniose dérmica pós-calazar: **A-** Lesões nodulares; **B-** Erupções maculares; **C-** Biópsia de pele de lesão de PKDL, em que os parasitos podem ser observados. Adaptado de: Zijlstra, 2019. Frontiers.

Segundo a OMS em 2020-2022, a coinfeção *Leishmania*-HIV foi relatada em 45 países, dentre estes, Brasil, Etiópia e Índia apresentaram altas taxas (Figura 6). Pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que contraem a leishmaniose, aumentam a chance de progressão da doença, por ambas afetarem células do sistema imune, contribuindo assim para acelerar o quadro de imunossupressão, aumentar a viremia e

parasitemia, e consequentemente, ter altas taxas de recaída e mortalidade (Gradoni; López-Véllez; Mokni, 2017; WHO, 2022).

Global distribution of leishmaniasis and countries reporting HIV/*Leishmania* coinfection

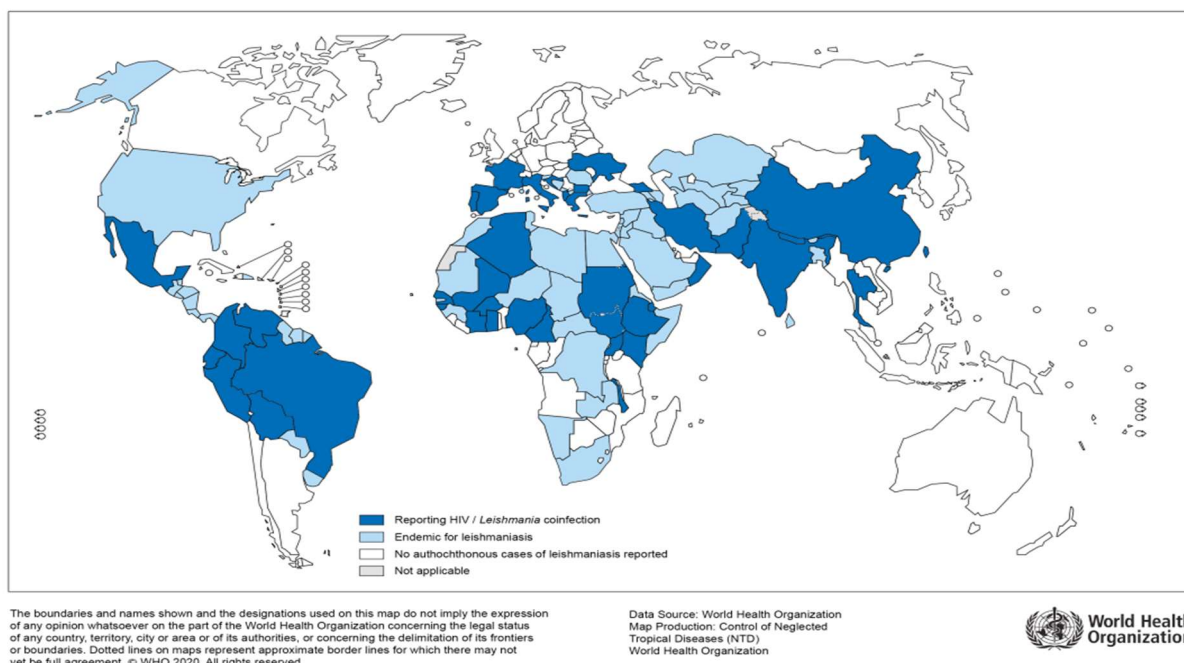
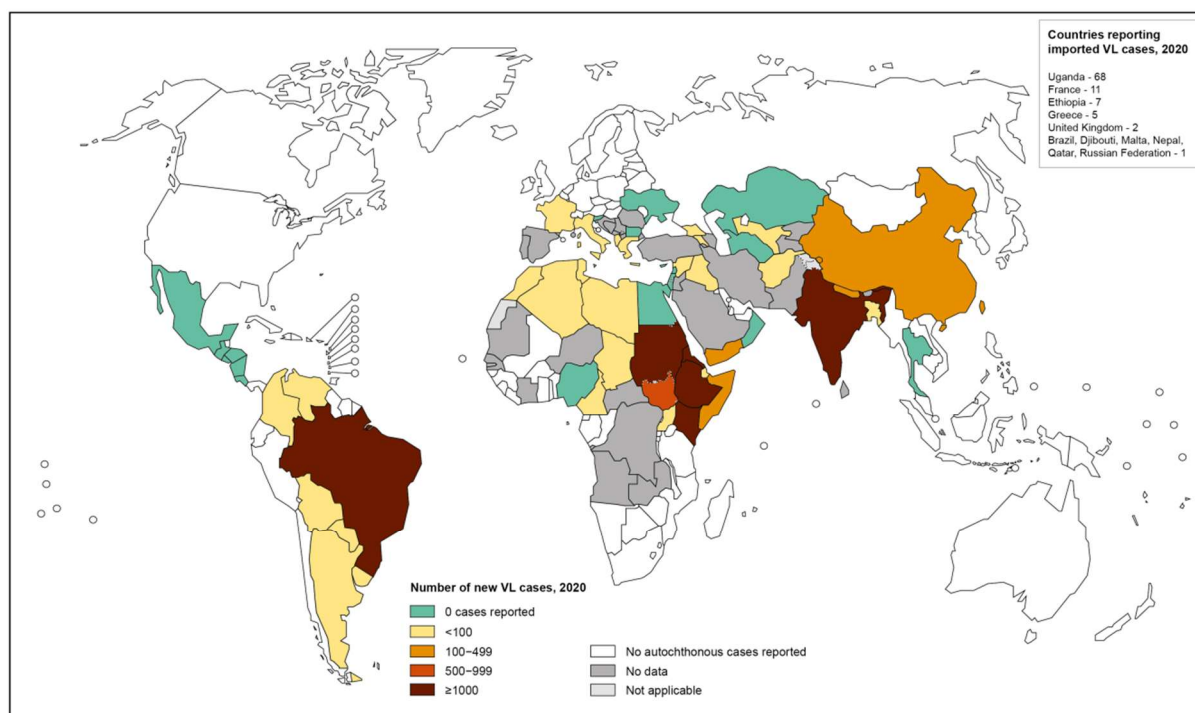


Figura 6. Distribuição dos casos de coinfecção *Leishmania*/HIV no mundo. *Control of Neglected Tropical Diseases*. WHO, 2020.

O cenário das leishmanioses viscerais no Brasil ainda é complexo, por ser uma enfermidade de alta endemicidade, devido a muitas regiões do país serem áreas que possuem condições extremamente favoráveis para disseminação da mesma, sem contar nas dificuldades existentes em relação ao seu controle. Além de ser uma doença negligenciada, por ocorrer em ambientes socioeconômicos desfavoráveis, existe o risco do estabelecimento da doença em novas áreas, por conta de processos de urbanização acelerados. Portanto a necessidade de uma maior atenção por agentes da saúde pública e também por médicos veterinários, na identificação de novos casos é muito importante para manter constante a vigilância em saúde, e, é imprescindível a implementação de mais informações em áreas endêmicas, como medidas de educação em saúde (Marcondes; Rossi, 2013).

Ao analisar o mapa de distribuição dos casos de leishmaniose visceral no mundo (Figura 7) é possível observar sua predominância, ainda hoje, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2020



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2021. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 7. Distribuição dos casos de Leishmaniose Visceral no mundo em 2020. *Control of Neglected Tropical Diseases*. WHO, 2021.

Na região das Américas, o Brasil atingiu aproximadamente 97% dos casos da LV no ano de 2019, confirmando o desafio e a necessidade de ações de controle e prevenção por parte das agências de vigilância no país. Vale destacar também, que o território brasileiro, no período de 2007 a 2017, teve uma taxa de incidência da doença que variou entre 1,7 e 2,0 casos a cada 100 mil habitantes e apresentou um aumento na taxa de letalidade, que subiu de 5,9% para 8,8%. Ainda dentro desse período, os anos de 2015 e 2016, se destacaram por registrarem altas taxas de letalidade, alcançando 9% do total de óbitos na década (Fernandes *et al.*, 2021).

2.4. Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença zoonótica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, das espécies *L. infantum*, *L. donovani* e no Brasil, em maior ocorrência por *L. chagasi* (Camargo; Barcinski, 2003). Geralmente a infecção em cães é clinicamente semelhante à humana, acometendo as vísceras, porém os animais sintomáticos também apresentam frequentemente as lesões de pele características (Krauspenhar *et al.*, 2007). A

infecção pode se manifestar em 3 formas clínicas no animal: assintomática, oligossintomática e sintomática. Na forma assintomática, o cão não apresenta sinais clínicos que evidenciam a infecção, porém o parasito pode ser encontrado em exames sorológicos. Na oligossintomática, o animal pode apresentar até dois sinais clínicos, que são inespecíficos, como aumento no tamanho dos linfonodos e discreta perda de peso. Já na forma sintomática diversas alterações clínicas podem ser apresentadas, como linfadenopatia, polidipsia, poliúria, êmese, poliartrite, neuralgia, febre, esplenomegalia, eczema de orelha e focinho, onicogribose, anemia e perda de peso exacerbada, como sendo as principais (Figura 8) (Tylley *et al.*, 2008).



Figura 8. Lesões cutâneas da leishmaniose visceral canina. **A:** Onicogribose; **B:** Dermatite nodular; **C:** Dermatite esfoliativa; **D:** Dermatite ulcerativa; **E:** Alopecia. Adaptado de: Freitas *et al.*, 2022. PubVet.

A infecção começa no local da picada do inseto vetor, que geralmente ocorre em extremidades do animal, como nariz e orelhas, provocando uma resposta inflamatória local. As lesões podem apresentar tamanhos distintos, variando de 1 a 3 centímetros de diâmetro, podem ser alopecias, ulceradas, possuir crostas e serem pouco dolorosas. Nos cães o período de incubação pode variar de 3 meses até 7 anos, que leva a diferentes tipos de apresentações clínicas, que são a aguda, subaguda, crônica e regressiva. As manifestações clínicas mais observadas tendem a ser a dificuldade locomotora, perda de peso, polidipsia, apatia, anorexia, vômito, diarreia, melena, polifagia, coriza e epistaxe. Em exames físicos, pode-se observar a

linfadenomegalia, onicogribose, caquexia, hipertermia, esplenomegalia, uveíte e conjuntivite (Salzo, 2008; Jericó *et al.*, 2015). A onicogribose é uma das características mais marcantes da LVC sendo considerada como um sinal claro da presença da doença (Jericó *et al.*, 2015).

O diagnóstico da LVC pode ser um pouco difícil, pela decorrência de animais assintomáticos e da variedade de sinais clínicos que os mesmos podem apresentar, que muitas das vezes, acabam sendo confundidos com outras enfermidades, não existindo um método de diagnóstico que possa oferecer 100% de sensibilidade e especificidade, sendo assim, o médico veterinário precisa realizar algumas pesquisas, com base nos seguintes critérios: epidemiológico, clínico e laboratorial, que englobam a faixa etária, região de origem, presença do vetor e de outros animais infectados, pesquisa de sinais que sugerem a enfermidade como o inchaço do abdômen e a onicogribose, e, também achados sugestivos no hemograma dos animais (Jericó *et al.*, 2015).

O padrão-ouro de diagnóstico para a LVC é o método parasitológico, que consiste na visualização pela microscopia direta de formas amastigotas do parasito em lâminas coradas, confeccionadas pela punção aspirativa de órgãos-alvo, como o baço, fígado e medula óssea. Os parasitos também podem ser encontrados ocasionalmente em esfregaços sanguíneos ou em raspados de pele de crostas de lesões cutâneas (Assis *et al.*, 2010).

A LVC possui grande importância na saúde pública e requer uma grande mudança de paradigma no Brasil. Investir em pesquisas que visam a otimização do diagnóstico, controle e prevenção da doença são imprescindíveis. É necessária a realização de mais estudos epidemiológicos buscando a elaboração de planos mais eficazes para o seu controle, pois havendo um tratamento mais acessível e efetivo, os órgãos responsáveis de saúde possuem uma maior chance de adesão da sociedade e apoio das organizações civis. As políticas públicas de saúde precisam considerar que quanto maior o número de animais infectados, principalmente os cães, sem o tratamento adequado, a zoonose continuará sendo um problema para a população (Júnior, *et al.*, 2021; Freitas *et al.*, 2022).

2.5. *Leishmania*: parasito, vetor e ciclo biológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários flagelados heteróxeos, ou seja, eles necessitam de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado para completar o seu ciclo de vida. O hospedeiro invertebrado é denominado como intermediário e o vertebrado, como o

definitivo. As formas promastigotas são as formas extracelulares encontradas nos vetores, hospedeiros intermediários, que possuem um formato alongado, com aspecto fusiforme, com um flagelo livre, podendo medir de 16 x 1,5 µm a 40 x 3 µm. Já as formas amastigotas são as formas intracelulares e infectivas, encontradas nas células fagocíticas dos hospedeiros definitivos, sendo arredondadas, medindo entre 1,5 x 3 µm e 3 x 5,5 µm. Possui cinetoplasto em forma de bastão, próximo ao núcleo e um flagelo interno rudimentar, inserido na bolsa flagelar (Figura 9) (Vannier-Santos, 2002; Taylor *et al.*, 2017).

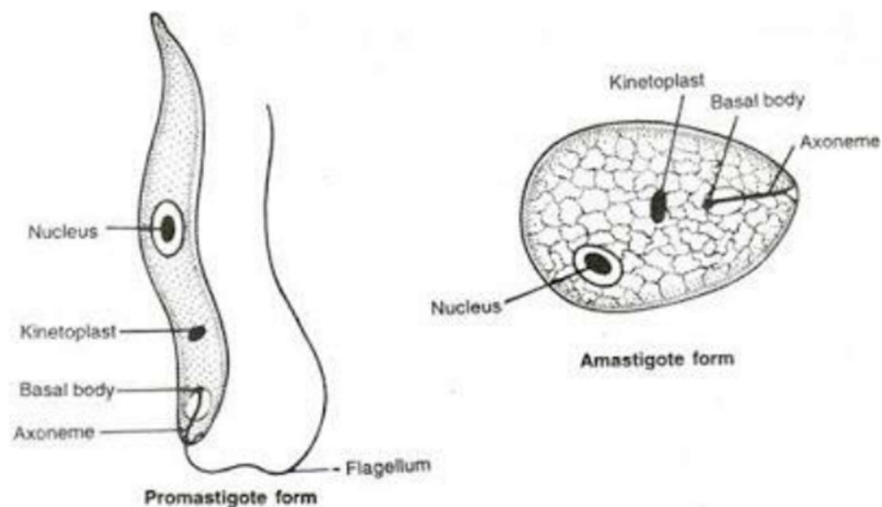


Figura 9. Morfologia das formas evolutivas de *Leishmania*. Fonte: <http://www.yourarticlelibrary.com/leishmania>. Acesso em: 8 de dez. de 2023.

A forma promastigota encontra-se no intestino do vetor flebotomíneo e a forma amastigota no interior de macrófagos e outras células do sistema retículo endotelial, do hospedeiro vertebrado, na pele, baço, fígado, medula óssea, linfonodos e membranas mucosas. Podem ser identificadas também em leucócitos no sangue (Figura 10) (Taylor *et al.*, 2017).

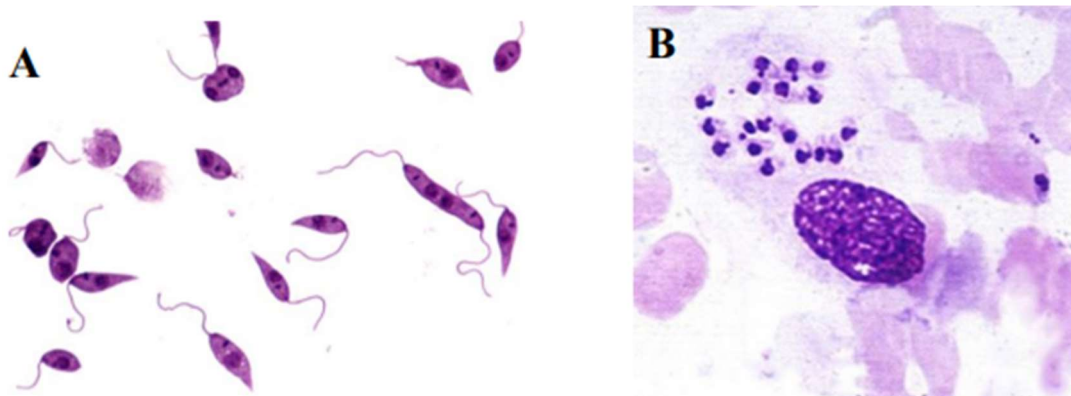


Figura 10. Microscopia das formas evolutivas de *Leishmania* sp. **A-** Promastigotas; **B-** Amastigotas. Adaptado de: Rosa, 2018.

