



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

REGIONAL JATAÍ

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Siparuna guianensis* E DO α -Bisabolol ISOLADO DE *Siparuna guianensis* CONTRA *Leishmania amazonensis*

ANA PAULA LOPES LIMA

JATAÍ - GO

2018

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

1 2. Identificação da Tese ou Dissertação
2

Nome completo do autor: ANA PAULA LOPES LIMA

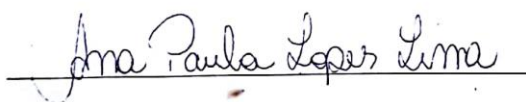
Título do trabalho:

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Siparuna guianensis* E DO α -Bisabolol ISOLADO DE *Siparuna guianensis* CONTRA *Leishmania amazonensis*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Data: 09 / 07 / 2018


Profª Drª Rosângela Maria Rodrigues
Orientadora e Presidente da banca de defesa

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

ANA PAULA LOPES LIMA

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Siparuna guianensis* E DO α -Bisabolol ISOLADO DE *Siparuna guianensis* CONTRA *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como requisito para obtenção do título de Mestre, no Programa de Pós-Graduação de Ciências Aplicadas a Saúde da Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosângela Maria Rodrigues.

JATAÍ - GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lopes Lima, Ana Paula

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Siparuna guianensis* E DO α -Bisabolol ISOLADO DE *Siparuna guianensis* CONTRA *Leishmania amazonensis* [manuscrito] / Ana Paula Lopes Lima. - 2018.

LXIII, 63 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Rosângela Maria Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Jataí, 2018.

Bibliografia.

Inclui siglas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Viabilidade. 3. *Siparuna guianensis*. 4. Alfa bisabolol. I. Rodrigues, Rosângela Maria, orient. II. Título.

CDU 576.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ

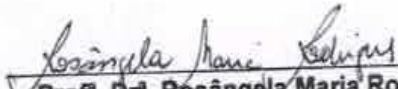
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
Rod. BR 364, km 192, n. 3800, Setor Industrial
75.801.615 - Jataí/GO - Brasil

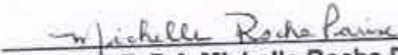
ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte e dois dias do mês de Junho do ano de dois mil e dezoito às 14:00 horas no Auditório do Prédio da Pós-Graduação, Unidade Jatobá, Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, intitulada "**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Siparuna guianensis* E DO α -Bisabolol ISOLADO DE *Siparuna guianensis* CONTRA *Leishmania amazonensis***", de autoria da candidata: **ANA PAULA LOPES LIMA**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores: Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Maria Rodrigues (Presidente), Prof^ª. Dr^ª. Michelle Rocha Parise (Membro Interno) e Prof^ª. Dr^ª. Heliana Batista de Oliveira (Membro Externo). Foi concedido ao mestrando, um prazo máximo de 30 dias a partir da data de defesa para efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e entregar o trabalho em redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, os membros da banca consideraram a discente: (X) aprovada () reprovada

Banca Examinadora


Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Maria Rodrigues
Presidente - UFG


Prof^ª. Dr^ª. Michelle Rocha Parise
Membro Interno - UFG


Prof^ª. Dr^ª. Heliana Batista de Oliveira
Membro Externo

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a graça das graças é não desistir nunca"

Por: Dom Hélder Câmara

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de todos, pois quando pensei em desistir Ele me mostrou que não estou só e que mesmo que eu não veja esperança no caminho, seu amor aquecerá sempre meu coração.

Agradeço a Ele por minha família, minha mãe por nunca ter medido esforços para me proporcionar o estudo que ela nunca teve, cada sacrifício feito por ela para que eu seguisse em frente nunca serão esquecidos! Por você mamãe: sou mestre!

Não somos nada nessa vida sem amor, e é ao seu amor que agradeço Vinícius, meu esposo, amigo e companheiro nessa jornada! Sua presença do meu lado em cada etapa me trouxe fôlego, me trouxe calma, me fez acreditar que sou capaz e que você sempre estará ao meu lado nas vitórias e derrotas, como é bom ter um apoio como o seu, como é bom ter você aqui comigo para comemorar esse momento que também é seu!

À minha orientadora Prof^{fa} Dr^a Rosângela Maria Rodrigues, obrigada por me aceitar, por acreditar que eu conseguiria atingir nossos objetivos. Sua caminhada nestes anos de mestrado não foi nada fácil, te admiro muito por sua capacidade de continuar em frente, de ver o lado bom nas horas ruins. Você e minha mãe (duas Rosângelas!) são as mulheres mais fortes que conheço e eu almejo muito ser assim, forte, otimista e cheia de fé como vocês! Simplesmente obrigada por tudo!

Um agradecimento mais que especial à Dr^a Thaíse Lara Teixeira, muito obrigada com todo meu coração por me ajudar tanto! Graças a Deus por ter colocado você no meu caminho, sua ajuda, seus ensinamentos foram essenciais. Você é uma excelente profissional e eu admiro muito seu conhecimento e tudo que você faz, espero que a vida lhe retribua em dobro tudo que você fez por mim nesses anos.

Agradeço aos professores Dr. Claudio Vieira Silva por me receber em sua equipe no laboratório de Tripassonomatídeos da UFU, professora Dr^a Liliane Nebo e professor Dr. Claudinei Silva por ceder gentilmente os compostos utilizados.

A todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos neste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

A leishmaniose é uma doença transmitida por insetos do tipo flebotomíneos infectados por protozoários do gênero *Leishmania*, cuja forma cutânea é a mais comum com 50 a 75% de casos novos relatados. É uma doença não contagiosa, de evolução crônica, considerada estigmatizante e negligenciada, afetando cerca de 500.000 pessoas no mundo. A maioria das drogas utilizadas no tratamento farmacológico é potencialmente tóxica e requer hospitalização do paciente para sua administração, o que eleva os custos e desestimula a população carente a aderir ao tratamento. Neste cenário, os medicamentos fitoterápicos inserem-se como uma alternativa devido a sua eficácia comprovada e por causarem menos efeitos indesejáveis. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial leishmanicida e a viabilidade celular *in vitro* do óleo essencial de *Siparuna guianensis* (SG) e do α -Bisabolol (AB) isolado de *S. guianensis* sobre células Vero e promastigotas de *Leishmania amazonensis*, utilizando o método colorimétrico sal de resazurina (Alamar Blue®) como indicador de metabolismo celular. Foi realizado também ensaio de invasão celular com os parasitos previamente tratados com o IC₅₀ obtido para AB e SG obtido no teste de viabilidade celular, afim de testar o efeito dos compostos na capacidade de infecção dos parasitos. Os resultados foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.01. Para análise do IC₅₀ foi utilizado os testes de regressão não linear. Os compostos testados demonstraram viabilidade sobre células basais Vero e atividade leishmanicida: SG IC₅₀ 131,5 µg/mL e 2,59 µg/mL respectivamente. Para α -Bisabolol as concentrações obtidas foram 103,8 µg/mL e 6,394 µg/mL e para SG foram 94,61 µg/mL e 7,84 µg/mL, respectivamente. Este é o primeiro relato de um ensaio de invasão celular feito com *S. guianensis* e α -Bisabolol isolado, no qual pode ser observado a inibição de 98,4% de capacidade infectiva de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com SG na concentração de 131,5 µg/mL e inibição de 95,4 % da capacidade infectiva do mesmo parasito tratado com AB na concentração de 95,4 µg/mL, resultados estes que se aproximam do valor obtido pelo medicamento convencional em um ensaio semelhante *in vitro*, o que sugere um refinamento da técnica e ensaios *in vivo* para determinar a ação da *S. guianensis* e do α -Bisabolol a partir das concentrações obtidas nesta pesquisa.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania amazonensis*; Viabilidade; *S. guianensis*; α -bisabolol.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease transmitted by protozoan-infected sandflies of the genus *Leishmania*, whose cutaneous form is the most common with 50 to 75% of new cases reported. It is a non-contagious disease of chronic evolution, considered stigmatizing and neglected, affecting about 500,000 people in the world. Most drugs used in pharmacological treatment are potentially toxic and require patient hospitalization for administration, which raises costs and discourages the needy population from adhering to treatment. In this scenario, herbal medicines are inserted as an alternative because of their proven efficacy and because they cause fewer undesirable effects. The objective of the present study was to evaluate the leishmanicidal potential and the in vitro cell viability of *Siparuna guianensis* (SG) and α -Bisabolol (AB) isolated essential oils of *Siparuna guianensis* (SG) on Vero cells and *Leishmania amazonensis* promastigotes using the method colorimetric resazurin salt (Alamar Blue®) as an indicator of cellular metabolism. Cell invasion was also performed with the parasites previously treated with the IC₅₀ obtained for AB and SG obtained in the cell viability test, in order to test the effect of the compounds on the infection capacity of the parasites. The results were analyzed using the program GraphPad Prism version 6.01. For analysis of the IC₅₀, the non-linear regression tests were used. The tested compounds demonstrated viability on Vero basal cells and leishmanicidal activity: SG IC₅₀ 131.5 μ g/mL and 2.59 μ g/mL respectively. For α -Bisabolol the concentrations obtained were 103.8 μ g/mL and 6.394 μ g/mL and for SG were 94.61 μ g/mL and 7.84 μ g/mL, respectively. This is the first report of a cell invasion assay made with *S. guianensis* and α -Bisabolol alone, in which inhibition of 98.4% infective capacity of *L. amazonensis* promastigotes treated with SG at 131,5 μ g/mL and inhibition of 95.4% of the infective capacity of the same AB-treated parasite at a concentration of 95.4 μ g/mL, which are close to the value obtained by the conventional drug in a similar in vitro assay. which suggests a refinement of the technique and in vivo assays to determine the action of *S. guianensis* and α -Bisabolol from the concentrations obtained in this research.

KEYWORDS: *Leishmania amazonensis*; Viability; *S. guianensis*; α -bisabolol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	α -Bisabolol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Brain Heart Infusion
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dr	Doutor
Dra	Doutora
EV	Via Endovenosa
GO	Goiás
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IC	Concentração inibitória máxima
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IM	Via Intramuscular
L	Leishmania
LASA	Laboratório de Análises e Síntese de Agroquímicos
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCDf	Leishmaniose cutânea difusa
LCM	Leishmaniose cutaneomucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
LVM	Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	Reação em cadeia da polimerase
S	Siparuna
Sb	Antimônio pentavalente
Sb⁺⁵	Antimônio pentavalente
SG	Siparuna guianensis
T	Tripanossoma
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UFV	Universidade Federal de Viçosa
V	Viannia

LISTA DE SIMBOLOS

<	Menor
±	Mais ou menos
µg	Microgramas
µm	Micrômetros
cm²	Centímetros quadrados
CO₂	Gás carbônico
G	Gramas
Kg	Kilos
M	Metros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
Q e T	Ondas do eletrocardiograma
R²	R quadrado
SD	Desvio Padrão
A	Alfa
B	Beta
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade de SG e AB sobre células Vero.....40

Tabela 2. Atividade leishmanicida de SG e AB sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*.....43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ilustração das formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i>	12
FIGURA 2: Ciclo biológico da leishmaniose.....	14
FIGURA 3: Lesões de leishmaniose cutânea.....	15
FIGURA 4: Lesão de leishmaniose mucocutânea.....	16
FIGURA 5: Lesões de leishmaniose cutâneo disseminada.....	17
FIGURA 6: Lesões de leishmaniose cutâneo difusa.....	18
FIGURA 7: Países das Américas endêmicos para leishmaniose e população em risco.....	19
FIGURA 8: Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil no ano de 2015.....	20
FIGURA 9: Características da planta <i>Siparuna guianensis</i>	29
FIGURA 10: Fórmula química do α -Bisabolol.....	31
FIGURA 11: Viabilidade das células Vero frente ao óleo de <i>S. guianensis</i>	39
FIGURA 12: Viabilidade de células Vero frente a diferentes concentrações do óleo de α -Bisabolol.....	40
FIGURA 13: Curva de concentração-resposta para SG e AB.....	41
FIGURA 14: Atividade leishmanicida do SG.....	41
FIGURA 15: Atividade leishmanicida do AB.....	42
FIGURA 16: Curva de concentração-resposta para SG e AB.....	43
FIGURA 17: Leitura das lâminas em microscopia óptica.....	44
FIGURA 18: Infectividade de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento.....	44
FIGURA 19: Número de parasitos presentes em 300 células após tratamento.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
1.1 Leishmaniose.....	10
1.2 Etiologia, vetores e reservatórios.....	11
1.3 Ciclo biológico.....	13
1.4 Formas clínicas.....	14
1.5 Epidemiologia.....	18
1.6 Diagnóstico.....	21
1.7 Tratamento farmacológico.....	22
1.8 Validação de plantas medicinais com atividades biológicas.....	24
1.9 <i>Siparuna guianensis</i>	28
1.10 α -Bisabolol.....	31
 2 OBJETIVOS.....	 33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 34
3.1 Local de realização dos experimentos.....	34
3.2 Produção e processamento do óleo essencial de <i>S. guianensis</i>	34
3.3 Isolamento do α -bisabolol.....	34
3.4 Parasitos.....	35
3.5 Células hospedeiras.....	35
3.6 Avaliação da citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	35
3.7 Atividade leishmanicida, <i>in vitro</i> , dos compostos.....	36
3.8 Ensaio de invasão com os parasitos após tratamento.....	37
3.9 Análise estatística.....	38
 4. RESULTADOS.....	 39

4.1 Análise da Citotoxicidade celular.....	39
4.1.1 Atividade citotóxica do Óleo de <i>S. guianensis</i>	39
4.1.2 Atividade citotóxica do α -Bisabolol isolado.....	39
4.2 Atividade inibitória em 50% da viabilidade celular.....	40
4. 3 Atividade leishmanicida dos compostos.....	41
4.3.1 Atividade leishmanicida do SG.....	41
4.3.2 Atividade leishmanicida do AB.....	42
4.4 Atividade inibitória em 50% da viabilidade dos parasitos após tratamento.....	42
4.5 Ensaio de invasão dos parasitos após tratamento.....	43
 5. DISCUSSÃO.....	 46
 6. CONCLUSÕES.....	 51
 7. REFERÊNCIAS.....	 52

1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença transmitida ao homem por insetos do tipo flebotomíneos infectados por protozoários do gênero *Leishmania*, responsáveis pelo desenvolvimento de doenças que afetam principalmente o sistema fagocítico mononuclear (FOGANHOLI; ZAPPA, 2011). Essa doença desenvolve-se em formas clínicas diferentes de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na transmissão.