Os vetores das leishmanioses, comumente chamados de hospedeiros invertebrados, são insetos flebotomíneos da ordem díptera, família Psychodidae, do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo. Se caracterizam por serem um grupo de insetos hematófagos, que geralmente medem entre 2 a 5 mm, possuem pernas longas e delgadas, corpo piloso e coloração parda, amarelada a castanha, que por este motivo são conhecidos popularmente como mosquito-palha. Possuem um par de asas modificadas em balancins, que garantem a estabilidade do inseto na hora do voo (Rabêlo, 1999; AFN, 2013).



Figura 11. Inseto vetor (flebotomíneo) das leishmanioses *Lutzomyia longipalpis*. Foto: Ray Wilson, *Liverpool School of Tropical Medicine*.

Apenas as fêmeas dos flebótomos possuem o aparelho bucal adaptado para sua alimentação picando a pele de seres vertebrados, realizando assim o repasto sanguíneo. Esses vetores possuem diversos nomes populares, dentre eles, podemos citar: mosquito-palha, birigui, cangalhinha, asa-dura, tatuquira, ligeirinho e péla-égua. Podem ser encontrados em sua forma larval em detritos de fendas de rocha, cavernas, raízes, folhas e também em forquilhas de árvores em tocas de animais (Rabêlo, 1999).

São insetos holometábolos, ou seja, possuem a metamorfose completa durante o seu desenvolvimento, passando pelas fases de ovo, instares larvais (4 no total), pupa e adulto (Figura 12). Seu desenvolvimento está associado à alimentação de sangue, o que explica o fato de as fêmeas serem hematófagas, uma vez que os ovos necessitam de sangue para seu desenvolvimento e maturação. Pode-se dizer então que as fêmeas de flebotomíneos são as responsáveis pela disseminação das leishmanioses, onde as mesmas se infectam no momento do repasto sanguíneo e podem infectar novos hospedeiros vertebrados na próxima alimentação (Rêgo, 2013).

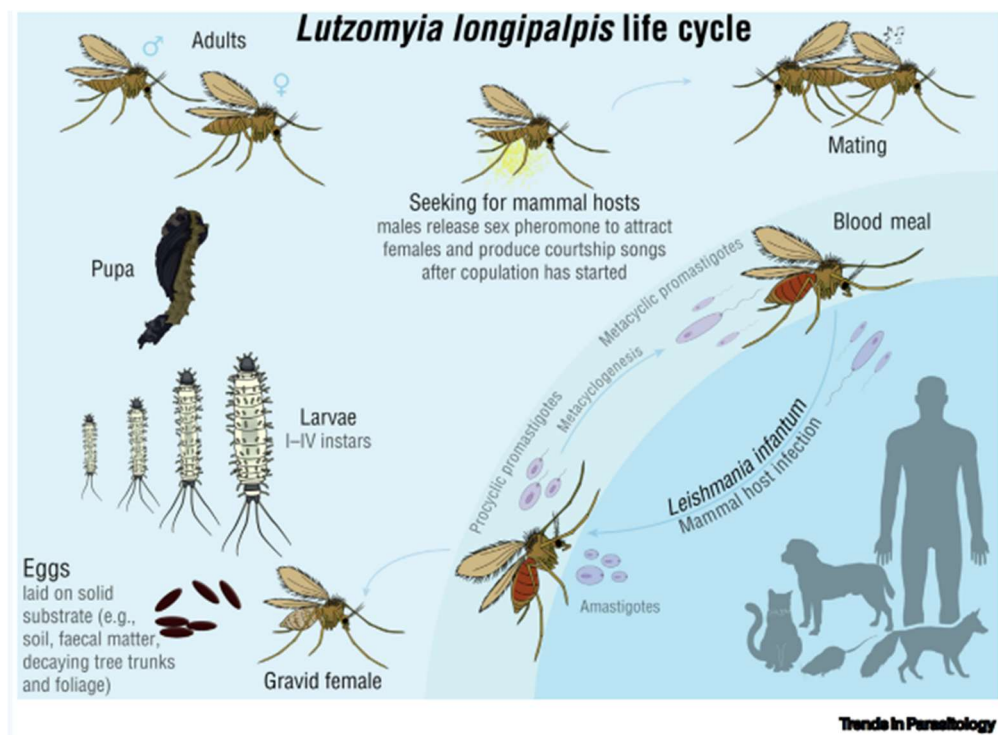


Figura 12. Ciclo de vida de *Lutzomyia longipalpis*. Adaptado de: Sousa-Paula; Otranto; Dantas-Torres, 2020. *Trends in Parasitology*. Elsevier.

A transmissão/infecção ocorre quando o vetor se infecta através da ingestão de formas amastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado. Posteriormente no intestino do inseto vetor, essas amastigotas se transformam em promastigotas, se multiplicando rapidamente. Esses protozoários, na forma promastigota, são então inoculados nos vertebrados durante a picada do vetor flebotomíneo, transmitindo assim a doença para um novo hospedeiro vertebrado (Fortes, 2004; Greene; Vandeveld, 2015). No estabelecimento da infecção existe uma série de barreiras presentes no organismo do inseto pelas quais o parasito precisa passar, desde enzimas digestivas, na matriz peritrófica, até sua fixação por completo nas paredes intestinais do vetor. Durante essa transposição do parasito por essas barreiras, o inseto acaba sendo prejudicado, podendo ocorrer a inibição das suas enzimas digestivas e a danificação da válvula de estomodeu (Kamhawai, 2006).

O ciclo biológico da leishmaniose (Figura 14) depende de dois hospedeiros obrigatórios que são, seu vetor/hospedeiro intermediário e seu hospedeiro vertebrado/definitivo. O hospedeiro intermediário ao se alimentar de um mamífero infectado, ingere as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) infectadas com as formas amastigotas do parasito, que ao entrarem no trato digestório do vetor, na parte anterior do intestino médio, serão envolvidas pela matriz peritrófica (MP), composta de fibrilas, proteínas, glicoproteínas e quitina, que é secretada pelas células do

epitélio intestinal em resposta à hematofagia. Durante esse estágio inicial, as formas amastigotas passam por diversas modificações morfológicas, se diferenciando em promastigotas procíclicas, responsáveis pela multiplicação celular que dura de 2 a 5 dias. Essas formas conseguem secretar substâncias importantes para a sobrevivência do parasito no organismo do inseto, como o lipofosfoglicano (LPG), principal glicoconjugado presente na superfície das leishmanias (Bates; Rogers, 2004).

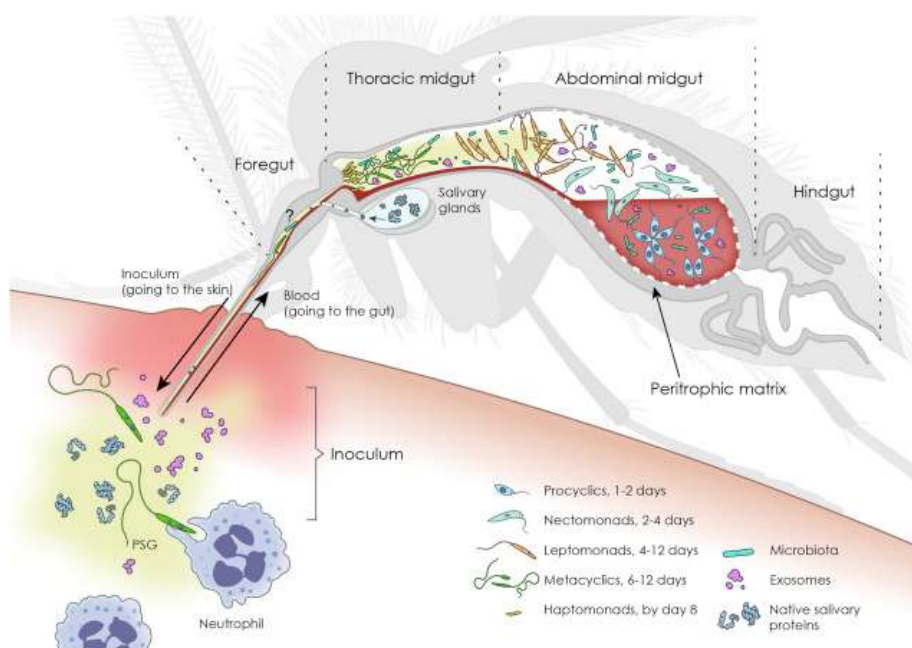


Figura 13. Ilustração das formas evolutivas do parasito *Leishmania sp.* no tubo digestório do vetor. Adaptado de: Serafim, *et al.*, 2017. *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission*. Elsevier.

diferente, fazendo com que o parasito não seja mais capaz de se ligar e ficar preso ao epitélio intestinal, então no momento da regurgitação para a nova alimentação, os promastigotas metacíclicos são inoculados no mamífero (Figura 13) (Bates, 2007).

Os promastigotas metacíclicos ao entrarem em contato com as células do SFM, do hospedeiro vertebrado, são rapidamente capturados por macrófagos, que formam uma invaginação na sua membrana para conter o parasito, que posteriormente se fecha, formando o fagossoma (Murphy, 2014). Após isso, ocorre então a fusão dos lisossomos formando assim o fagolisossoma. Dentro dos fagolisossomas, também chamado de vacúolo parasitóforo, as alterações do meio fazem com que o parasito se diferencie para a forma amastigota. Forma intracelular, com flagelo diminuto e que possui baixa motilidade. Possui a função de proliferação celular, causando a ruptura dos macrófagos, liberando-as para o meio extracelular e assim invadir novos macrófagos para garantir a manutenção da infecção (Figura 14) (Chang; Fong, 1983; Bates; Rogers, 2004).

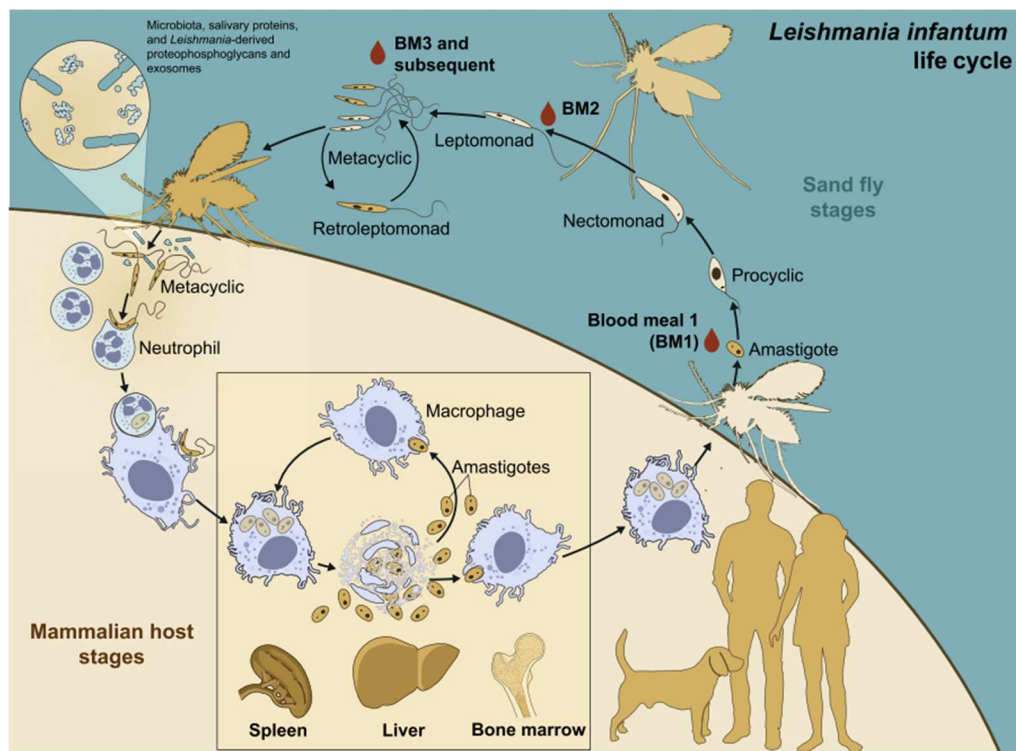


Figura 14. Ciclo biológico da leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum*. Adaptado de: Serafim; Iniguez; Oliveira, 2019. *Trends in Parasitology*. Elsevier.

2.6. Tratamentos

Segundo o MS, a terapia das leishmanioses visa ao alívio dos sintomas, do desconforto causado pela doença, à administração segura pelos pacientes, à garantia da adesão ao tratamento e ao controle e à minimização da ocorrência de efeitos adversos. Porém o tratamento disponível atualmente, assim como para outras doenças negligenciadas, é bastante precário. (Marchese, 2009). Além disso, estes tratamentos não se atualizam há anos, em introdução de novos medicamentos mais eficazes, acessíveis e menos prejudiciais aos pacientes (Dorlo *et al.*, 2012). Todos os fármacos disponíveis atualmente não são tão satisfatórios em termos de eficácia, acessibilidade, facilidade de administração e segurança (Tabela 1) (McGwire; Satoskar, 2014; Murray, 2010; Hendrickx, *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Principais fármacos utilizados na quimioterapia das leishmanioses. Adaptado de: Santiago; Pita; Guimarães, 2021. *Research, Society and Development*.

Fármacos	Mecanismos de ação	Via de Administração	Efeitos Adversos
Antimoniais pentavalentes	Redução do Sb+5 a Sb+3 dentro do organismo; Apoptose, através da inibição da tripanotona redutase; Inibição da atividade da topoisomerase.	IM, IV	Dor abdominal, vômito, diarreia, náusea, dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e, cardiotoxicidade.
Miltefosina	Inibição do citocromo-c oxidase através da despolarização do potencial da membrana mitocondrial, o que pode estar relacionado à morte de parasitos por apoptose.	VO	Toxicidade gastrointestinal, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade.
Paromomicina	Inibição da síntese de proteínas do protozoário ligando-se à subunidade ribossômica 30S, resultando no acúmulo de complexos ribossômicos anormais 30S-50S, causando a morte celular.	IM ou TÓPICO	Nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade.
Pentamidina	Inibição o sistema de transporte ativo; Inibição da topoisomerase mitocondrial II.	IM ou, preferencialmente IV	Cardiotoxicidade, hipotensão e efeitos gastrointestinais, bem como, indução de diabetes mellitus insulino-dependente.

Os antimoniais, utilizados como fármacos de primeira escolha, por conta da longa duração do tratamento, são administrados através de injeções via intramuscular (IM), podendo causar dor e desconforto no local da aplicação. A anfotericina B, também utilizada no tratamento, não apresenta boas propriedades físico-químicas, sua solubilidade em água é baixa, possui baixa permeabilidade em membranas e alto peso molecular, sendo fracamente absorvida e possuindo baixa biodisponibilidade oral, o que implica na sua administração por via intravenosa (IV), que demanda a hospitalização dos pacientes e acaba por limitar o seu uso em países mais pobres ou em desenvolvimento (Croft; Coombs, 2003; Barrat; Bretagne, 2007; Fangueiro, *et al.*, 2012; Bastos, *et al.*, 2016).

A miltefosina pode causar distúrbios gastrointestinais, por ser administrada por via oral, e alta toxicidade afetando os rins, levando o paciente à interrupção prematura do tratamento, aumentando as chances de o parasito gerar resistência ao fármaco. A paromomicina, tem a necessidade de administração por via parenteral, que assim como a anfotericina, representa uma dificuldade para o uso em países mais pobres. A pentamidina, apresenta efeitos secundários irreversíveis, como por exemplo, o *diabetes mellitus* insulino-dependente e diversos casos de resistência a esse fármaco já foram relatados (Sundar *et al.*, 2005; Sundar *et al.* 2006; Bray *et al.*, 2013; Bastos *et al.*, 2016).

2.7. Alternativas terapêuticas e de controle

O manual de controle e vigilância da LV no Brasil, feito pelo MS, tem como objetivo oferecer diretrizes regulatórias e recomendações visando à supervisão de gestão da parasitose, tendo como principal propósito a implementação de ações nos municípios, em busca da redução da morbimortalidade associada a enfermidade no país. Estas estratégias do MS são baseadas no diagnóstico e tratamento precoces dos casos em humanos, controle da propagação dos vetores, na erradicação ou tratamento dos reservatórios e a promoção da educação em saúde (Batista *et al.*, 2021).