A leishmaniose visceral americana (LVA) é causada por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagas* e é caracterizada por ser uma doença crônica, grave e com alta letalidade (MICHALICK; GENARO, 2010), a leishmaniose tegumentar do Velho Mundo (LVM) é causada por *L. tropica*, *L. major* e por *L. aethiopica* e é caracterizada pelo surgimento de úlceras indolores, feridas úmidas ou secas que podem se disseminar pelo corpo (GENARO; REIS, 2010a).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada por *L. brasiliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. amazonensis* e apresenta-se em quatro formas clínicas: a forma cutânea ou leishmaniose cutânea (LC), que causa lesões ulcerosas e indolores únicas ou múltiplas; forma cutaneomucosa ou leishmaniose cutaneomucosa (LCM), que provoca lesões mucosas agressivas principalmente na região nasofaríngea; forma disseminada ou leishmaniose cutânea disseminada (LCD), responsável pelo aparecimento de múltiplas úlceras cutâneas com disseminação hematológica e linfática e a forma difusa ou leishmaniose cutânea difusa (LCDf), caracterizada por lesões nodulares não ulceradas (GENARO; REIS, 2010b).

A leishmaniose cutânea (LC) é a mais prevalente em todo o mundo e mais frequente no Brasil, correspondendo entre 95 a 84% dos casos (OPAS/OMS, 2016). É causada por espécies como *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis* em regiões da América Central e do Sul (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Trata-se de uma infecção zoonótica que afeta animais silvestres e domésticos, incluindo marsupiais, carnívoros e primatas, sendo o homem um hospedeiro acidental (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003). É uma doença não contagiosa, que apresenta evolução crônica, considerada uma doença estigmatizante por acometer as

estruturas da pele e cartilagens da nasofaringe, de forma localizada ou difusa e é transmitida para hospedeiros vertebrados por vetores flebotomíneos conhecidos como moscas de areia (ROTTINI et al., 2015).

A leishmaniose, em todas as suas formas, está relacionada à pobreza e suas consequências, razão pela qual é considerada uma doença negligenciada que afeta cerca de 500.000 pessoas no mundo com altos índices de mortalidade (MARINHO et al., 2015). Também é considerada uma doença emergente ou doença reemergente pois, nas duas últimas décadas houve um aumento alarmante na incidência de casos de leishmaniose no mundo devido ao número crescente de migração urbana e mudanças climáticas (GOTO; LINDOSO, 2010).

A LTA tem apresentado ampliação de sua ocorrência geográfica, sendo encontrada atualmente em todos os estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos (BASANO; CAMARGO, 2004).

1.2 Etiologia, vetores e reservatórios

A leishmaniose é causada por parasitas intracelulares obrigatórios pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (L) (ROTTINI et al., 2015), subgênero *Leishmania* ou *Viannia*, que inclui aproximadamente 20 espécies que diferem em sua distribuição geográfica, sendo a *Leishmania braziliensis* uma das espécies mais prevalentes na América Latina e Central e no Brasil, seguidas por *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis* (GOTO; LINDOSO, 2010). O subgênero *L. amazonensis* é a espécie deste grupo com a mais ampla distribuição, tendo sido notificada em todas as regiões brasileiras (BRASIL, 2010).

O gênero *Leishmania* apresenta três formas evolutivas: amastigotas, promastigotas e paramastigotas. As formas amastigotas são encontradas geralmente no interior de macrófagos no hospedeiro vertebrado, são esféricas ou ovóides com tamanho entre 1,5 - 3,0 µm de largura por 3,0 – 6,5 µm de comprimento, possuem um núcleo grande e arredondado disposto em um dos lados da célula, o cinetoplasto apresenta-se em forma de bastão situado próximo ao núcleo, o qual, quando corados por Giemsa o citoplasma apresenta-se azul-claro e o cinetoplasto em vermelho-púrpura, não há nessa forma a presença de flagelo livre, há apenas

um rudimento na bolsa flagelar com pequena invaginação da superfície do parasita (Figura 1A) (DE CARLI; TASCA, 2011; GENARO; REIS, 2010b; REY, 2010).

As formas promastigotas de *Leishmania* são caracterizadas por seu alongamento na região anterior, onde há a presença de um flagelo livre emergindo do corpo do parasito (Figura 1B). No citoplasma há granulações azurófilas e pequenos vacúolos, o núcleo é arredondado ou oval situado na região mediana ou ligeiramente anterior do corpo, o cinetoplasto apresenta-se em forma de bastão na porção mediana entre o núcleo e a região anterior do parasita, possui comprimento entre 16 e 40 μm e largura de 1,5 a 3 μm incluindo o flagelo, podendo variar de acordo com o vetor (DE CARLI; TASCA, 2011; GENARO; REIS, 2010b; REY, 2010). A forma promastigota pode ser encontrada no inseto vetor como as seguintes variações: procíclica, nectomana, haptomona, leptomona e metacíclica. Essas variações da forma promastigota são relacionadas às diferenças quanto ao estabelecimento e manutenção da doença (GENARO; REIS, 2010b).

A forma paramastigota é oval ou arredondada com cinetoplasto margeando o núcleo ou na região posterior, possui um pequeno flagelo livre, seu comprimento varia entre 5 e 10 μm de comprimento por 4 a 6 μm de largura e é encontrada aderida ao epitélio do trato digestivo do vetor pelo flagelo (Figura 1C) (GENARO; REIS, 2010b).

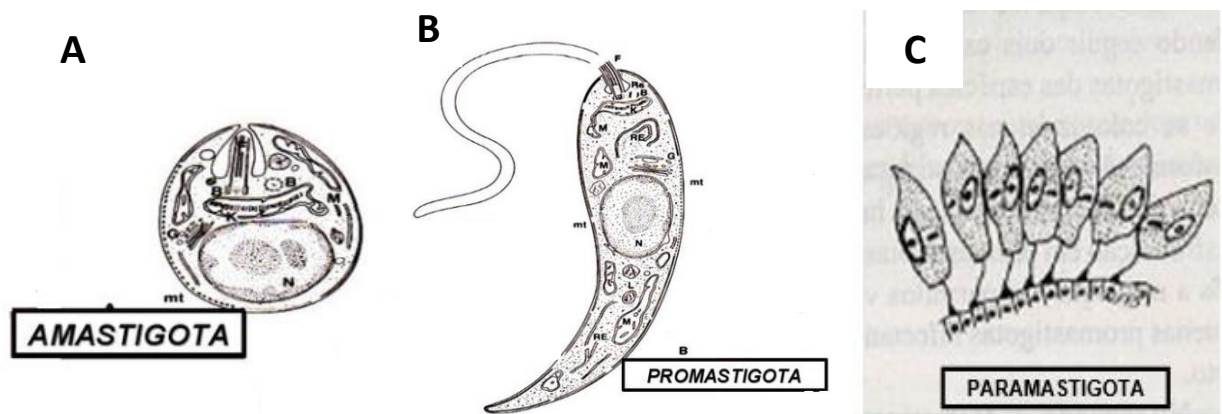


FIGURA 1: Ilustração das formas evolutivas do gênero *Leishmania*. Fonte: Fiocruz, 1997.

Os vetores da leishmaniose são mosquitos fêmeas de flebotomíneos (Ordem *Diptera*; Família *Psychodidae*; Sub-Família *Phlebotominae*), duas espécies de flebotomíneos são relacionadas com a transmissão da leishmaniose no Brasil, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, mais prevalentes em locais de topografia acidentada, com vegetação arbustiva e arbórea pouco densa e de pequeno porte, distribuídos por todo o país e mais abundantes nas estações

chuvosas (MACEDO et al., 2008). Dependendo da localização geográfica, os insetos flebotomíneos são chamados de mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2010).

Os principais vetores para *L. amazonensis* são *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva* que é a espécie mais prevalente no Amazonas e Rondônia, apresentam hábitos noturnos e voo baixo (BRASIL, 2010).

Os principais hospedeiros vertebrados das leishmanias costumam ser algumas espécies de roedores, marsupiais e canídeos silvestres, igualmente, *L. amazonensis* tem como hospedeiros naturais vários marsupiais, principalmente, o roedor “rato-soiá” (*Proechymis*), além do *Oryzomys*, que, às vezes, apresenta o parasita na pele sem apresentar lesões cutâneas (BRASIL, 2000; BASANO; CAMARGO, 2004).

Os animais domésticos são considerados hospedeiros acidentais da doença, porém o número de casos é grande no Brasil, a LTA nesses animais pode apresentar-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes à doença humana, com o surgimento de lesões em mucosas das vias aerodigestivas superiores (BRASIL, 2010).

1.3 Ciclo biológico

O inseto flebotomíneo se infecta ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado dando início ao ciclo biológico da leishmaniose (Figura 2). Neste hospedeiro as formas amastigotas estão presentes no sangue ou na linfa, contidos em macrófagos que serão ingeridos pelo inseto. Ao ingerir o sangue do hospedeiro as amastigotas irão para o intestino do vetor e para o tubo digestivo onde os macrófagos se rompem e liberam as amastigotas que se diferenciam em promastigotas. As promastigotas, já no tubo digestivo do vetor, multiplicam-se por divisão binária e se diferenciam em paramastigotas, colonizam o esôfago e a faringe do inseto vetor, permanecendo aderidas ao epitélio (BASANO; CAMARGO, 2004).

Após a ingestão, todo o sangue contaminado é envolto por uma membrana chamada peritrófica que é secretada pelas células do estômago do inseto, após três ou quatro dias de digestão esta membrana se rompe e libera as formas promastigotas, que durante sua migração pelo trato digestivo do vetor sofrem alterações morfológicas e atingem um estágio infectante –

promastigotas metacíclicas, ao atingirem a parte anterior do tubo digestivo em um processo denominado metaciclogênese. Todo o ciclo evolutivo no vetor pode durar entre cinco a sete dias (GENARO; REIS, 2010b).

O ciclo no hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada realiza o repasto sanguíneo e inocula as formas promastigotas no local da picada e estas são fagocitadas por macrófagos entre quatro a oito horas após a picada. No interior do macrófago ocorre a transformação de promastigotas em amastigotas, estas irão multiplicar intensamente por divisão binária e ocuparão todo o citoplasma do macrófago até que este se rompa. Ao romper-se o macrófago libera as amastigotas que serão novamente fagocitadas iniciando uma reação inflamatória no local. Após a picada de um novo flebotomíneo neste hospedeiro, o ciclo pode ser reiniciado (GENARO; REIS, 2010b).

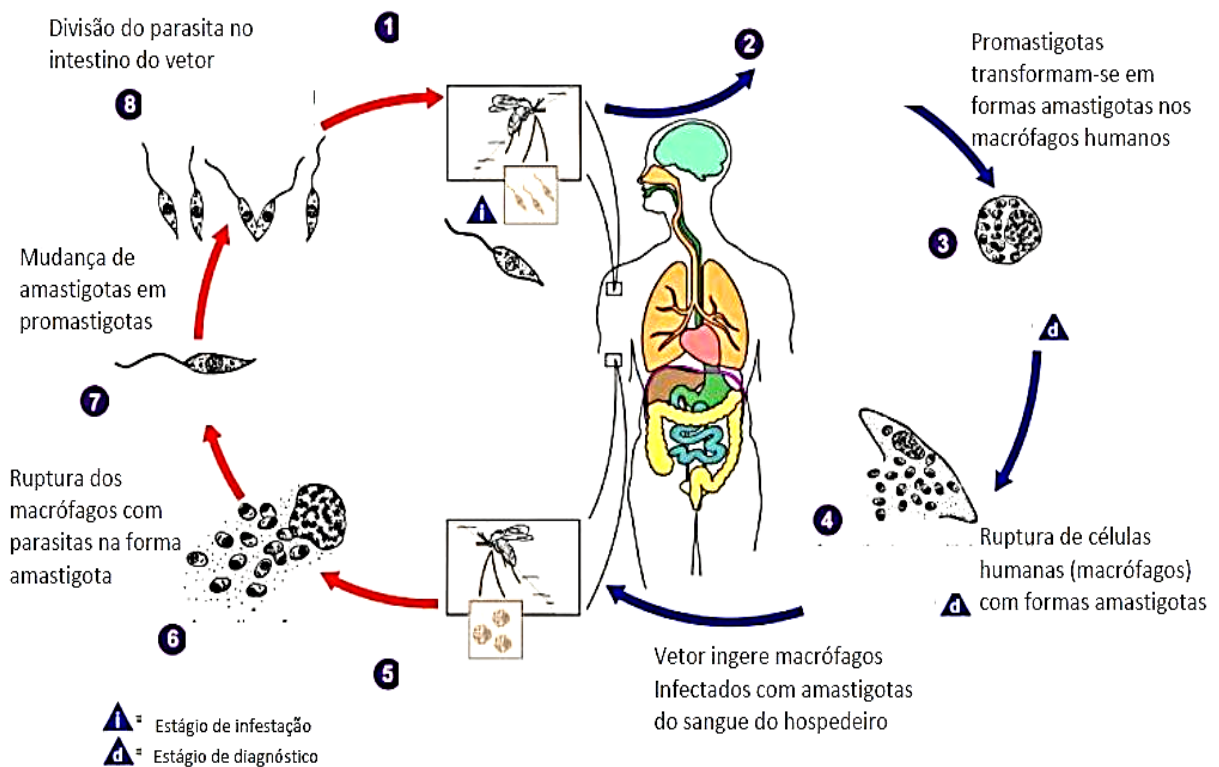


FIGURA 2: Ciclo biológico da leishmaniose. Fonte: Adaptado de CDC, 2013.

1.4 Formas clínicas

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de diversos fatores que vão desde o estado nutricional do indivíduo e sua resposta imune à infecção, até a diversidade de

espécies de vetores e parasitos envolvidos na transmissão (REY, 2010). Predominantemente há três formas clínicas de LTA: a leishmaniose cutânea, que se caracteriza por lesões simples ou múltiplas, geralmente ulceradas, próximas ao local da picada do inseto; a leishmaniose mucosa ou mucocutânea, que se manifesta com a destruição das mucosas nasal e oral evoluindo para uma consequente desfiguração do paciente, que pode ocorrer de forma isolada ou ao mesmo tempo em que a leishmaniose cutânea; e a leishmaniose cutânea difusa, que produz múltiplas lesões nodulares não ulceradas, que podem ser localizadas longe da região da picada (MIRANDA et al., 2011).

A leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação clínica mais frequente no Brasil. É a forma menos grave da doença, causada por espécies como *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis* em regiões da América Central e do Sul (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LC apresenta lesões exclusivamente cutâneas únicas ou em pequeno número que tendem a se cicatrizar, variam em apresentação de pápulas a placas evoluindo para úlceras, as lesões são pruriginosas e indolores (Figura 3), geralmente são encontradas em partes expostas do corpo como o rosto, os braços e as pernas, na maioria dos casos, os sintomas sistêmicos estão ausentes (DAVID; CRAFT, 2009). Devido à baixa imunidade do indivíduo, podem ocorrer infecções secundárias, alterando assim o aspecto das lesões deixando-as mais exarcebadas, dolorosas e purulentas (BRASIL, 2017). O paciente com LC desenvolve linfadenopatia localizada na área da lesão e complicações sistêmicas desta forma de leishmaniose são raros (BRASIL, 2017; MOHAMMADPOUR et al., 2017).