Medidas profiláticas são sempre boas alternativas, tratando-se de doenças infectocontagiosas como as leishmanioses. A prevenção de possíveis fontes de transmissão, é uma medida que sempre que possível deve ser tomada, para isso o uso de inseticidas e repelentes representam boas medidas de proteção coletiva para as residências e abrigos de animais (Alexander; Maroli, 2003). No entanto, novas formas de controle e prevenção devem ser

desenvolvidas, visto que nem sempre o controle do vetor é uma medida altamente efetiva. Foram desenvolvidas vacinas para prevenção da doença em cães, a Leishmune ® (Zoetis, Brasil) e a Leish-Tec ® (Hertape Calier Saúde Animal AS, Brasil) onde ambas apresentaram bons resultados após a administração nos animais, apesar do MS não ter recomendado o seu uso como forma de controle da leishmaniose visceral. Recentemente o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) determinou que a fabricação das vacinas Leish-Tec e Leishmune fossem suspensas, por constatar que haviam inconformidades nos produtos e isso poderia levar a falta de eficácia da vacina e gerar riscos à saúde dos animais. Somado a isso até o momento não há uma vacina para humanos, tornando o tratamento farmacológico, ainda, a única opção disponível (Santiago; Pita; Guimarães, 2021).

Uma das vias mais utilizadas atualmente para o desenvolvimento de novos fármacos é o estudo e pesquisa na área dos produtos naturais, visando a um menor efeito tóxico, melhor atividade e maior acessibilidade. A investigação de novas moléculas eficazes no tratamento das leishmanioses é baseada no potencial, já descrito, de diversas espécies vegetais, além da grande variedade de biomas e espécies brasileiras (Mendonça-Filho *et al.*, 2004).

2.8. Óleos essenciais e seu potencial efeito como agentes antiprotozoários

Segundo Veeresham (2012), cerca de 35.000 a 70.000 espécies vegetais já são utilizadas com a finalidade medicinal, por conta da presença de óleos essenciais. No entanto, em 2000, Nodari e Guerra, demonstraram que mesmo com toda a utilização histórica e intensas pesquisas na área de farmacognosia, apenas 15 a 20% de espécies medicinais, foram estudadas na descoberta de substâncias bioativas. Os produtos naturais possibilitam a descoberta de moléculas de estrutura única, com alta atividade e seletividade (Kayser *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais (OEs), segundo definição da ANVISA, são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processos físicos, que podem se apresentar de maneira isolada ou misturados entre si, retificados, destilados ou concentrados (Brasil, 1999). Podem ser encontrados em todas as estruturas vegetais, ocorrendo em maior parte em folhas, frutos, e sementes e, em menor frequência em raízes, rizomas, lenhos e córtex (Brenna *et al.*, 2003).

Pode-se dizer então que os OEs são uma mistura de substâncias voláteis, advindas do metabolismo secundário (especial), biossintetizadas por diversas espécies vegetais e sua produção é proveniente de diferentes órgãos vegetais como os tricomas e glândulas endógenas.

Sua composição geralmente possui monoterpenos, sesquiterpenos e/ou fenilpropanóides. Sua biossíntese ocorre através de duas vias bioquímicas naturais complexas, a via do mevalonato e do ácido chiquímico, que envolvem diferentes reações enzimáticas (Rehman *et al.*, 2016).

Muitos fatores influenciam na composição e produtividade dos OEs, como clima, temperatura, composição do solo, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição do ar, idade da planta, ataque de patógenos, época da coleta, órgão utilizado na extração e o tipo de extração (Cavalcanti *et al.*, 2015; André *et al.*, 2018).

Os OEs podem desempenhar diversas funções, como defesa contra agentes microbianos, parasitos e outras pragas. Suas propriedades medicinais já são muito exploradas na medicina popular e na área da medicina veterinária como, anti-inflamatórios, analgésicos, cicatrizantes, antimicrobianos e inseticidas (Batista *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2020).

Pelo fato do potencial para utilização de OEs, já ter sido bastante explorado em muitas áreas relacionadas ao tratamento de doenças, como a medicina popular, a sua aplicabilidade contra parasitos protozoários, também acaba por se beneficiar desse uso. Diversos trabalhos já sugerem mecanismos de ação dos OEs contra estes patógenos, como inibição do crescimento dos parasitos, desestabilização da membrana plasmática, peroxidação lipídica, inibição de enzimas e alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial (Izumi *et al.*, 2011; Saeidnia; Gohari, 2012; De-Lara-Da-Silva *et al.*, 2020).

Em muitos trabalhos já foram confirmadas atividades biológicas, por abordagens científicas dos OEs, contra protozoários. O OE de *Origanum vulgare*, *Nepeta cataria* e *Lippia alba* são exemplos dessas atividades, por conseguirem inibir o crescimento de protozoários através de lise celular. No OE de *Thymus vulgaris*, um de seus principais constituintes químicos, o timol, consegue agir através da desestabilização da membrana plasmática dos protozoários (Santoro *et al.*, 2007; Saeidnia; Gohari, 2012). O OE de *Allium sativum* já possui efeito demonstrado contra *Entamoeba histolytica*, que pode ser atribuído aos seus compostos terpenóides como, timol, carvacrol e linalol (Vunda *et al.*, 2012).

Diversos metabólitos secundários de plantas apresentam atividade anti-*Leishmania*, onde podemos observar os alcaloides, terpenos, flavonoides, benzopiranos, lactonas sesquiterpênicas e derivados fenólicos, que podem ser encontrados nos OEs de plantas medicinais (De-Carvalho; Ferreira, 2001; Iwu; Jackson; Schuster, 1994; Rocha *et al.*, 2005).

Com as poucas opções de tratamentos das doenças causadas por protozoários, nesse caso, a leishmaniose visceral, e suas desvantagens, é imprescindível a pesquisa de novas alternativas para o tratamento da doença, buscando novos fármacos naturais que tenham melhor atividade e introduzi-los, visando uma maior eficácia, inclusive contra as cepas resistentes às drogas em uso, com preços acessíveis para a população e com reduzidos ou ausentes efeitos colaterais. Dessa forma, a espécie vegetal *Schinus terebinthifolius* foi escolhida para o presente estudo, utilizando os óleos essenciais de 4 genótipos diferentes desta espécie para testar sobre o parasito *L. infantum*.

2.9. *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Conhecida popularmente como aroeira, aroeira-vermelha, pimenta-rosa e aroeira-da-praia, a espécie vegetal *S. terebinthifolius*, pertence à família botânica Anacardiaceae e é originária da América do Sul, compreendendo o Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. No Brasil, ela ocorre mais frequentemente no Nordeste do estado de Pernambuco e na região Sul do estado do Rio Grande do Sul (Figura 15) (Azevedo *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2016).

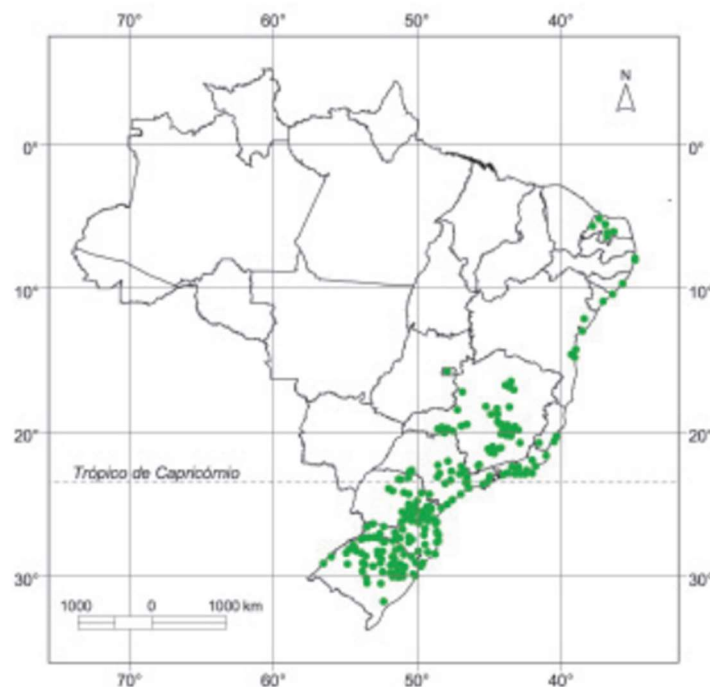


Figura 15. Distribuição geográfica da ocorrência natural de *Schinus terebinthifolius* no Brasil. Adaptado de: Carvalho, 2003. Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa.

É uma árvore que possui aproximadamente 5 a 10 metros de altura, possui um tronco curto, com copa larga, cilíndrico, pouco denso, com casca externa, escura, grossa, rugosa e áspera, que se desprende em placas irregulares. Já a casca interna apresenta uma coloração avermelhada, é fibrosa e possui um odor característico, por conta da exsudação de terebintina. As flores da aroeira são actinomorfas, pentâmeras, com cinco sépalas verdes, cinco pétalas brancas e um disco nectarífero de coloração amarelo ouro. Possui um fruto globoso e levemente achatado, com sementes em seu interior e suas folhas são do tipo perenifólias que liberam um forte aroma. É uma planta que consegue se adaptar facilmente a solos com restrições físicas, químicas e hídricas e em regiões com baixas temperaturas com maior propensão a geadas, podendo ser recomendada para áreas de reflorestamento (Figura 16) (Neves *et al.*, 2016; Rorato *et al.*, 2018).



Figura 16. Folhas, frutos, árvore e tronco de *Schinus terebinthifolius*. Fonte: Google imagens.

A indústria possui grande interesse na espécie, mais especificamente a indústria alimentícia, que explora bastante os frutos da aroeira-vermelha, por conta das características de seu sabor e aroma, que são bastante utilizados como tempero. Enquanto que as cascas, folhas e raízes são bastante utilizadas pela medicina popular, por terem conhecidas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas (Carvalho *et al.*, 2013; Uliana *et al.*, 2016).

S. terebinthifolius é amplamente estudada por possuir aplicações terapêuticas comprovadas como, propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antioxidantes e larvicidas. Sua ação antimicrobiana é relacionada a sua composição química rica em terpenos, cetonas, álcoois e ácidos (Silva *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2019). Também é rica em compostos fenólicos como antocianinas, biflavonoides e galotaninos, que garantem potencial antioxidante (Feuereisen *et al.*, 2014).

Vários metabólitos secundários já foram identificados na composição química de *S. terebinthifolius* como terpenos, flavonoides, alcaloides, taninos e saponinas (Jorge; Markmann, 1996; Feuereisen *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2019). De acordo com Cavalcanti *et al.* (2015), o óleo essencial das folhas secas de *S. terebinthifolius* possui como compostos majoritários o β -cariofileno (35,2%), α -pineno (28,1%) e o D-germacreno (15,5%).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar biologicamente (atividade leishmanicida) o efeito dos óleos essenciais de 4 genótipos/quimiotipos ARO030-F; ARO071-F; ARO078-F; ARO136-F da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi contra *Leishmania (Leishmania) infantum*, bem como avaliar a sua toxicidade frente células de seu hospedeiro vertebrado *in vitro* e propor um possível mecanismo de ação.

3.2. Específicos

- ✓ Obter os 4 genótipos (ARO030-F; ARO071-F; ARO078-F; ARO136-F) de *S. terebinthifolius*, do banco de germoplasmas do Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade/Instituto de Agronomia, UFRRJ.
- ✓ Proceder o beneficiamento adequado das folhas coletadas, por técnicas de secagem e pulverização, e realizar a extração do óleo essencial por hidrodestilação;
- ✓ Caracterizar quimicamente os óleos essenciais por Cromatografia Gasosa acoplado ao detector de ionização por chamas e espectrômetro de Massas (CG-DIC e CG-EM);
- ✓ Avaliar o potencial leishmanicida dos óleos essenciais de *S. terebinthifolius* sobre as formas promastigotas do parasito *in vitro*;
- ✓ Verificar a toxicidade dos óleos essenciais, sobre macrófagos murinos de linhagem celular *in vitro*;
- ✓ Avaliar o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas tratadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção das espécies

Folhas da espécie *Schinus terebinthifolius* foram coletadas de 4 genótipos (ARO030-F; ARO071-F; ARO078-F; ARO136-F), previamente selecionados, da coleção de Germoplasmas do Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade/Instituto de Agronomia, UFRRJ no verão, em dezembro de 2022. A coleção é coordenada pelo professor Pedro Damasceno Junior da UFRRJ.

4.2. Material vegetal

Folhas da espécie *S. terebinthifolius* foram secas por um período de 72h em estufa com circulação e renovação de ar, a temperatura de 40°C. Em seguida as folhas secas foram trituradas mecanicamente com o auxílio de um moinho de facas.

4.3. Obtenção dos óleos essenciais

Foram realizadas 4 extrações, uma para cada genótipo de *S. terebinthifolius*, utilizando aproximadamente 150g de folhas secas e trituradas. A técnica de hidrodestilação utilizando aparelho de Clevenger foi utilizada, conforme preconizado pela Organização Internacional para Padronização (ISO9235:2021). Os óleos essenciais foram obtidos após 3h de hidrodestilação e armazenados em frascos de vidro âmbar sob refrigeração (-20°C).

4.4. Caracterização química dos óleos essenciais por CG-DIC e CG-EM

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo Gasoso 5890 Séries II (Agilent, USA), equipado com um detector de ionização de chama (DIC) e injetor no modo “split” (1:20); as substâncias foram separadas em uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O hélio foi utilizado como gás carreador com fluxo de 1 mL min⁻¹. As temperaturas do forno, detector e injetor foram programadas de acordo com Adams (ADAMS, 2007). A temperatura do forno foi programada em 60°C por 2 min com incremento de 5°C min⁻¹ até 110°C, seguido por incremento de 3°C min⁻¹ até 150°C e, finalmente, seguido por incremento de 15°C min⁻¹ até 290°C, mantidos por 15 min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 290°C, respectivamente. Um Cromatógrafo Gasoso acoplado ao espectrômetro de massa QP-2010 Plus (Shimadzu, JPN) foi utilizado para separar e analisar as substâncias presentes nos óleos essenciais. O fluxo de hélio, a coluna capilar e a programação

de temperatura para a análise por CG-EM foram as mesmas descritas para a análise por CG-DIC relatados também por Adams (Adams, 2007). As temperaturas do injetor e de interface foram de 220 e 250°C, respectivamente. O espectro de massa foi obtido em um detector quadrupolo operando a 70 eV, com intervalo de massa entre 40 e 400 m/z e a razão de 0,5 scan s⁻¹. A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi então realizada, baseando-se na comparação dos índices de retenção calculados e dos espectros de massa obtidos com aqueles descritos na literatura e no banco de dados do equipamento (Kratz, 1963; Biblioteca NIST 2008; Adams, 2017).

4.5. Parasitos

As formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MAP263) foram mantidas em meio de cultura Schneider's (Schneider Insect Medium, Sigma-Aldrich, MO, USA) pH 7.2, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino Gibco® (SFB) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e penicilina-estreptomicina 10.000 U-10mg/mL, respectivamente (Sigma-Aldrich, MO, USA) em estufa BOD a 27°C. Foram utilizadas na fase logarítmica de crescimento (2 a 3 dias).

4.6. Macrófagos

Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio “*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*” (DMEM), suplementado com Glucose 4,5g/L, 10% de SFB e penicilina-estreptomicina 10.000 U-10mg/mL, respectivamente (Sigma-Aldrich, MO, USA), à 37 °C com 5% de CO₂.

4.7. Atividade anti-promastigota

Formas promastigotas, com 2-3 dias de cultura, foram plaqueadas em meio Schneider's, suplementado com 10% SFB em triplicata em placas de 96 poços (volume final de 200 µL por poço), mantendo uma proporção de 2x10⁵ parasitos por poço. Para isto, as células foram contadas previamente, na diluição de 1:100 em solução de contagem, em câmara de Neubauer. Os parasitos foram tratados ou não com diferentes concentrações dos óleos essenciais, diluídos 1:100 em DMSO (dimetilsulfóxido), no primeiro dia de cultivo. O controle foi realizado com parasitos cultivados somente em meio de cultura suplementado, o controle do veículo do OE (DMSO) com a adição do reagente na maior concentração testada e o controle positivo (morto) com adição de azida sódica 2% (Sigma-Aldrich, MO, USA). As placas foram incubadas em estufa BOD a 27°C.