FIGURA 3: Lesões de leishmaniose cutânea. Úlceras causadas por infecção com *Leishmania major*. Fonte: DAVID; CRAFT, 2009.

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é causada por *L. braziliensis* e é caracterizada por acometer mucosas e por se apresentar meses a anos após a resolução de lesões primárias de LC. Trata-se de uma infecção desfigurante resultante da destruição local crônica do tecido do nariz, boca e naso-faringe e pálpebras (Figura 4) e sua progressão pode afetar a função respiratória e dificultar a nutrição (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Pode haver casos em que a LMC se desenvolve sem lesões cutâneas, em 30% dos casos os pacientes não se lembram da presença de uma lesão cutânea primária (MOHAMMADPOUR et al., 2017).



FIGURA 4: Lesão de leishmaniose mucocutânea. Esta lesão é caracterizada pela formação de pápulas e placas em torno do nariz e lábios provocadas por infecção com *L. (Viannia) braziliensis*. Fonte: DAVID; CRAFT, 2009.

A ulceração da lesão pode ser acompanhada de sintomas sistêmicos como febre e hepatomegalia, posteriormente, a LMC pode apresentar eritema e edema nas narinas, perfuração do septo nasal, ulceração palatal, edema gengival e periodontite, pode ocorrer também uma destruição progressiva da mucosa oronasofaríngea e cartilaginosa e das estruturas das vias aéreas superiores, o que causa desfiguração, infecção secundária e obstrução da via aérea (DAVID; CRAFT, 2009).

A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) manifesta-se pela presença de um número elevado de lesões pleomórficas em duas ou mais regiões do corpo. As lesões são acneiformes, papulares, nodulares e ulcerosas podendo ocorrer uma mistura de todas estas formas em uma única lesão (Figura 5). Nesta forma de leishmaniose não há a presença de linfadenopatia e a disseminação das lesões ocorre em poucos dias após a infecção com uma intensa resposta

inflamatória no local (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). A distribuição das lesões da LCD é bilateral e geralmente assimétrica e a LCD pode ser acompanhada por leishmaniose cutaneomucosa em 38% dos casos (MANCHENO-VALENCIA et al., 2017).

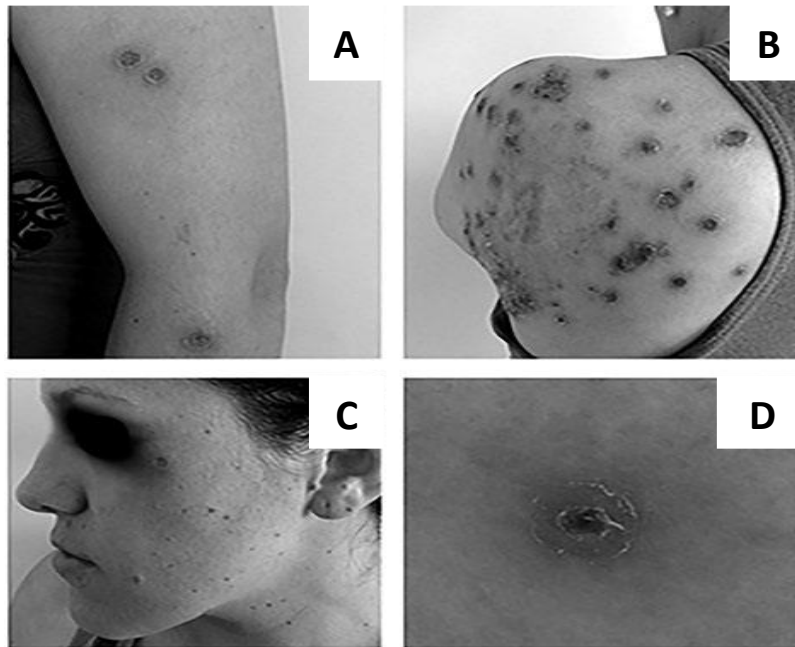


FIGURA 5. Lesões de leishmaniose cutâneo disseminada. A – Lesões ulcerosas no membro superior; B – Lesões ulcerosas e nodulares na região escapular; C – Lesões acneiformes com distribuição no rosto, pescoço e orelha do paciente; D – Aspecto nodular e ulceroso de uma lesão única de LCD. Fonte: Mancheno-Valencia et al., 2017.

A leishmaniose cutâneo difusa (LCDf) produz lesões nodulares e papulares com presença de placas, máculas e eritema (Figura 6). As lesões de LCDf proliferam-se lentamente e se espalham pelo corpo do indivíduo acometido podendo cobrir várias áreas com exceção do couro cabeludo, axilas, dobras inguinais, palmas das mãos e solas dos pés. A principal diferença entre a LCDf e a LCD é a presença de lesões nodulares múltiplas do tipo lepromatosas (HASHIGUCHI et al., 2016).

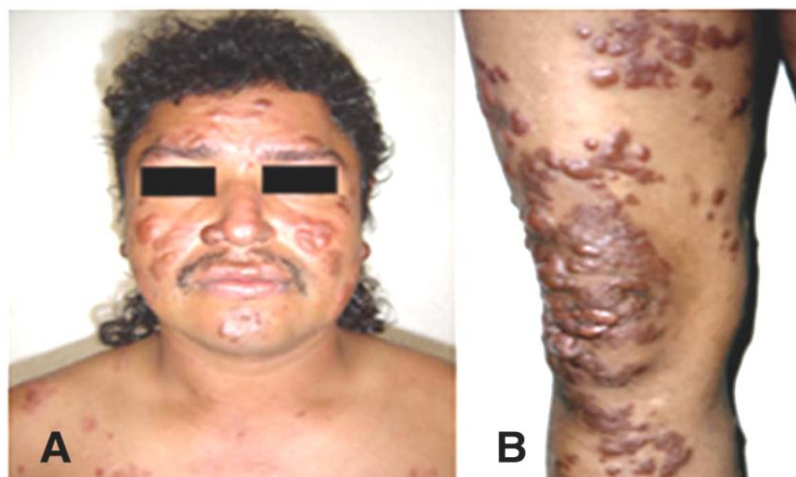


FIGURA 6: Lesões de leishmaniose cutânea difusa. A - Nódulos e pápulas observados nos lóbulos da orelha, aurículas, rosto, e os ombros. B – Várias formas de erupções, como pápulas, nódulos, eritemas infiltrados e sardas de cor acastanhada, encontrados nas extremidades inferiores. Fonte: Hashiguchi et al., 2016.

1.5 Epidemiologia

Considerada inicialmente como uma zoonose de animais silvestres, mudanças no padrão de transmissão da LTA tem mudado o quadro epidemiológico da doença nos últimos anos, nos quais houve o aumento da ocorrência em zonas rurais, áreas desmatadas e em regiões periurbanas (BRASIL, 2017).

A leishmaniose pode ser dividida em três perfis epidemiológicos: o perfil silvestre ou zoonose de animais silvestres; perfil ocupacional ou de lazer, antropozoonose, com transmissão associada a desmatamento, atividades agropecuárias e ecoturismo e perfil rural ou perirurbano no qual a doença é caracterizada como zoonose de matas residuais por ocorrer a transmissão em áreas periurbanas em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (BRASIL, 2017).

Com o aumento da globalização e do desmatamento em todo o mundo, estima-se que há dois milhões de casos de LTA em 98 países e que haja aproximadamente 350 milhões de pessoas em situação de risco para a infecção, sendo que 90% dos novos casos da doença ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru, e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, no Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (BASANO; CAMARGO, 2004; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; ORTIZ; ANVERSA, 2015). A LTA é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença emergente e não controlada de

categoria 1, com maior prevalência no litoral mediterrâneo, nas Américas e Ásia Ocidental (OPAS/OMS, 2016).

Na América Latina, a ocorrência de casos de leishmaniose mucosa é de aproximadamente 35.000 casos principalmente em países como o Brasil, Peru e Bolívia (SAVOIA, 2015) e os casos de leishmaniose cutânea são descritos em quase todos os países americanos do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, exceto no Uruguai e no Chile. Na América Latina, há ocorrência na península de Yucatán no México até a Argentina, com maior importância epidemiológica no Brasil e no Peru (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Dos 18 países endêmicos para leishmaniose nas Américas, 17 possuem notificação obrigatória e 43,57% (240.635.853) da população estão expostas ao risco (Figura 7) (OPAS/OMS, 2016).

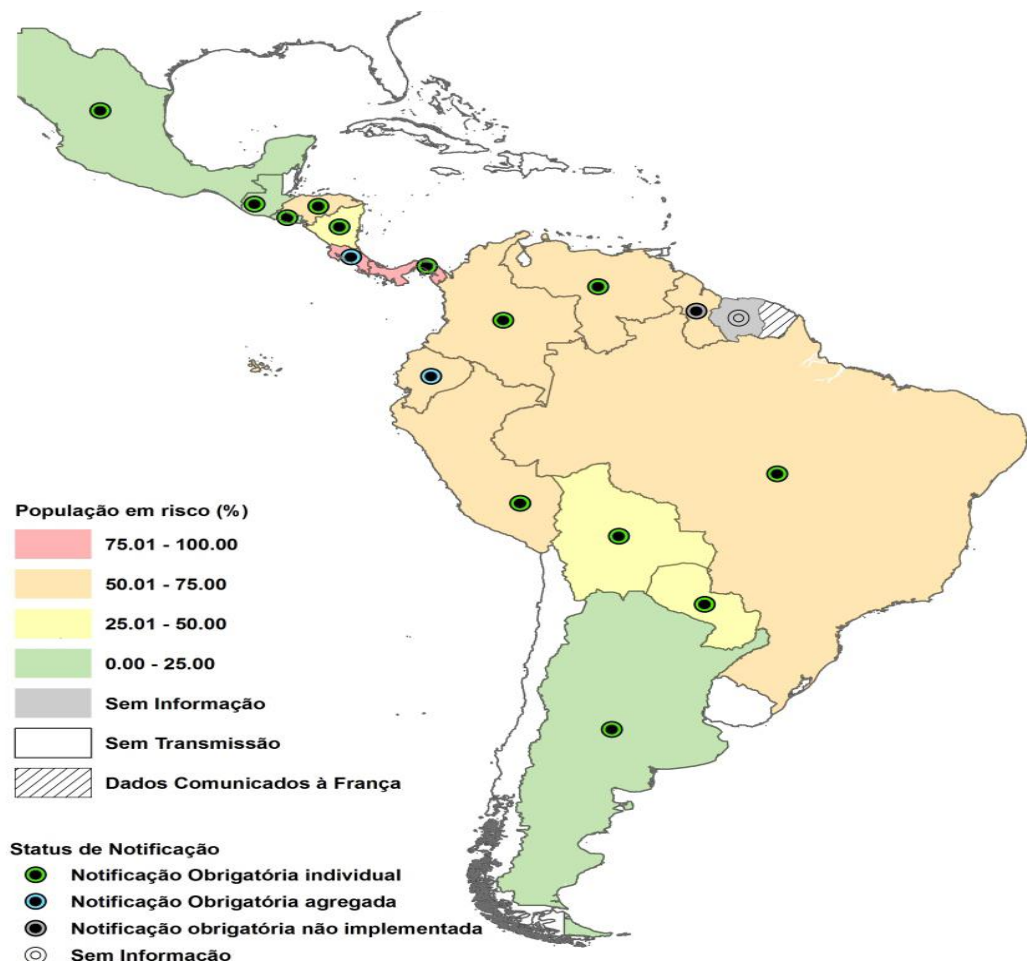


FIGURA 7: Países das Américas endêmicos para leishmaniose e população em risco. Fonte: OMS, 2016.

No Brasil, a LTA tem grande importância epidemiológica devido a sua magnitude e ocorrência em várias regiões (Figura 8). Há ocorrência de picos de transmissão a cada cinco anos com tendência de aumento desde o ano de 1985, sendo que no período entre 1995 a 2014 houve uma média anual de 25.763 casos novos com coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

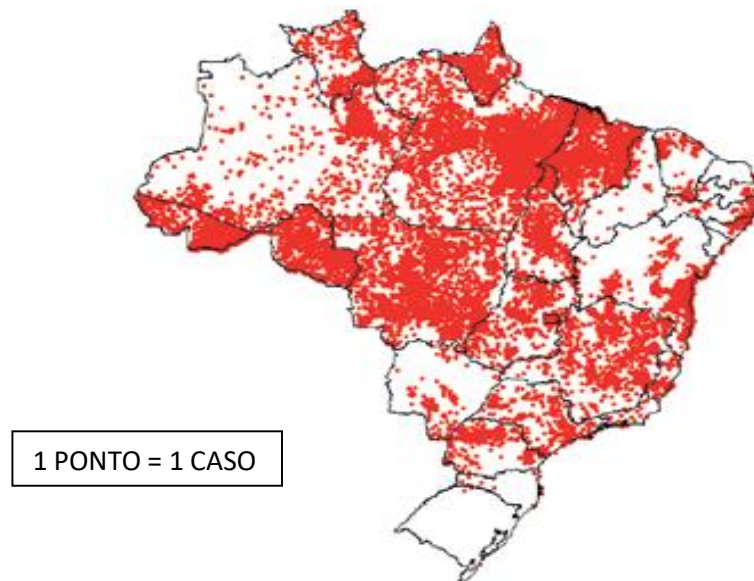


FIGURA 8: Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil no ano de 2015. Observa-se alta distribuição nas regiões Norte, Centro Oeste e Sudeste do país e a presença da doença na região Nordeste. Destaca-se a baixa incidência da doença na região Sul mais especificamente no estado do Rio Grande do Sul. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017.

Estudo realizado por Negrão e Ferreira (2014) no período de 2001 a 2010, demonstrou a ocorrência de 248.834 casos no Brasil, com distribuição de 98.409 casos na região Norte, 78.400 casos na região Nordeste, 40.903 casos na região Centro Oeste e 23.998 casos na região Sudeste. Este estudo evidenciou que em áreas de endemia antiga, as crianças com idade inferior a dez anos e eventualmente adultos imunossuprimidos são acometidos, e em regiões emergentes a infecção prevalece em adultos (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

O Centro-Oeste é a segunda maior região em coeficiente de detecção de 2001 a 2010, com uma média de 31,72, sendo o maior pico no ano de 2002 com 40, 4.839 tendo o estado de Goiás 3.613 casos entre 1991 a 2000 e 4.503 casos de 2001 a 2010, o que representa um aumento de 19,76% (NEGRÃO; FERREIRA, 2014). A região Centro-Oeste é considerada uma região de transição por fazer divisa ao norte com a região equatorial e a noroeste com a

região semiárida e ao sul a região subtropical, por estes motivos, há no estado a presença de chapadas, planaltos e vales de fundo chato, que são regiões favoráveis a manutenção da fauna de flebótomos das leishmanioses no estado (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

A leishmaniose no Brasil é uma doença de grande importância para a saúde pública principalmente pela grande variedade de espécies do protozoário e pela expansão geográfica da doença no país, em 2003 houve a confirmação da autoctonia da doença em todos os estados brasileiros com transmissão focal e adaptação de vetores a regiões geográficas específicas (FOGANHOLI; ZAPPA, 2011; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico de leishmaniose cutânea é baseado nos sinais clínicos do paciente e deve ser realizado o diagnóstico diferencial para as doenças causadas por fungos (cromoblastomicose), infecções bacterianas da pele (rinoscleroma), infecção viral, doenças inflamatórias (psoríase), neoplasias malignas (metástases) e úlceras (úlceras traumáticas). O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são importantes para o processo de cura do paciente e principalmente para evitar lesões desfigurantes e cicatrizes que podem prejudicar psicologicamente o paciente e prejudicar sua qualidade de vida (REMADI et al., 2017).