4.8. Leitura da atividade anti-promastigota pelo método XTT

Foram adicionados às placas com as formas promastigotas tratadas com os óleos essenciais e os controles, 50 µL de solução de XTT, análogo do substrato da enzima desidrogenase mitocondrial, nas concentrações de 1 mg/mL XTT (2,3-Bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt) e 200 mM PMS (Phenazine Methosulfate). As placas foram incubadas por 4 horas a 27°C. Ao término da incubação a absorbância do produto da reação foi lida utilizando a leitora de microplaca no comprimento de onda de 450 nm (Microplate Reader Mod. 3550-UV, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência em relação aos controles não tratados.

4.9. Citotoxicidade dos óleos essenciais

O meio de cultura contendo os macrófagos foi submetido à centrifugação a 1500 RPM, a 4°C durante 10min. Após isso, o sobrenadante foi descartado e os macrófagos foram ressuspendidos em meio DMEM. Após a ressuspensão, foi retirada uma alíquota da solução e feita uma diluição 1:10 utilizando o corante azul de tripan, para posterior contagem das células viáveis (não coradas) em câmara de Neubauer. Os macrófagos foram então plaqueados, em triplicata, em placas de 96 poços (volume final de 200 µL por poço) na proporção de 2×10^5 macrófagos por poço em meio DMEM suplementado. As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas, para aderência das células. Após esse período, as placas foram lavadas com tampão fosfato-salino PBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) em temperatura ambiente e adicionados 200 µL de meio suplementado. Em seguida, as células foram tratadas com os óleos essenciais, diluídos 1:100 em DMSO 50% (diluído em meio), em diferentes concentrações. As placas foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C e 5% CO₂ por 48 horas. Os controles foram as células cultivadas apenas em meio de cultura, o controle DMSO com a adição do DMSO diluído a 50% na maior concentração testada e o controle negativo foi realizado com adição de azida sódica 5% (Sigma-Aldrich, MO, USA).

4.10. Leitura da citotoxicidade pelo método XTT

Após a incubação de 48h, as placas tratadas com os óleos essenciais e os controles foram retiradas da estufa, seus poços foram lavados novamente com PBS em temperatura ambiente e foram adicionados 100 µL de PBS com 10% de SFB. Após isso foram adicionados 50 µL de solução de XTT. A placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas e foi realizada a leitura a 450 nm em leitora de microplaca (Microplate Reader Mod. 3550-UV, Bio-Rad

Laboratories, CA, USA). Os controles foram as células cultivadas apenas em meio de cultura e o controle negativo foi realizado com adição de azida sódica 5% (Sigma-Aldrich, MO, USA). Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência em relação aos controles não tratados.

4.11. Efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Formas promastigotas de *L. infantum* na concentração de 2×10^5 parasitos/mL foram plaqueadas em garrafas de cultivo, tratadas com os óleos essenciais e incubadas por 48 horas a 27°C. Após esse período, os parasitos foram lavados com PBS e contados em câmara de Neubauer. As soluções para análise foram adequadas para a concentração final de 1×10^7 parasitos/mL. Os reagentes JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-iodeto de tetrametilbenzimidazolilcarbocianina), FCCP (fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona) e Oligomicina na concentração de 10 μ M, e, DMSO 5% foram adicionados e os parasitos foram incubados por 15 minutos a 27°C em estufa. Posteriormente, os parasitos foram ressuspensos em PBS e a fluorescência da reação foi lida utilizando o espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 525 nm (excitação) e 590 nm (emissão) / 490 nm (excitação) e 530 nm (emissão).

4.12. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA), para mais de dois grupos. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. O valor de p foi considerado significativo quando menor ou igual a 0,05. Foi aplicado o teste de Tukey para múltiplas comparações.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização química dos óleos essenciais

A análise dos óleos essenciais por cromatografia gasosa permitiu observar a complexidade destes produtos naturais, de maneira a possibilitar a identificação das substâncias que os compõem e que são responsáveis por suas propriedades. Os compostos identificados em cada um dos 4 genótipos de *S. terebinthifolius* estão listados nas tabelas a seguir e seus espectros estão dispostos nas figuras abaixo (Figuras 17, 19, 21, 23).

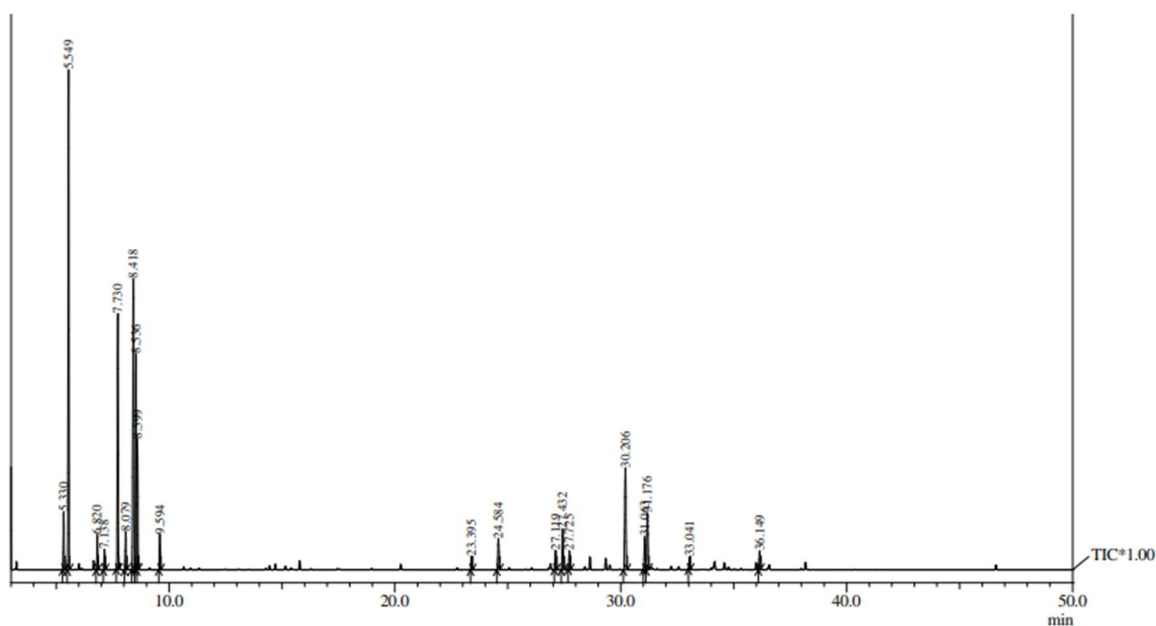


Figura 17. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO030-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Tabela 2- Composição química do óleo essencial do genótipo ARO030-F.

T.R.	Substância	I.R. Calculado	I.R. Literatura	% Área
7,146	1,7,7-trimetiltriciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano	892	921	2,280
7,431	α-pineno	902	932	24,79
8,823	β-pineno	939	974	0,44
9,040	Mirceno	945	988	1,53
9,365	α-felandreno	954	1002	0,77
10,115	δ-2-careno	974	1001	12,18
10,536	ρ-cimeno	986	1020	1,75
10,911	Limoneno	996	1024	17,26
11,067	β-felandreno	1000	1025	10,72
11,155	γ-terpineno	1002	1054	5,57
23,395	β-elemeneno	1294	1389	0,78
27,583	(E)-cariofileno	1485	1417	0,86
27,725	δ-selineno	1531	1492	1,08
28,981	Germacreno D	1601	1480	1,97
30,208	γ-elemeneno	1493	1434	7,23

31,674	Germacreno B	1561	1559	1,44
33,223	Espatulenol	1643	1577	0,68
35,025	Óxido de cariofileno	1692	1582	6,05
35,899	(Z)-cadin-4-en-7-ol	1717	1635	2,11
Hidrocarbonetos monoterpênicos				77,29
Monoterpenos oxigenados				0
Monoterpenos totais				77,29
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				13,36
Sesquiterpenos oxigenados				8,84
Sesquiterpenos totais				22,2
Total identificado				99,49

T.R.: tempo de retenção; I.R.: índice de retenção. Fonte: elaborado pelo autor (2024).

O óleo essencial do genótipo ARO030-F apresentou 19 substâncias em sua composição (Tabela 2), dentre elas, foram identificados como componentes majoritárias o α -pineno (24,79%), o limoneno (17,26%) e o δ -2-careno (12,18%) (Figura 18). Destes compostos identificados, 77,29% são de hidrocarbonetos monoterpênicos, 13,36% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 8,84% de sesquiterpenos oxigenados.

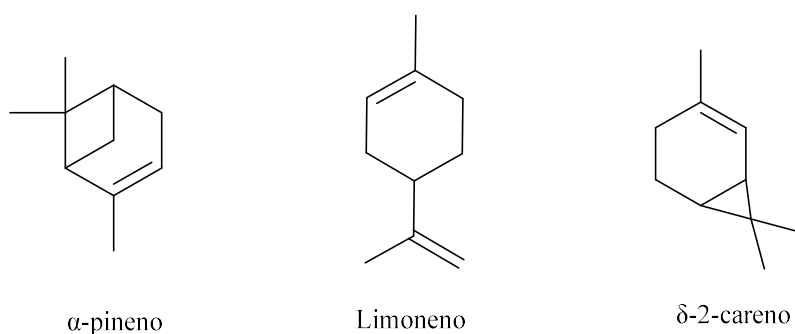


Figura 18. Estrutura química dos componentes majoritários de ARO030-F.

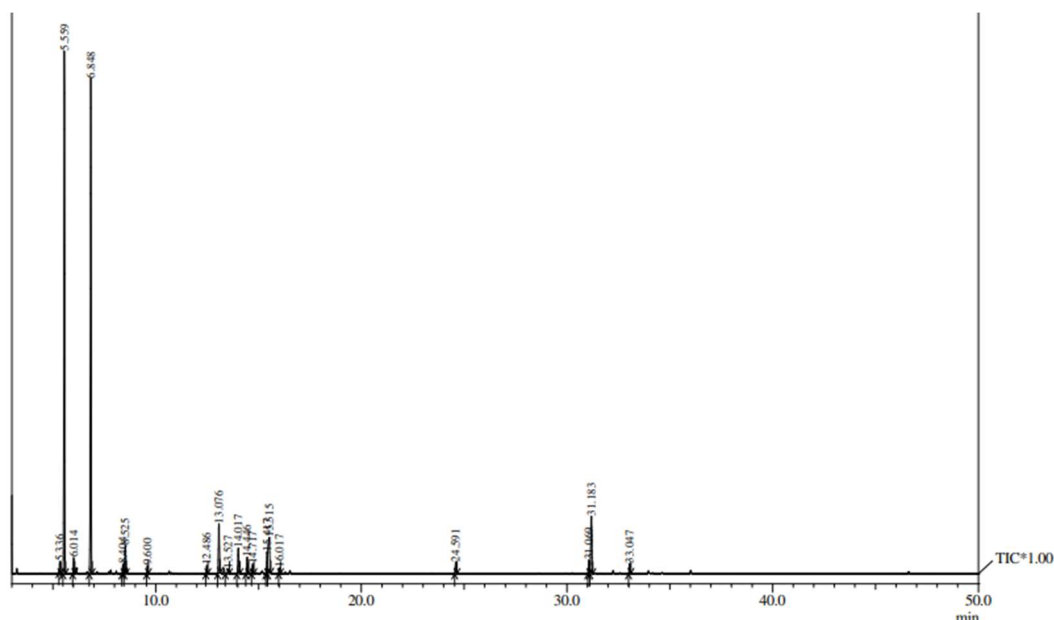


Figura 19. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO071-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial do genótipo ARO071-F

T.R.	Substância	I.R. Calculado	I.R. Literatura	% Área
7,135	α -tujeno	891	924	0,66
7,434	α-pineno	902	932	36,74
8,021	Canfeno	918	946	0,92
8,166	Sabineno	921	969	0,43
9,053	p-cimeno	946	1020	36,22
10,202	Limoneno	977	1024	0,23
10,885	α -terpineno	995	1014	0,72
12,486	6-canfenol	1038	1111	0,61
13,076	(E)-pinocarveol	1048	1135	4,04
13,527	α -felandren-8-ol	1059	1166	0,41
15,592	Pinocarvona	1108	1160	0,55
17,341	Terpinen-4-ol	1125	1174	1,98
17,778	α -terpineol	1148	1186	1,03
18,118	Mirtenol	1159	1194	0,6
18,864	Verbenona	1167	1204	1,28
24,591	(E)-cariofileno	1184	1417	0,96
31,069	Espatulenol	1317	1577	1,2
31,183	Óxido de cariofileno	1474	1582	5,54
35,859	(Z)-cadin-4-en-7-ol	1588	1635	0,81
Hidrocarbonetos monoterpênicos				75,92
Monoterpenos oxigenados				10,5
Monoterpenos totais				86,42
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				0,96
Sesquiterpenos oxigenados				7,55
Sesquiterpenos totais				8,51
Total identificado				94,93

T.R.: tempo de retenção; I.R.: índice de retenção. Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Para o OE de ARO071-F, também foram identificadas 19 substâncias (Tabela 3), dentre elas, como componentes majoritários estão o α -pineno (36,74%), o p -cimeno (36,22%) e o óxido de cariofileno (5,54%) (Figura 20). Destes constituintes, 75,92% são de hidrocarbonetos monoterpênicos, 10,5% de monoterpenos oxigenados, 0,96% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, 7,55% de sesquiterpenos oxigenados.

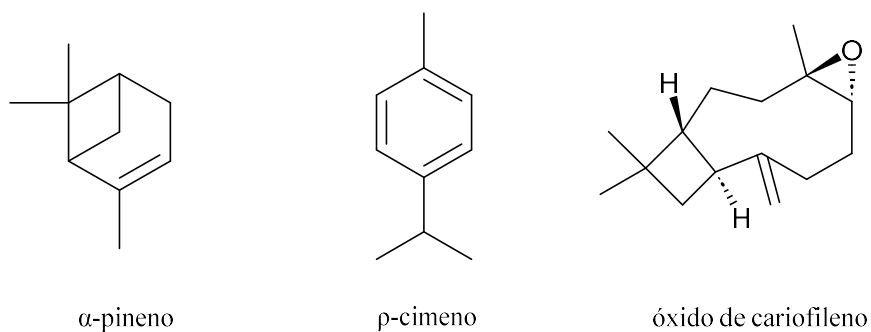


Figura 20. Estruturas químicas dos componentes majoritários de ARO071-F.

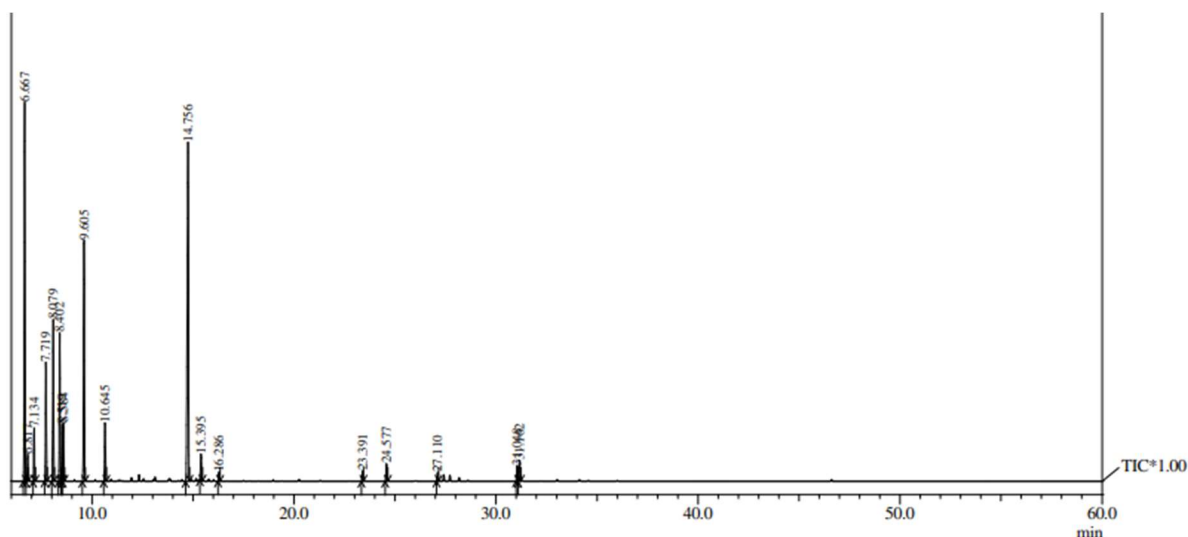


Figura 21. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO078-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Tabela 4 – Composição química do OE do genótipo ARO078-F

T.R.	Substância	I.R. Calculado	I.R. Literatura	% Área
7,142	α -tujeno	892	924	3,13
7,420	α -pineno	901	932	3,96
8,819	Sabineno	939	969	20,13
9,034	β -pineno	945	974	1,18
9,357	Mirceno	954	988	2,06
10,101	α -felandreno	974	1002	5,65
10,527	δ -2-careno	985	1001	8,13
10,892	ρ -cimeno	995	1020	8,25
11,049	Limoneno	1000	1024	2,72
11,140	β -felandreno	1002	1025	2,81
12,300	γ-terpineno	1029	1054	13,08
13,515	Terpinoleno	1058	1086	3,21
18,151	Terpinen-4-ol	1167	1174	20,11
18,864	α -terpineol	1184	1186	1,23
23,391	β -elemeno	1385	1389	0,54
24,577	(<i>E</i>)-cariofileno	1416	1417	1,00
27,110	Germacreno D	1464	1480	0,490
31,183	Espatulenol	1471	1577	0,85
Hidrocarbonetos monoterpênicos				74,31
Monoterpenos oxigenados				21,34
Monoterpenos totais				95,65
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				2,03
Sesquiterpenos oxigenados				0,85
Sesquiterpenos totais				2,88
Total identificado				98,53

T.R.: tempo de retenção; I.R.: índice de retenção. Fonte: elaborado pelo autor (2024).