É importante determinar por meio do diagnóstico laboratorial da leishmaniose, a espécie de causadora da lesão e obter a confirmação do diagnóstico. O diagnóstico da LTA envolve quatro grupos de exames: Teste intradérmico (Intradermoreação de Montenegro ou da *Leishmania*), exames parasitológicos como demonstração direta do parasito, isolamento em cultivo *in vitro* (meios de cultivo) e isolamento *in vivo* (inoculações animais), reação em cadeia da polimerase (PCR) e exames histopatológicos.

A intradermorreação de Montenegro (IDRM), por ser acessível e simples, costuma ser o exame de primeira escolha e deve ser usado em conjunto com o exame parasitológico. Este teste avalia a hipersensibilidade celular retardada, onde o grau de resposta cutânea é medido 48 a 72 horas após a injeção intradérmica de 0,1 mL de antígeno na face anterior do antebraço, sendo uma enduração igual ou maior que 5mm considerada positiva (GENARO; REIS, 2010a).

A demonstração direta do parasito é realizada por meio da escarificação da borda da lesão, biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina por aposição e punção aspirativa. A sensibilidade desta técnica pode ser aumentada pela repetição do exame e a leitura de várias lâminas, o isolamento em cultivo *in vitro* é importante para demonstrar a espécie de *Leishmania* envolvida e é realizado com a inoculação de fragmentos cutâneos da ferida obtidos por biópsia em meios de cultivo ágar sangue modificado entre 24°C e 26°C para crescimento do parasito. Após o quinto dia é possível encontrar promastigotas de *Leishmania*, entretanto, a cultura deve ser mantida por até um mês sob observação para que se possa garantir o resultado negativo (BRASIL, 2017).

Outro exame que pode ser realizado é o isolamento *in vivo*, no qual o material da biópsia é triturado em solução salina estéril e inoculado por via intradérmica no focinho ou em patas de hamster que são acompanhados por três a seis meses nos quais a lesão vai se desenvolver. Esse método é pouco utilizado por apresentar alto custo e complexidade (BRASIL, 2017).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) também pode ser utilizada principalmente para se identificar a espécie e em casos de lesão mucosa. Trata-se de um diagnóstico mais sensível que os testes convencionais, mas que tem sido pouco aplicada na rotina laboratorial devido ao alto custo (BRITO et al., 2012).

Na prática, a conduta mais utilizada para o diagnóstico de LTA é a pesquisa direta de parasitos e a intradermoreação, junto ao exame clínico da lesão e ao antecedente epidemiológico (BASANO; CAMARGO, 2004).

1.7 Tratamento farmacológico

Os medicamentos mais utilizados no Brasil para o tratamento da LTA são o antimônio pentavalente (Sb^{+5}) e a anfotericina B. Para utilização de um destes dois medicamentos é preciso levar em conta a faixa etária do paciente, a ocorrência de gravidez e a presença concomitante de outras doenças (BRASIL, 2011).

O antimônio pentavalente (Sb^{+5}), presente no antimonato de meglumina (nome comercial ‘Glucantime®’ ou ‘Glucantim®’) ou estibogluconato de sódio (nome comercial ‘Pentostam®’) é um medicamento cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente

esclarecido, o que se sabe é que o medicamento age sobre processos moleculares do parasito influenciando a ação parasiticida do macrófago (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Este medicamento pode ser encontrado no mercado em frascos de 5 mL com 1,5 g do antimônio bruto e a dose recomendada deve ser calculada em miligramas de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) por quilograma de peso corporal por dia ($\text{mg Sb}^{+5}/\text{kg}/\text{dia}$), administrado por via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV) por 28 a 30 dias (BRASIL, 2017).

O antimônio pentavalente pode causar vários efeitos colaterais durante a sua administração sendo o efeito mais grave a ocorrência de cardiotoxicidade com presença de arritmias, prolongamento das ondas Q e T do eletrocardiograma e até mesmo morte súbita, podem ocorrer também elevação de enzimas hepáticas e pancreáticas, pancitopenia e anormalidades eletrolíticas, o que exige o monitoramento contínuo do paciente durante a administração do medicamento, o que implica em internação hospitalar na maioria dos casos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A anfotericina B é indicada para o tratamento de LTA, considerada como a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, e deve ser utilizada para tratamento de gestantes e de pacientes que apresentam contraindicações ou reações adversas ao uso dos antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2011). A anfotericina B é um antibiótico poliênico que demonstra excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* e no Brasil é dispensado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da leishmaniose tegumentar na forma de desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal (BRASIL, 2017).

A anfotericina B lipossomal pode ser administrada em doses de 3 mg/kg/dia, por via EV por 5 dias consecutivos e é considerado um medicamento menos tóxico do que a forma de desoxicolato por ter como alvo de ação específica o macrófago (DAVID; CRAFT, 2009). Os efeitos colaterais da anfotericina B são dispneia, rubor, febre, cefaleia, tremores, cianose, hipotensão, hipomagnesemia, distúrbio de comportamento, calafrios, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão (BRASIL, 2017; DAVID; CRAFT, 2009).

Outro medicamento para o tratamento da LTA é a pentamidina cuja dose recomendada é de 4 mg/kg/dia durante 7 semanas consecutivas por vias IM ou EV. A pentamidina possivelmente age nos mecanismos de síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) do parasito modificando a morfologia do cinetoplasto e fragmentando as mitocôndrias. Este medicamento pode causar efeitos adversos como dor no local da injeção, gosto metálico na

boca, dor de cabeça, congestionamento, dispneia e hipneia e também exige o monitoramento dos pacientes durante sua administração (DAVID; CRAFT, 2009).

A OMS ressalta que o baixo nível de evidências sobre a eficácia do tratamento para as formas cutânea e mucocutânea de leishmaniose dificultam o manejo dos casos e a indicação das melhores condutas a serem tomadas durante o tratamento (OPAS/OMS, 2016).

A maioria das drogas utilizadas no tratamento da LTA são potencialmente tóxicas e requerem hospitalização do paciente para sua administração, além do acompanhamento e monitoramento do mesmo após o término do tratamento, o que eleva os custos do mesmo e desestimula a população carente a aderir ao tratamento, visto que esta população é a mais afetada pela doença, o que torna imprescindível a busca por novas alternativas de tratamento para a LTA, de forma que o custo de produção e a ocorrência de efeitos adversos sejam reduzidos e que o tratamento seja acessível à maioria dos pacientes.

Neste sentido, o uso de fitoterápicos para o tratamento de leishmanioses pode vir a ser uma alternativa na busca de um novo fármaco acessível à população e que produza menos efeitos adversos do que os medicamentos convencionalmente utilizados.