No OE de ARO078-F, foram identificadas 18 substâncias (Tabela 4), apresentando como componentes majoritários o Sabineno (20,13%), Terpinen-4-ol (20,11%) e γ -terpineno (13,08%) (Figura 23). Destes constituintes, 74,31% são de hidrocarbonetos monoterpênicos, 21,34% de monoterpênos oxigenados, 2,03% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 0,85% de sesquiterpenos oxigenados.

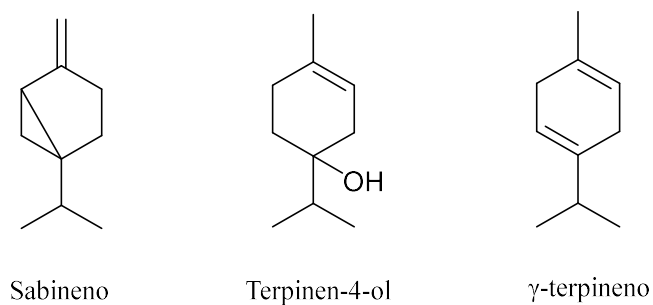


Figura 22. Estruturas químicas dos componentes majoritários de ARO078-F.

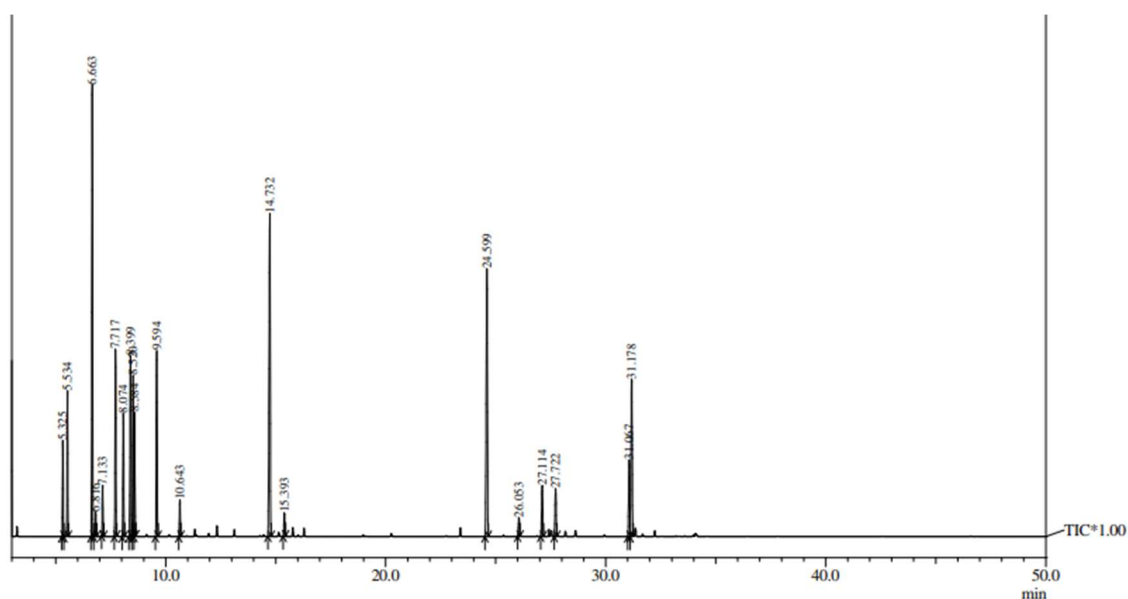


Figura 23. Cromatograma do óleo essencial do genótipo ARO136-F obtido a partir de uma coluna capilar de sílica fundida similar a DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Tabela 5 – Composição química do OE do genótipo ARO136-F

T.R.	Substância	I.R. Calculado	I.R. Literatura	% Área
2,553	α -tujeno	725	924	0,36
7,104	α -pineno	890	932	2,57
7,381	Sabineno	900	969	4,61
8,775	β-pineno	938	974	16,53
8,99	Mirceno	944	988	0,75
9,314	α -felandreno	953	1002	1,48
10,056	δ -2-careno	973	1001	6,370
10,48	ρ -cimeno	984	1020	4,26
10,844	Limoneno	995	1024	7,24
11,002	β -felandreno	998	1025	5,77
11,092	γ -terpineno	1001	1054	4,11
12,244	Isoterpinoleno	1028	1085	6,85
13,462	Terpinen-4-ol	1058	1174	1,48
18,065	α-terpineol	1147	1186	12,29
28,888	(E)-cariofileno	1428	1408	12,03
31,566	α -humuleno	1498	1452	2,23
32,217	Germacreno D	1511	1480	2,12
35,785	γ -elemeno	1614	1434	3,22
Hidrocarbonetos monoterpênicos				60,9
Monoterpenos oxigenados				13,77
Monoterpenos totais				74,67
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				19,6
Sesquiterpenos oxigenados				0
Sesquiterpenos totais				19,6
Total identificado				94,27

T.R.: tempo de retenção; I.R.: índice de retenção. Fonte: elaborado pelo autor (2024).

O OE de ARO136-F, apresentou 19 substâncias em sua composição (Tabela 5), tendo como componentes majoritários o β -pineno (16,53%), α -terpineol (12,29%) e *trans*-cariofileno (12,03%) (Figura 24). Destes, 60,9% são de hidrocarbonetos monoterpênicos, 13,77% de monoterpênos oxigenados e 19,6% de hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

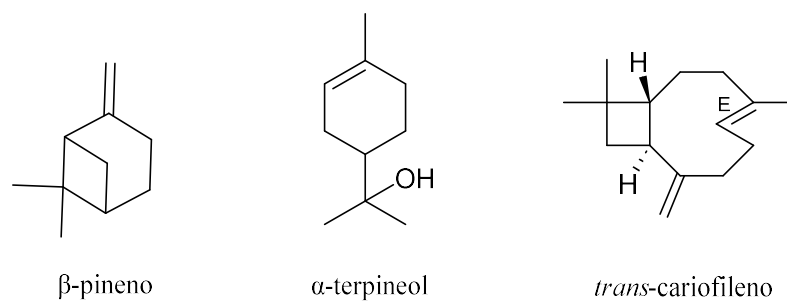


Figura 24. Estruturas químicas dos componentes majoritários de ARO136-F.

5.2. Atividade anti-promastigota e quantificação pelo método XTT

Para avaliar o potencial leishmanicida dos óleos essenciais, foi utilizado o método XTT, onde a atividade foi definida por meio de testes *in vitro* com as formas promastigotas do parasito *L. infantum*. Este teste verifica a atividade mitocondrial, por meio da atividade de uma desidrogenase mitocondrial, conseguindo avaliar dessa maneira se houveram danos às células e consequentemente a morte dos parasitos. Mais precisamente, o método se baseia na clivagem do sal de tetrazólio XTT (amarelo), na presença de um reagente de acoplamento de elétrons, que produz um sal de formazan solúvel (laranja), somente na presença de células viáveis. O XTT é clivado em formazan pelo sistema de redutase de succinato-tetrazólio, que pertence à cadeia respiratória de mitocôndrias e só é ativo em células metabolicamente intactas. Essa biorredução está relacionada à produção de NADPH por meio da glicólise, sendo assim, a quantidade de corante formazan formado (intensidade da coloração laranja) está diretamente associada ao número de células metabolicamente ativas na cultura (Figura 25). Esta atividade pode então ser quantificada pelos valores de absorbância obtidos no comprimento de onda de 450nm, pela leitura em espectrofotômetro. Os resultados para cada genótipo, estão presentes nos gráficos a seguir.

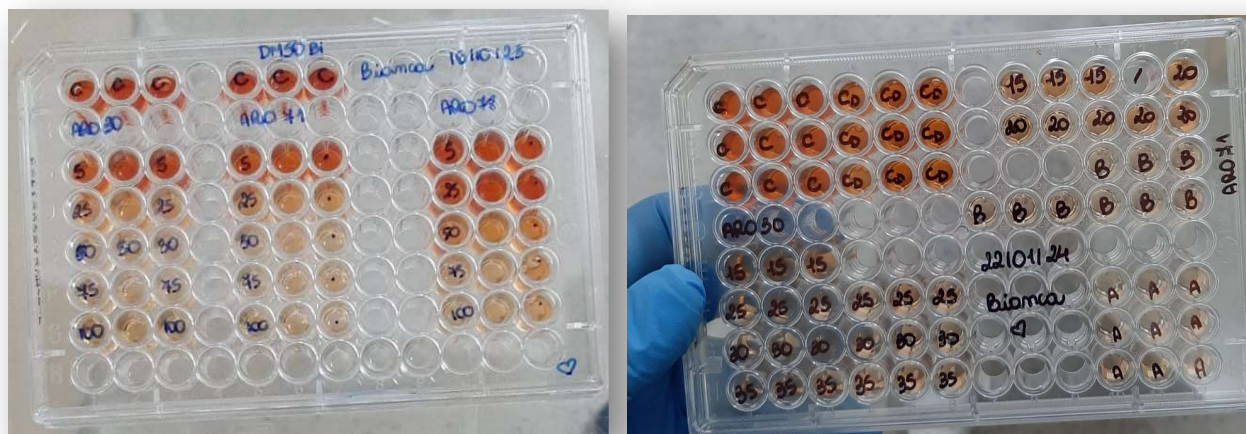


Figura 25. Fotografias do ensaio XTT de formas promastigotas de *Leishmania infantum* para melhor interpretação do método/resultados.

5.2.1. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO030-F sobre formas promastigotas de *L. infantum*

Foi possível observar que nas concentrações de 20; 40; 50; 75 e 100 µg/mL, o óleo essencial de ARO030-F, apresentou atividade leishmanicida após 48h do tratamento. Apresentando, respectivamente, 77,33%; 41,66%; 18,33%; 0,76% e 0% como porcentagens de sobrevivência dos parasitos e um IC₅₀ de 32,46 µg/mL (Figura 26).

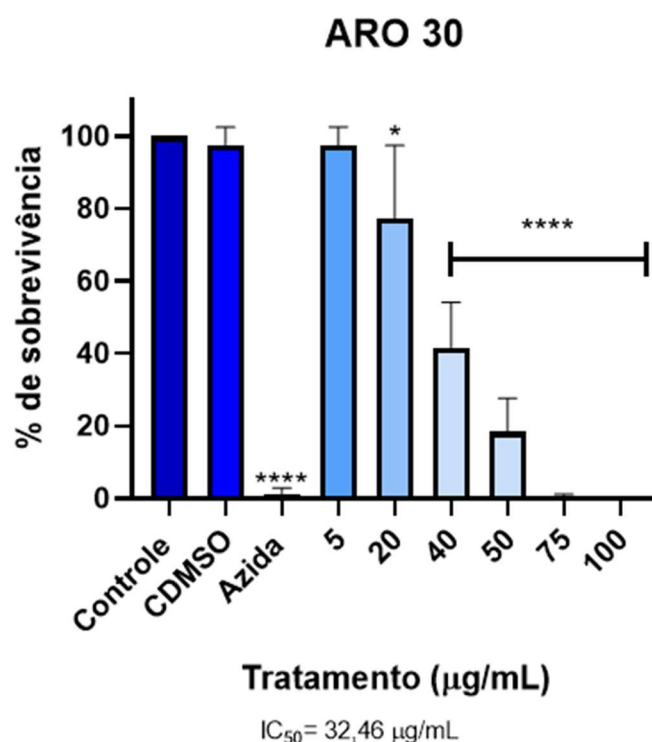


Figura 26. Atividade leishmanicida do OE de ARO030-F. Porcentagem de sobrevivência de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, após 48h de incubação em diferentes concentrações do OE. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,001$) e * ($p < 0,05$) são estatisticamente significantes. CDMSO foi usado como controle do veículo e Azida foi usada como controle positivo. Experimento realizado em triplicata.

5.2.2. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO071-F sobre formas promastigotas de *L. infantum*

Para ARO071-F, pode-se observar que nas concentrações de 20; 40; 75 e 100 µg/mL, o óleo essencial apresentou atividade leishmanicida, após 48h do tratamento. Teve como porcentagens de sobrevivência dos parasitos, 51%; 8,25%; 3% e 1%, respectivamente, e apresentou um IC₅₀ de 20,52 µg/mL (Figura 27).

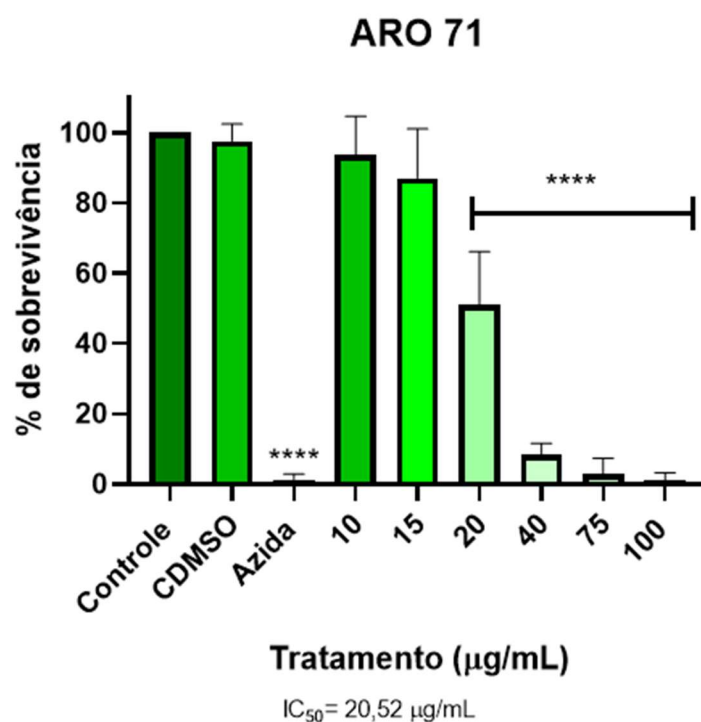


Figura 27. Atividade leishmanicida do OE de ARO071-F. Porcentagem de sobrevivência de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, após 48h de incubação em diferentes concentrações do OE. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,0001$) são estatisticamente significantes. CDMSO foi usado como controle do veículo e Azida foi usada como controle positivo. Experimento realizado em triplicata.

5.2.3. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO078-F sobre formas promastigotas de *L. infantum*

O genótipo ARO078-F, apresentou atividade leishmanicida nas concentrações de 50; 75; 80; 120 µg/mL, após 48h do tratamento. Teve como porcentagens de sobrevivência dos parasitos, 32,25%; 25,66%; 1,56%; 2,33%, respectivamente, e apresentou um IC₅₀ de 41,61 µg/mL (Figura 28).

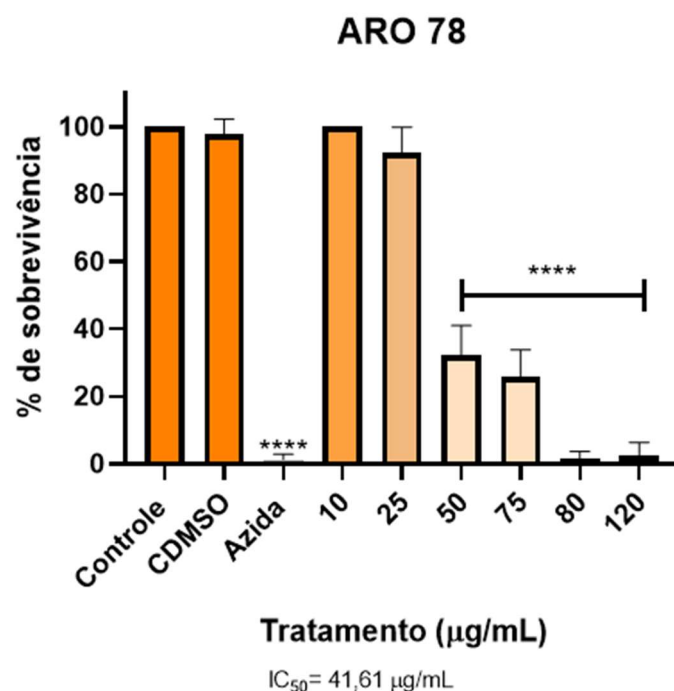


Figura 28. Atividade leishmanicida do OE de ARO078-F. Porcentagem de sobrevivência de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, após 48h de incubação em diferentes concentrações do OE. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,0001$) são estatisticamente significantes. CDMSO foi usado como controle do veículo e Azida foi usada como controle positivo. Experimento realizado em triplicata.

5.2.4. Efeito do óleo essencial do genótipo ARO136-F sobre formas promastigotas de *L. infantum*

Nas concentrações de 20; 30; 40; 50 e 90 µg/mL, o óleo essencial de ARO136-F, apresentou atividade leishmanicida, após 48h do tratamento. Apresentou como porcentagens de sobrevivência dos parasitos, respectivamente, 72,5%; 56%; 47,66%; 21,75% e 1,66%. Teve como valor de IC₅₀ 32,83 µg/mL (Figura 29).

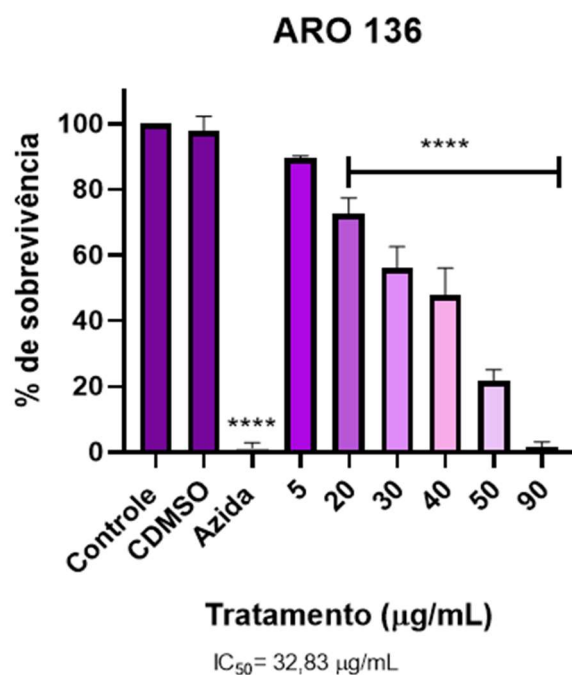


Figura 29. Atividade leishmanicida do OE de ARO136-F. Porcentagem de sobrevivência de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, após 48h de incubação em diferentes concentrações do OE. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,0001$) são estatisticamente significantes. CDMSO foi usado como controle do veículo e Azida foi usada como controle positivo. Experimento realizado em triplicata.

5.3. Citotoxicidade dos óleos essenciais pelo método XTT

Para avaliar a viabilidade de células do hospedeiro vertebrado após o tratamento, foi utilizado o ensaio de XTT, onde a atividade citotóxica dos óleos essenciais foi definida a partir de ensaios *in vitro* com macrófagos murinos de linhagem celular (RAW264,7). Avaliando a atividade mitocondrial e demonstrar a citotoxicidade dos compostos sobre as células (descrito no item 5.2) (Figura 30).

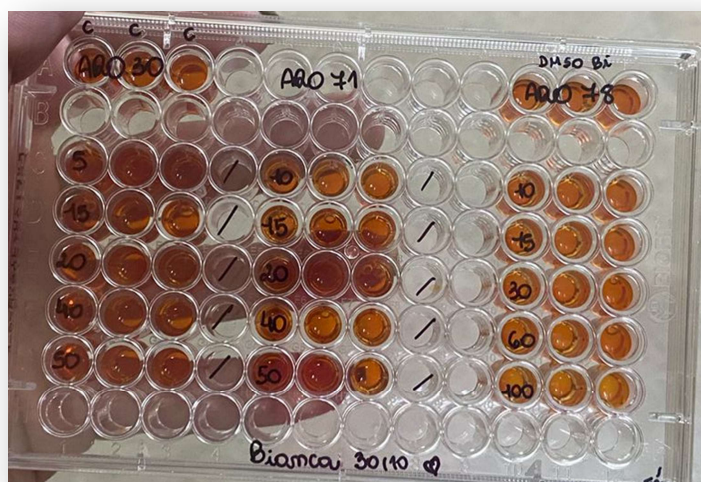


Figura 30. Fotografia do ensaio XTT de citotoxicidade em macrófagos.

5.3.1. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO030-F

Os resultados demonstram que os macrófagos tratados com o óleo essencial de ARO030-F apresentam alta porcentagem de viabilidade. Dessa maneira, pode-se considerar que nas concentrações testadas, o OE não mostrou toxicidade para as células do hospedeiro, apresentando viabilidade de aproximadamente 90% nos tratamentos com 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$, de 86 e 82%, nos tratamentos de 25 e 35 $\mu\text{g/mL}$ e apenas na concentração mais alta, de 50 $\mu\text{g/mL}$, apresentou baixa porcentagem de viabilidade, com apenas 40,5% de macrófagos viáveis (Figura 31).

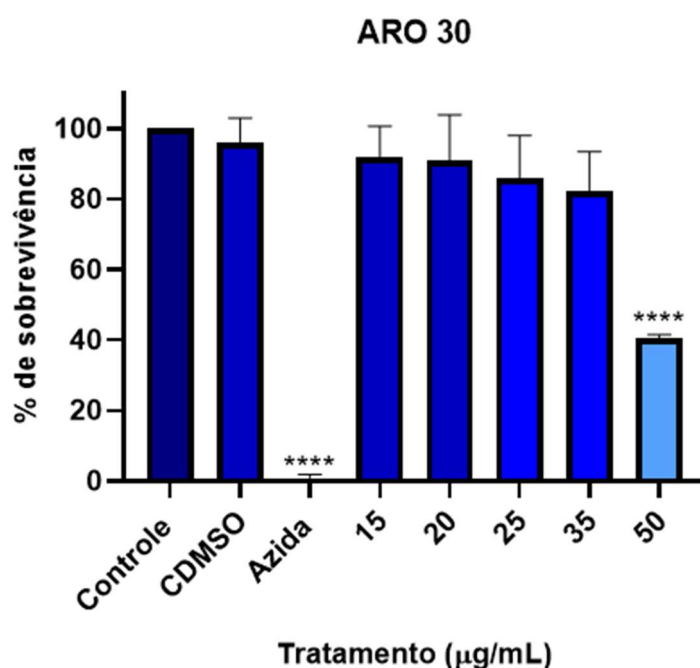


Figura 31. Análise de toxicidade do OE de ARO030-F. Macrófagos murinos de linhagem RAW 264,7, tratados ou não com diferentes concentrações do OE, com as porcentagens de sobrevivência após 48h de incubação. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,0001$) são estatisticamente significativos. Experimento realizado em triplicata.

5.3.2. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO071-F

Os resultados para ARO071-F, foram promissores, todas as concentrações testadas apresentaram alta porcentagem de viabilidade. Dessa maneira, pode-se considerar que o OE deste genótipo, não gerou toxicidade aos macrófagos. Apresentou aproximadamente 100% de viabilidade nas concentrações de 25 e 35 $\mu\text{g/mL}$, 94% em 45 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e 75% em 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 32).

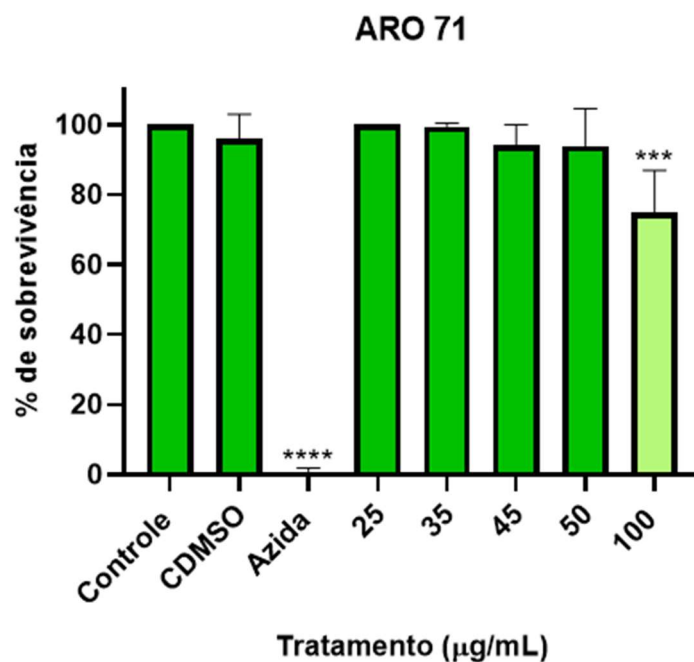


Figura 32. Análise de toxicidade do OE de ARO071-F. Macrófagos murinos de linhagem RAW 264,7, tratados ou não com diferentes concentrações do OE, com as porcentagens de sobrevivência após 48h de incubação. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,0001$) *** ($p < 0,001$) são estatisticamente significativos. Experimento realizado em triplicata.

5.3.3. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO078-F

O OE de ARO078-F também apresentou bons resultados, apesar do alto desvio padrão. A porcentagem de viabilidade celular foi de aproximadamente 90% (entre 95 e 90%) para as concentrações de 5,15 e 25 µg/mL, 79% em 50 µg/mL, 68% em 75 µg/mL e 55% em 100 µg/mL. Demonstrando baixa toxicidade às células do hospedeiro (Figura 33).

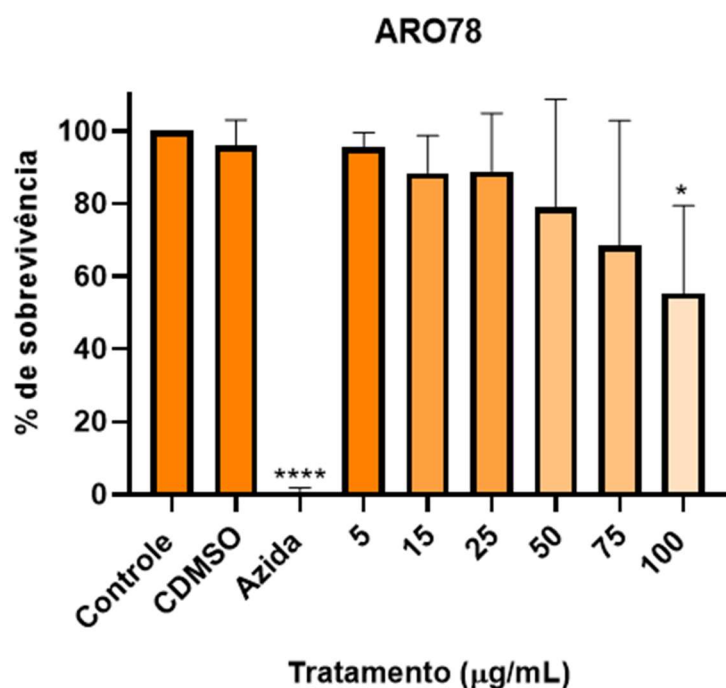


Figura 33. Análise de toxicidade do OE de ARO078-F. Macrófagos murinos de linhagem RAW 264,7, tratados ou não com diferentes concentrações do OE, com as porcentagens de sobrevivência após 48h de incubação. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,0001$) são estatisticamente significativos. Experimento realizado em triplicata.

5.3.4. Citotoxicidade do óleo essencial de ARO136-F

O OE de ARO136-F, também obteve resultados satisfatórios, apresentando aproximadamente 90% de viabilidade celular nas concentrações de 20, 30, 40 e 50 µg/mL e apenas na concentração mais alta, de 90 µg/mL, uma baixa porcentagem de células viáveis, de 29% (Figura 34).

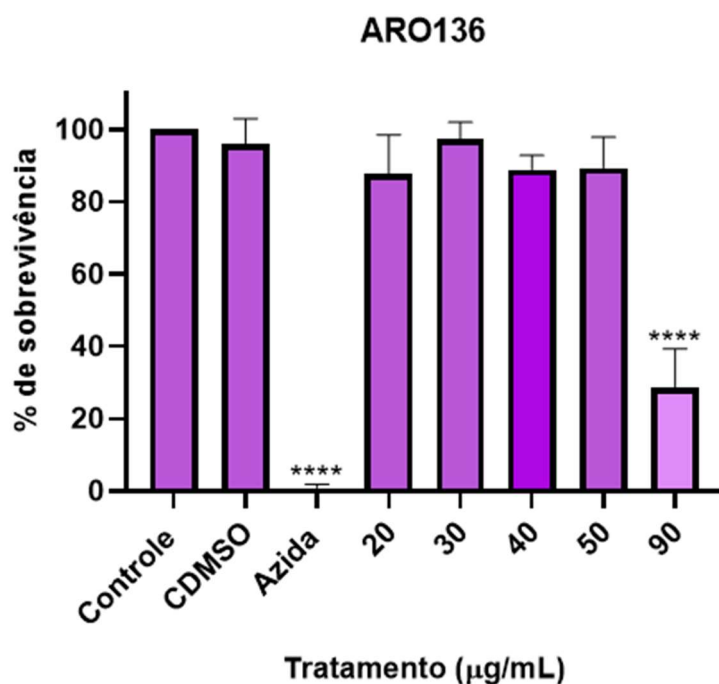


Figura 34. Análise de toxicidade do OE de ARO136-F. Macrófagos murinos de linhagem RAW 264,7, tratados ou não com diferentes concentrações do OE, com as porcentagens de sobrevivência após 48h de incubação. Os resultados expressos em **** ($p \leq 0,0001$) são estatisticamente significativos. Experimento realizado em triplicata.

5.4. Efeito dos óleos essenciais sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Em virtude dos resultados obtidos a partir dos ensaios de XTT, que mede a viabilidade celular a partir do dano mitocondrial, sobre formas promastigotas do parasito *L. infantum*, decidimos analisar o $\Delta\Psi_m$, visando obter um possível mecanismo de ação dos óleos essenciais. Para isso foram selecionados os dois genótipos que obtiveram os resultados mais satisfatórios, sendo eles o genótipo ARO030-F e ARO071-F. As formas promastigotas do parasito foram então tratadas com a concentração de 20 µg/mL, próxima aos IC₅₀ para ambos os óleos. Os parasitos após o tratamento, foram incubados por 48h. Pode-se observar que ambos os óleos, geraram algum tipo de dano na membrana mitocondrial dos parasitos. Para ARO030-F, houve uma queda significativa do potencial de membrana basal em relação ao controle (não tratado). Após adicionar o reagente FCCP houve mais uma queda no potencial de membrana, o que é esperado, visto que o FCCP é um reagente desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, então o efeito do OE somado ao efeito do FCCP apresentou uma queda ainda mais significativa que do FCCP sozinho. Após adicionar a Oligomicina, houve o aumento do potencial, o que também é esperado, pois a oligomicina inibe a ATP sintase e aumenta a captação de O₂ aumentando o potencial. Já para ARO071-F, não houve uma queda significativa do potencial

do tratado em relação ao basal, o mesmo se aplica ao FCCP e a Oligomicina, onde era esperado uma queda e um aumento, respectivamente, do potencial de membrana. Pode-se dizer que houve sim algum dano sobre a membrana mitocondrial dos parasitos, visto que houve uma leve diminuição do potencial do tratado em relação ao basal, mas não um resultado significativo, devendo ser realizado mais testes que possam explicar melhor o dano mitocondrial (Figura 35).

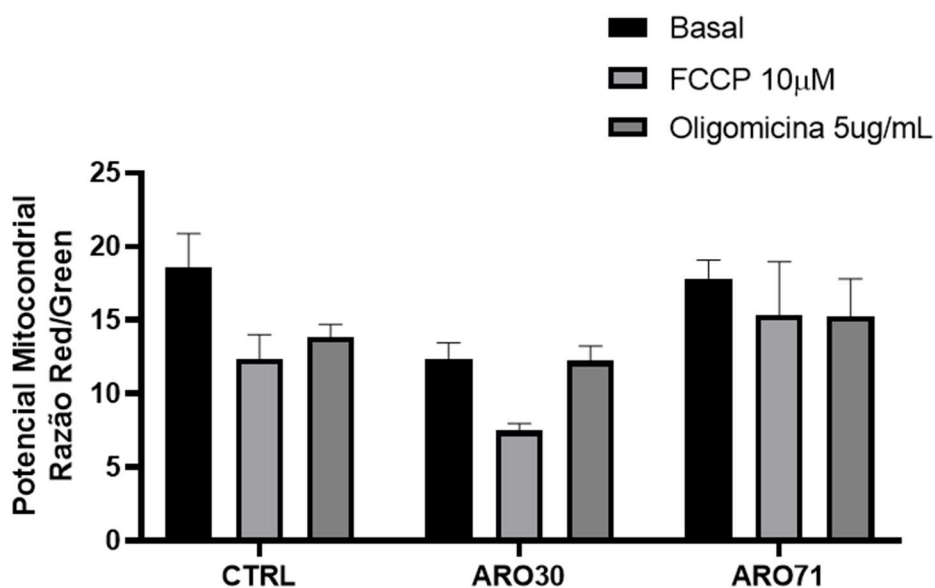


Figura 35. Efeito sobre o $\Delta\Psi m$ de formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com os OEs ARO030-F e ARO071-F na concentração de 20 μ g/mL após 48h de incubação. Valores do potencial em absorbância (nm).

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses configuram um grave problema de saúde pública e afetam milhões de pessoas em diversos países anualmente e são consideradas atualmente pela OMS, como uma das sete doenças tropicais negligenciadas mais importantes do mundo (Guerrero *et al.*, 2017). A leishmaniose visceral é endêmica em 76 países e, está descrita em pelo menos 12 do continente Americano. Dentre todos os casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil (Brasil, 2023). Os vetores da doença são insetos que se desenvolvem em regiões tropicais e subtropicais, como é o caso no Brasil, onde o clima propicia o desenvolvimento dos mesmos afetando diretamente na sua disseminação (De Lima *et al.*, 2021; Silva; Vieira, 2022).

Atualmente, por conta de diversos fatores, entre eles, o desmatamento e a urbanização de regiões que antes eram preservadas, como zonas rurais, trazem ameaças climáticas e propiciam o aumento de riscos ambientais que podem potencializar a propagação de doenças infecciosas, como as leishmanioses, trazendo um aumento no número de casos da doença nessas áreas, e também, em locais mais afastados e urbanizados, como é o que vem ocorrendo, por exemplo, no estado de São Paulo (Pigozzi; Pigozzi Filho; Medeiros, 2023; Valente; Ferreira, 2021).

A terapia disponível para o tratamento das leishmanioses, é realizada com medicamentos que geram diversos efeitos colaterais aos pacientes e apresenta um elevado custo de produção, além do aumento de relatos sobre cepas resistentes aos fármacos disponíveis. Essas evidências nos levam a acreditar na importância e urgência no desenvolvimento de tratamentos alternativos que sejam efetivos. Atualmente, já existe um número considerável de pesquisas que buscam novos componentes para entrar em substituição ou em sinergia com os tratamentos atuais para a leishmaniose. No entanto, apesar de alguns desses compostos apresentarem resultados promissores, os tratamentos utilizados ainda são os mesmos de anos atrás. Dessa maneira, o desenvolvimento de tratamentos à base de novos compostos mais eficazes contra o parasito, de menor custo e menores efeitos adversos, ainda se faz extremamente necessário, reforçando a importância na pesquisa por novas moléculas bioativas.

Os óleos essenciais se apresentam como ótimas fontes alternativas ao tratamento de diversas afecções. Sua atuação de modo geral, ainda não é esclarecida por completo, porém, segundo Bakkali *et al.* (2008), as características lipofílicas dos OEs, bem como seus constituintes químicos, estão associados a mecanismos antimicrobianos por causar uma maior permeabilidade das membranas celulares, que acarreta na perturbação da estrutura das camadas

de polissacarídeos presentes na membrana, assim como dos ácidos graxos e fosfolipídios, gerando um dano celular grave.

O presente trabalho obteve a composição química dos óleos essenciais de 4 quimiotipos da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi., pertencente à família Anacardiaceae. Os óleos essenciais dos quimiotipos ARO030-F; ARO071-F; ARO078-F e ARO136-F, tiveram, respectivamente, rendimentos de 0,44%, 0,61%, 0,26% e 0,41% (m/v), sendo considerados bons resultados, visto que dados apontam um rendimento de aproximadamente 0,1% (m/v) para o óleo essencial extraído das folhas desta espécie (Cavalcanti *et al.*, 2015). Os constituintes majoritários foram identificados, pela elucidação dos resultados obtidos por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Para o quimiotipo ARO030-F foram identificados como constituintes majoritários o α -pineno (24,79%), limoneno (17,26%) e δ -2-careno (12,18%). Para ARO071-F foram identificados como majoritários o α -pineno (36,74%), p-cimeno (36,22%) e óxido de cariofileno (5,54%). O quimiotipo ARO078-F apresentou o sabineno (20,13%), terpinen-4-ol (20,11%) e γ -terpineno (13,08%). Por último, em ARO136-F foram identificados o β -pineno (16,53%), α -terpineol (12,29%) e trans-cariofileno (12,03%). Os componentes majoritários identificados nos 4 quimiotipos estudados neste trabalho, corroboram com a composição química previamente analisada e identificada por Cavalcanti *et al.* (2015) nas folhas do óleo essencial de *S. terebinthifolius*.

A família Anacardiaceae é alvo de diversos estudos na área de quimioterapia contra diferentes patógenos, inclusive, protozoários de gênero *Leishmania*, apresentando importantes perspectivas para o desenvolvimento de tratamentos com a combinação de óleos essenciais, de espécies pertencentes à família, e os medicamentos já disponíveis (Mahmoudvand *et al.*, 2016). Segundo Mahmoudvand *et al.* (2016), o OE de *Pistacia vera* L. apresentou como componentes majoritários o limoneno (26,2%), α -pineno (18,1%), α -tujeno (9,3%) e terpinoleno (9,3%). O OE apresentou atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. tropica* em formas amastigotas intracelulares e também apresentou efeito *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *L. major*. O crescimento das formas amastigotas de *L. tropica* foi significativamente inibido pelo OE de *P. vera*, apresentando um caráter dose-dependente e uma IC₅₀ de 21,3 μ g/mL após 72h de tratamento, demonstrando uma eficácia maior do que com o tratamento com um dos fármacos de primeira escolha glucantime, que apresentou uma IC₅₀ de 44,6 μ g/mL, além de uma redução de 77% de macrófagos infectados. Como efeito *in vivo* o OE de *P. vera* conseguiu suprimir a doença causada por *L. major* em uma dose de 30 mg/mL, reduzindo o diâmetro das

lesões e a carga parasitária em camundongos, também quando comparada ao tratamento com Glucantime.

Outros estudos em relação a produtos naturais como agentes anti-protozoários, já testaram a espécie *Schinus molle* L., uma planta medicinal pertencente ao mesmo gênero e família da espécie *S. terebinthifolius* utilizada neste trabalho. Segundo Pizzolatti *et al.* (2002), o OE de *S. molle* apresentou um resultado promissor ao ser testado contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, obtendo o valor de IC₅₀ de 50 µg/mL. Braga *et al.* (2007), testaram o extrato metanólico de *S. terebinthifolius* contra duas espécies de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*, encontrando uma IC₅₀ de 55 µg/mL para *L. amazonensis* e >250 µg/mL para *L. chagasi*. O extrato apresentou também atividade antifúngica sobre *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, apresentando como valores de MIC, respectivamente para as espécies, 1,25 mg/mL e 156 µg/mL.

Uma classificação para determinar o tipo de atividade de compostos sobre os parasitos foi criada por Osorio *et al.* (2007), baseada no IC₅₀ calculado nos ensaios *in vitro*, onde: concentrações altamente ativas possuem o IC₅₀ <10 µg/mL, as ativas, o IC₅₀ entre 10-50 µg/mL, as moderadamente ativas o IC₅₀ entre 50-100 µg/mL e as não ativas (IC₅₀>100 µg/mL). Podemos dizer então que os óleos essenciais dos 4 quimiótipos analisados no trabalho, são ativos ou possuem concentração ativa, pois foram obtidos como valores de IC₅₀ para os genótipos ARO030-F, ARO071-F, ARO078-F e ARO136-F, respectivamente, 32,46; 20,52; 41,61 e 32,83 µg/mL sobre os parasitos promastigotas da espécie *L. infantum* após 48h de tratamento.

Lima & Cortez (2015) avaliaram a atividade anti-promastigota do óleo essencial dos frutos da espécie *S. terebinthifolius* sobre três espécies do gênero *Leishmania*. *Leishmania amazonensis*, que apresentou um IC₅₀ de 42,4 µg/mL, *Leishmania brasiliensis*, com IC₅₀ de 44,1 µg/mL e *Leishmania infantum*, com IC₅₀ de 53 µg/mL, demonstrando que o óleo essencial de *S. terebinthifolius* possui uma atividade leishmanicida promissora sobre as 3 espécies. Tais resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, onde os óleos essenciais dos 4 quimiotipos testados, são mais eficazes contra *L. infantum*, pelo fato de terem apresentado valores de IC₅₀ menores em relação aos descritos em literatura sobre esta espécie de aroeira.

Além disso a citotoxicidade dos óleos essenciais do 4 quimiotipos utilizados, foram avaliadas e nenhum dos OEs apresentou toxicidade nas concentrações mais baixas. O quimiotipo ARO030-F apresentou uma baixa toxicidade sobre os macrófagos quando

comparados ao controle e ao controle positivo (Azida), onde pode-se observar uma porcentagem de viabilidade celular alta, entre 85 a 90%, nas concentrações de 15; 20; 25 e 35 µg/mL. Para ARO071-F os resultados foram ainda mais satisfatórios, visto que todas as concentrações apresentaram uma alta porcentagem de viabilidade celular, quando comparadas ao controle e azida, onde nas concentrações de 25; 35; 45 e 50 µg/mL a porcentagem de sobrevivência dos macrófagos foi acima de 93% e na concentração, mais alta, de 100 µg/mL teve 74,8% de viabilidade celular, apresentando uma baixa toxicidade. ARO078-F também apresentou bons resultados. A porcentagem de sobrevivência dos macrófagos foi acima de 50% para todas as concentrações testadas. ARO136-F, assim como ARO30, também apresentou baixa toxicidade nas menores concentrações testadas, por volta de 90%, e somente na concentração de 90 µg/mL apresentou uma baixa viabilidade celular, de 28,6%, podendo ser considerado tóxico nessa concentração.

Myracrodruon urundeuva (aroeira-do-sertão), também pertencente à família Anacardiaceae, no trabalho de Higa *et al.* (2019), que avaliou a citotoxicidade de seu extrato glicólico, sobre células de macrófagos da linhagem RAW 264,7, demonstrou que a espécie obteve porcentagens de viabilidade celular acima de 50% em todas as concentrações analisadas. Na concentração de 25 mg/mL a viabilidade foi de 71,8%. Apenas as concentrações mais elevadas, entre 50 e 200 mg/mL obtiveram porcentagens menores ($56,74 \pm 8,89\%$ e $57,41 \pm 9,95\%$). Tais resultados corroboram com os resultados de toxicidade obtidos em nosso trabalho.

Segundo Estevão *et al.* (2015) e (2013), o extrato de *S. terebinthifolius* possui um papel importante no processo de cicatrização de feridas, a partir de estudos *in vivo* em pele de ratos. O processo de cicatrização é acelerado por conta do aumento do número de fibroblastos, fibras colágenas e mastócitos. Isso nos faz acreditar que o futuro desenvolvimento, de uma formulação tópica para os casos de leishmaniose pós-calazar, seria interessante, visto que esta espécie vegetal, possui também atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, mais a efetividade na eliminação do parasito, o que aumentaria as chances de cura e cicatrização das lesões mais rapidamente.

Diante de todos os dados obtidos, optamos por analisar, também, o potencial de membrana mitocondrial das formas promastigotas de *L. infantum*, tratadas com óleos essenciais pertencentes aos quimiotipos ARO030-F e ARO071-F, por terem apresentado melhores resultados, no geral. Os parasitos foram tratados então na concentração de 20 µg/mL, próxima do valor de IC₅₀ dos quimiotipos (IC₅₀ARO030-F= 32,46 µg/mL; IC₅₀ARO071-F= 20,52

µg/mL) durante 48h. Foi observado que somente o OE de ARO030-F, foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle não tratado. No entanto, pode-se observar que em ARO071-F houve uma pequena queda do potencial basal. Essa divergência nos resultados entre os OEs, pode indicar que o quimiótipo, que não apresentou ação sobre o potencial de membrana mitocondrial, pode ter sua atividade biológica associada a outro tipo de mecanismo de ação intracelular, como a produção de óxido nítrico (NO), um importante mecanismo de ação de eliminação de patógenos, promovido pelos macrófagos, onde um aumento nessa produção, poderia justificar a atividade leishmanicida do OE de ARO071-F. No entanto, esse estudo deve ser realizado, para ter certeza se esse seria um possível mecanismo de ação.

Ainda que não possamos afirmar o mecanismo de ação dos óleos essenciais testados, os achados em literatura em conjunto com os resultados de viabilidade de formas promastigotas, nos faz acreditar que assim como em *Trypanosoma cruzi*, a membrana mitocondrial foi afetada pelo óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, e em *Leishmania amazonensis* pelo óleo essencial de *Copaifera martii* (Santin *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011), o óleo essencial de *S. terebinthifolius* possa agir sobre a membrana mitocondrial de *Leishmania*, aumentando sua permeabilidade, causando a sua despolarização. Somado a isso o levantamento bibliográfico feito por Hellmann *et al.* (2018), também demonstra alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, interferindo no potencial de membrana e levando ao estresse oxidativo como mecanismo de ação da atividade leishmanicida, de óleos essenciais de diferente espécies vegetais.

7. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais apresentaram atividade anti-*Leishmania* sobre formas promastigotas de *L. infantum*, e baixa toxicidade sendo o óleo essencial do genótipo ARO071-F o mais eficaz. Nos resultados obtidos através dos testes de viabilidade celular, pode-se observar que os óleos essenciais de todos os genótipos testados, apresentaram baixa toxicidade frente as células de macrófagos de linhagem RAW 264,7, sendo ARO071-F o quimiotipo que se destaca, pois mesmo nas concentrações mais elevadas apresentou alta porcentagem de viabilidade celular.

Os óleos essenciais de ARO030-F e ARO071-F, testados sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de *Leishmania infantum*, apresentaram bons resultados, sendo o OE de ARO030-F o que promoveu uma maior ação sobre o potencial de membrana. No entanto, o OE de ARO071-F, não apresentou uma alteração significativa do potencial, mas, apesar da divergência nos resultados, pode-se dizer que ambos geraram algum dano sobre a membrana mitocondrial dos parasitos. É necessário repetir os experimentos de $\Delta\Psi_m$, para uma melhor compreensão destes resultados e afirmar um possível mecanismo de ação dos óleos essenciais.

Pode-se concluir então que os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios onde as composições químicas dos óleos essenciais identificadas no estudo, corroboram com os dados previamente estabelecidos na literatura sobre a espécie vegetal *Schinus terebinthifolius* Raddi. Todos os genótipos testados (ARO030-F, ARO071-F, ARO078-F e ARO136-F), apresentaram atividade leishmanicida e baixa toxicidade e dentre os genótipos que se destacaram, ARO030-F apresentou algum dano mitocondrial aos parasitos. Porém, mais estudos devem ser realizados para a adequação destes compostos, em termos de diminuição ainda mais da toxicidade, visando menores ou ausentes efeitos adversos, e estabelecimento de um mecanismo de ação. Contudo, os resultados aqui explanados apontam uma possibilidade promissora para o uso do óleo essencial de *S. terebinthifolius* como quimioterápico no tratamento contra *L. infantum* e dessa maneira, contra as leishmanioses viscerais e pós-calazar.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✱ Realizar os experimentos de infecção, para analisar o efeito dos óleos essenciais sobre as formas amastigotas intracelulares do parasito;
- ✱ Testar a viabilidade celular também pelo método de coloração com Azul de Tripan, confirmando os resultados obtidos pelo método XTT;
- ✱ Realizar a triplicata dos ensaios de potencial de membrana mitocondrial, para uma melhor compreensão dos resultados e confirmação do mecanismo de ação;
- ✱ Realizar análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de promastigotas tratados com os óleos essenciais para avaliar organelas potencialmente afetadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. **Gruver, TX USA: Texensis Publishing**, 2017.
- AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. 2013. Leishmaniose. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>. Acesso em: 8 de dez. 2023.
- AGUIAR, Paulo Fernando; RODRIGUES, Raíssa Katherine. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 192-204, 2017.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and veterinary entomology**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ASSIS, Juliana de et al. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 17-25, 2010.
- AN, Silveira Maia-Elkhoury et al. Organización Panamericana de la Salud: Leishmaniasis: Informe Epidemiológico en las Américas. 2017.
- ANDRÉ, Weibson Paz Pinheiro et al. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 14-14, 2018.
- AZEVEDO, C. F.; QUIRINO, Z. G. M.; BRUNO, R. L. A. Estudo farmacobotânico de partes aéreas vegetativas de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, p. 26-35, 2015.
- BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol.* 46:446–475
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. W.B. Saunders, 1 nov. 2022.
- BARRATT, Gillian; BRETAGNE, Stéphane. Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. **International journal of nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 301-313, 2007.
- BASTOS, Mônica Macedo et al. Quimioterapia anti-*leishmania*: uma revisão da literatura. **Revista virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016.
- BATES, P. A.; ROGERS, Matthew E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.
- BATES, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BATISTA, LILIAN C. DE SO et al. In vitro efficacy of essential oils and extracts of *Schinus molle* L. against *Ctenocephalides felis*. **Parasitology**, v. 143, n. 5, p. 627-638, 2016.

BATISTA, Francisca Miriane de Araújo et al. Perfil epidemiológico e tendência temporal da leishmaniose visceral: Piauí, Brasil, 2008 a 2018. **Cadernos de saúde pública**, v. 37, 2021.

BRAGA, Fernanda G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretária de Vigilância Sanitária. Resolução 104/99, de 26/04/1999. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 14/05/99, 1999.

Brasil, Ministério da Saúde. (2018). Manejo Terapêutico de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Santa Catarina, 13 p. Disponível em <<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/ManualLTAvisualiza%C3%A7%C3%A3o.pdf>>.

Brasil, Ministério da Saúde. (2023). Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 15 de fev de 2024.

BRAY, Patrick G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

BRENNAN, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Enantioselective perception of chiral odorants. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 1-43, 2003.

BRUSCHI, Fabrizio et al. (Ed.). The leishmaniasis: old neglected tropical diseases. Cham, Switzerland: Springer, 2018.

CAMARGO, Luis Marcelo Aranha; BARCINSKI, Marcello André. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 158-169, 2013.

CATTAND, Pierre et al. Tropical diseases lacking adequate control measures: dengue, leishmaniasis, and African trypanosomiasis. **Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition**, 2006.

CHANG, K. P.; FONG, Dunne. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. In: **Ciba Foundation Symposium 99-Cytopathology of Parasitic Disease**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1983. p. 113-137.

Conheça as principais doenças tropicais negligenciadas. Instituto Oswaldo Cruz-IOC, 2019. Disponível em: <Conheça as principais doenças tropicais negligenciadas | Instituto Oswaldo Cruz (fiocruz.br)>. Acesso em: 5 de dez. de 2023.

Corman HN, McNamara CW, Bakowski MA. Descoberta de Drogas para Leishmaniose Tegumentar: Uma Revisão dos Desenvolvimentos nos Últimos 15 Anos. **Microorganismos**. 2023.

Costa, Dorcas Lamounier; Costa, Carlos Henrique Nery. Leishmaniose Visceral. **Leishmanioses do Continente Americano**. v. 22, p. 512, 2014.

COSTA, Jackson Mauricio Lopes et al. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. 2005.

CHAGAS, Evandro et al. Leishmaniose Visceral Americana (Nova entidade mórbida do homem na América do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, p. 321-389, 1937.

CROFT, Simon L.; COOMBS, Graham H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CUNHA, Aristides Marques da; CHAGAS, Evandro. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. **Leishmania chagasi**, p. 3-9, 1937.

CUPOLILLO, Elisa; BOITÉ, Mariana Côrtes; PORROZZI, Renato. Considerações sobre a taxonomia do gênero *leishmania*. **Leishmanioses do continente Americano**, v. 22, p. 512, 2014.

DA SILVA, Célia Eliane de Lara et al. Effect of essential oils on *Leishmania amazonensis*: A systematic review. **Parasitology**, v. 147, n. 13, p. 1392-1407, 2020.

DA SILVA, Hisolda Firmo; DOS SANTOS OLIVEIRA, Stephanie Anine; DE SOUZA, Pâmella Grazielle Vital Dias. Avaliação da atividade antimicrobiana da planta *hyptis pectinata*: Uma revisão da literatura sistemática. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e42310717066-e42310717066, 2021.

DA FONSECA JÚNIOR, José Duarte et al. Leishmaniose visceral canina: Revisão. **Pubvet**, v. 15, p. 168, 2020.

DANTAS-TORRES, Filipe. Canine leishmaniasis in south america. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2009.

DE CARVALHO, Paulo B.; FERREIRA, Elizabeth I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 599-618, 2001.

DE LIMA, Ricardo Gois et al. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no Brasil, no período de 2010 a 2019. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 4, p. e6931-e6931, 2021.

DE MENESES, Antônia Poliane et al. Atividade anti-helmíntica *in vitro* do extrato aquoso de *Hyptis suaveolens* sobre nematoides gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 15, n. 4, p. 8, 2021.

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DNDi América Latina. LEISHMANIOSES- Fazendo parcerias para uma nova geração de tratamentos. Relatório anual, 2019. Disponível

em:<<https://dndi.org/wpcontent/uploads/2020/12/DNDi-Factsheet-Leishmanioses-2019-PT.pdf>> Acesso em: 10 de dez. 2023

DOS SANTOS, Adriana Oliveira et al. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145-151, 2011.

DOS SANTOS CAVALCANTI, Adriano et al. Volatiles composition and extraction kinetics from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* leaves and fruit. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 356-362, 2015.

DOS SANTOS, João Vitor Barbosa et al. In vitro activity of essential oils against adult and immature stages of *Ctenocephalides felis*. **Parasitology**, v. 147, n. 3, p. 340-347, 2020.

DORLO, Thomas PC et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

ESTEVÃO, Lígia Reis Moura et al. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 28, p. 202-209, 2013.

ESTEVÃO, Lígia Reis Moura et al. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Acta cirúrgica brasileira**, v. 30, p. 289-295, 2015.

FAMPA, Patrícia et al. Efeitos anti-*Leishmania* de óleos voláteis e seus isolados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 561-578, 2021.

Fangueiro, J. F., Marques, I. R., Severino, P., Santana, M. H. A., & Souto, E. B. (2012). Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**. 35, 1848-1853.

FERNANDES, Monique Kerly Maia et al. *Leishmania* Game: tecnologia educativa para prevenção/ensino de leishmaniose visceral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 42, n. 1, p. 91-102, 2021.

FEUEREISEN, Michelle M. et al. Characterization of phenolic compounds in Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) exocarp. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 26, p. 6219-6226, 2014.

FORTES, Elinor. Parasitologia veterinária. In: **Parasitologia Veterinária**. 2004. p. 607-607.

FREITAS, Adriana. Leishmaniose visceral canina: Revisão. **Pubvet**, v. 16, n. 10, 2022.

GREENE, Craig E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2015.

Griess Reagent Kit for Nitrate Determination MP 07921 Griess Reagent Kit for Nitrite Determination (G-7921). Disponível em: <www.probes.com>.

GRADONI, L.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOKNI, M. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region. 2017

HELLMANN, Mardjori Andrade; MARCHESAN, Eli Danieli; VELASQUEZ, Leonardo Garcia. Leishmaniose e plantas medicinais: Uma revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, n. 3, 2018.

Hendrickx, S., Caljon, G., & Maes, L. (2019). Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. *Parasitology Research*.

HIGA, Karen Cristiane et al. CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS GLICÓLICOS DE *Cynara scolymus* (ALCACHOFRA), *Myracrodruon urundeuva* (AROEIRA-DO-SERTÃO) E *Camellia sinensis* (CHÁ VERDE). *Revista Univap*, v. 25, n. 48, p. 77-91, 2019.

IWU, M. M.; JACKSON, J. E.; SCHUSTER, B. G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitology today**, v. 10, n. 2, p. 65-68, 1994.

IZUMI, Erika et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 809-823, 2011.

JERICÓ, Márcia Marques; ANDRADE NETO, João Pedro de; KOGIKA, Márcia Mery. Tratado de medicina interna de cães e gatos. 2015.

KAMHWAI, S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*. v. 22, n. 6, p. 439-445.

KAYSER, O., KIDERLEN, A.F., CROFT, S.I., 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res.* 90, S55–S62

KLEIN, Traudi et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 30, n. 3, 2009.

KRAUSPENHAR, Cristina et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 907-910, 2007.

KRATZ, V. D. D. Vo(z), n. 3, 1963.

Lima, S. G. P., & Cortez, D. A. G. (2015). Avaliação da atividade anti-*leishmania* e antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (anacardiaceae). [Dissertação de Mestrado]. Centro Universitário Cesumar.

LIRA PIMENTA, B. et al. Avaliação da atividade farmacoterapêutica no tratamento de pacientes com Leishmaniose visceral. *Amazônia Science and Health*, v. 11, n. 3, 2023.

MAHMOUDVAND, Hossein et al. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of *Pistacia vera* essential oil. **Planta medica**, v. 82, n. 04, p. 279-284, 2016.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MATHERS, Colin D. et al. Global burden of disease in young people aged 10–24 years—Authors' reply. **The Lancet**, v. 379, n. 9810, p. 28, 2012.

McGwire, B.S., & Satoskar, A.R. (2014). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med.* 107, .7–14.

MENDONÇA-FILHO, Ricardo R. et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn.(Palmae). **Research in Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 136-143, 2004.

MERGEN, Maria Eduarda; SOUZA, Marília Mascarenhas. Leishmaniose Visceral canina, métodos diagnósticos e tratamento na atualidade—Revisão de literatura. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 6, n. 13, p. 1024-1036, 2023.

MS; SVS. Doenças tropicais negligenciadas: 30 de janeiro-Dia mundial de combate às doenças tropicais negligenciadas. **Boletim Epidemiológico**, 2021.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 366: 1561-77.

Murray, H.W. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis in 2010: direction from Bihar state, India. *Future Microbiol.* 5, 1301–1303.

MURPHY, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway*. 8 edição. Artmed Editora, 2014.

NEVES, EJM et al. Comportamento da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.) em condições extremas de estresse hídrico.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. 2000. Biodiversidade, aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões C.M.O. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS. 11-24p.

OLIVEIRA, Luiz Filipe Gomes et al. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. 2013.

OSORIO, Edison et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.

Pessôa, S.M. (1982) *Parasitologia Médica*. eds (Guanabara Koogan) pp 250.

PIGOZZI, Rafael Medeiros; PIGOZZI FILHO, Izauro; MEDEIROS, Mauro Osvaldo. FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE CASOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA ASSOCIADA AO RITMO DE CRESCIMENTO URBANO DO MUNICÍPIO DE MARILIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Biodiversidade**, v. 22, n. 2, 2023.

PIZZOLATTI, M.G., KOGA, A.H., GRISARD, E.C., STEINDEL, M., 2002. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species. *Phytomedicine* 9,422–426.

POLICY CURES RESEARCH. G-FINDER | 2023 - NEGLECTED DISEASE RESEARCH AND DEVELOPMENT: THE HIGHER COST OF LOWER FUNDING. 2023. Disponível em: <2023-Neglected-Disease-G-FINDER-report.pdf (amazonaws.com)> Acesso em: 8 de dez. de 2023.

Rabelo, J.M.M.M. (1999) Flebótomos vetores das leishmanioses. Manual para técnicos e profissionais de saúde. Ministério da Saúde.

RÊGO, F. D. 2013. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. 28 fev 2013. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Doenças Infecciosas e Parasitárias). Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais.

REHMAN, Rafia et al. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117-160, 2016.

RIOS, Rejaine Martins. Avaliação do potencial bioativo de plantas medicinais do gênero *Hyptis* oriundas do cerrado brasileiro. 2020.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 514-535, 2005.

RORATO, Daniele G. et al. Tolerance and resilience of forest species to frost in restoration planting in southern Brazil. **Restoration Ecology**, v. 26, n. 3, p. 537-542, 2018.

SAEIDNIA, S.; GOHARI, A. R.. 2012. Trypanocidal monoterpenes: lead compounds to design future trypanocidal drugs. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 37, 173–189.

SALZO, P. S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso clínico, São Paulo**, ano, v. 11, p. 30-34, 2008.

SANTIAGO, Alexandre Silva; PITA, Samuel Silva da Rocha; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, p. 1-11, 2021.

SANTIN, Marta Regina et al. Atividade in vitro do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e seu principal componente (cítal) sobre *Leishmania amazonensis*. *Pesquisa em parasitologia*, v. 105, p. 1489-1496, 2009.

SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B.P., VEIGA-JUNIOR, V.F.V., LIMA, M.M.S., NAKAMURA, C.V. 2011. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Experimental Parasitology* 129, 154–161

SANTOS, Crisllany Tenório Costa et al. Comparação da atividade entre óleos essenciais de frutos verdes e maduros de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes. **Diversitas Journal**, v. 4, n. 1, p. 285-291, 2019.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARES, L. G. L.; MENDONÇA, L. Z.; SOARES, M. J. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgare* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100, 783–790.

SEVERINO, Patrícia et al. A NOTECNOLOGIA APLICADA AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 7, n. 2, p. 58-58, 2022.

SILVA, Ary G. et al. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). **Parasites & vectors**, v. 3, p. 1-7, 2010.

SILVA, Cecília Myrelle De Carvalho; VIEIRA, Tairo Ferreira. ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS DE CHAGAS, LEISHMANIOSE E ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL DE 2010 A 2020. **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 2, n. 1, 2022.

Sundar, S., & Chatterjee, M. (2006). Visceral leishmaniasis current therapeutic modalities. *The Indian Journal of Medical Research*.v. 123, p. 345

Sundar, S., & Murray, H. W. (2005). Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bulletin of the World Health Organization*. 83, 394.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. *Helmintologia veterinária. Parasitologia veterinária. 4th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan*, p. 65-478, 2017.

TILLEY, Larry Patrick; SMITH, Francis WK; FRANCIS, W. K. *Consulta veterinária em 5 minutos: espécies canina e felina. Terceira edição, Ed. Manole*, p. 920-921, 2008.

TORRES-GUERRERO. E, et al. Leishmaniasis: a review [version 1; referees: 2 approved] *F1000Research*, 2017.

ULIANA, Michele Pereira et al. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 235-240, 2016.

VALENTE, Danilo Carneiro; FERREIRA, Marcos César. Análise geoespacial da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo: uma contribuição à geografia da saúde. **Estudos Geográficos: Revista Eletrônica de Geografia**, v. 19, n. 3, p. 268-285, 2021.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A. & DE SOUZA, W. 2002. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*. v. 8, 297-318.

VEERESHAM, Ciddi. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 3, n. 4, p. 200-201, 2012.

VUNDA, S. L. L.; SAUTER, I. P.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; BORDIGNON, S. A. L.; ROTT, M. B.; APEL, M. A.; VON POSER, G. L. 2012. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitol. Res.* 111, 961–966

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 5 de dez. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO. Expert Committee of the control of leishmaniasis. Genebra: WHO; 2010. Disponível em:http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf:http://whqlibdoc.who.int/tr/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em: 5 de dez. de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Doenças transmitidas por vetores. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 5 de dez. 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva. 12p