1.8 Validação de plantas medicinais com atividades biológicas

Atualmente, pesquisas com plantas tem sido realizados em diversos países e em várias regiões do Brasil utilizando-as seja na sua forma bruta, fitoterápica ou com o princípio ativo isolado. Estas pesquisas têm revelado o potencial desses vegetais quanto às atividades leishmanicida e tripanocida, que podem vir a ser uma forma alternativa para o tratamento dessas patologias (DELMONDES, 2014).

O uso de plantas no tratamento de várias patologias faz parte da prática da medicina popular há muitos anos (LUCA et al., 2014). No Brasil, as diferentes culturas indígenas, africana e portuguesa contribuíram para o enriquecimento e disseminação da sabedoria popular em relação ao uso e cultivo de diversas espécies de plantas com potencial para tratamento de variadas doenças e sinais e sintomas (DELMONDES, 2014). Figura muito comum em várias regiões do Brasil no passado era a do “curandeiro” ou “raizeiro” que detinha consigo o conhecimento sobre um repertório de substâncias botânicas com efeitos

para a saúde e que as utilizava para tratar comunidades e indivíduos acometidos por doenças (FRANÇA et al., 2008).

Esta prática, muito comum no país, diminuiu devido ao processo de industrialização crescente na sociedade, porém, ainda hoje, o uso de plantas medicinais é comprovadamente um meio eficaz de atendimento à saúde (DELMONDES, 2014; SANTOS-LIMA et al., 2016).

Estudo realizado por Santos-Lima e colaboradores no ano de 2016, demonstrou a importância do uso de plantas medicinais para índios da etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras no estado da Bahia ao realizar o levantamento de espécies utilizadas pela tribo para tratamento de doenças, inclusive parasitárias. Os autores encontraram doze espécies como a caçatinga (*Croton argyrophylloides* Muell. Arg.), mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.), hortelã miúdo (*Mentha piperita* L.) e babosa (*Aloe vera* (L.) Burm f.) como as plantas mais indicadas pelos índios em seu uso cotidiano. Ressalta-se que nesta pesquisa, as plantas citadas fazem parte da vegetação nativa e são encontradas nos quintais, nas proximidades das residências e em locais de cultivo próprio que evidencia a importância terapêutica, cultural e histórica do uso de plantas na prevenção e cura de enfermidades.

Estudos sobre a medicina popular tem propiciado o uso de chás, decoctos, tisanas e tinturas contribuindo para que os medicamentos de origem vegetal sejam novamente empregados na profilaxia e tratamento de doenças (FRANÇA et al., 2008). Há a possibilidade do uso de plantas medicinais como tratamento complementar ou na substituição de fármacos empregados usualmente, por se tratarem de alternativas de baixo custo e melhor eficácia (DELMONDES, 2014; SANTOS-LIMA et al., 2016).

O uso de plantas para o desenvolvimento de novos medicamentos pode ser útil tanto para combater doenças causadas por parasitos que são negligenciadas, quanto para maximizar o controle de várias doenças (RONDON et al., 2012).

As vantagens de um tratamento utilizando um medicamento natural são a possibilidade de se conseguir baixa toxicidade, menos efeitos colaterais no paciente e o custo mais baixo para a população, principalmente se o medicamento fosse oriundo de um vegetal de fácil cultivo e acessível à população (BEZERRA; MENEGUETTI; CAMARGO, 2012).

Vem surgindo também atualmente, o interesse em associar o avanço tecnológico ao saber popular propiciando o desenvolvimento sustentável da saúde (FRANÇA et al., 2008). No ano 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) brasileira instituiu a

Portaria nº22/1967 da Agência Nacional e a Resolução-RDC nº17/2000 que classifica os fitoterápicos como medicamentos e aprova o seu uso. Além disso, o Ministério da Saúde (MS), encoraja a realização de estudos envolvendo plantas tradicionais brasileiras afim de se conhecer os benefícios que estas podem trazer além de evitar efeitos colaterais e prejuízos na utilização incorreta desta terapia (BRASIL, 2010).

É importante ressaltar que o uso deste recurso requer a identificação e a classificação botânica correta, devido ao princípio ativo variar de planta a planta por causa da biodiversidade, código genético, condições climáticas, mudanças sazonais, índice pluviométrico, luminosidade, lençol freático, condições do solo, dentre outras condições que podem interferir nas propriedades farmacológicas da planta (FRANÇA et al., 2008).

Um medicamento fitoterápico tem sua ação graças à presença de princípios ativos chamados fitofármacos. Alguns medicamentos são preparados diretamente com esses fitofármacos extraídos e purificados das plantas, o que possui um custo alto em sua preparação, já os fitoterápicos são medicamentos preparados com plantas medicinais, nos quais o princípio ativo encontra-se agregado a outras substâncias, da própria planta usados em chás medicinais e extratos (BRANDÃO, 2013). O custo para a preparação desses produtos é bem menor que os fitofármacos e, por isto, a OMS incentiva o seu desenvolvimento desde a década de 70 (BRASIL, 2006).

O processo para se transformar uma planta medicinal em um produto fitoterápico é denominado validação, que consiste na confirmação da eficácia farmacológica e ausência de toxicidade da planta (BRANDÃO, 2013). A validação de uma planta medicinal inicia-se com um levantamento dos dados botânicos da espécie de planta a ser avaliada que inclui identificação botânica e informações sobre o uso popular (parte da planta a ser utilizada, forma de administração, dosagens, tempo de tratamento, etc.) (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; KLEIN et al., 2009).

A planta deve ser secada, moída, transformada em pó o qual será submetido a processos de extração de suas substâncias químicas, um dos métodos mais usados é a percolação, que consiste na passagem contínua de líquidos (solventes) através do pó da planta que serão então evaporados até a obtenção de um extrato-seco, constituído das substâncias químicas das plantas (BRANDÃO, 2013). Estas etapas são fundamentais para a transformação de uma planta medicinal em medicamento fitoterápico pois a validação exige a

conservação da composição química e da atividade farmacológica a ser explorada (TOLEDO et al., 2003).

Devem ser aplicados aos extratos obtidos, métodos cromatográficos, feitos em colunas, placas ou por meio de cromatógrafos líquidos ou gasosos, com a finalidade de separar, purificar e identificar os princípios ativos da planta selecionada. A identificação da estrutura química dos princípios ativos é feita por meio de métodos espectroscópicos (BRANDÃO, 2013).

Após estes processos, o extrato obtido da planta de escolha pode ser submetido ao processo experimental para verificação de sua atividade e de sua toxicidade.

Muitos trabalhos corroboram a importância terapêutica atribuída a produtos de origem vegetal. As plantas têm se mostrado uma boa alternativa na busca por novos medicamentos contra muitas patologias. Estudo realizado por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em 1996 testou quarenta e sete espécies de plantas da família *Asteraceae* contra formas de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Onze destas espécies foram 100% eficazes contra o parasito: *Eremanthus glomerulatus*, *Lychnophora passerina*, *L. pinaster*, *L. trichocarpha*, *Mikania cordifolia*, *Piptocarpha rotundifolia*, *Siegesbeckia orientalis*, *Vanillosmopsis Erythropappa*, *Vernonia crotonoides*, *V. pedunculata* e *Wedelia paludosa*. *Vernonia pedunculata* foi a espécie mais ativa dentre as espécies avaliadas demonstrando-se uma alternativa promissora para o tratamento desta doença (CHIARI et al., 1996).

As substâncias cariofileno e eugenol foram testadas quanto à atividade antiepipimastigota, antipromastigota e quanto à citotoxicidade e obtiveram um efeito clinicamente relevante do cariofileno contra os parasitas *T. cruzi* e *L. brasiliensis* uma vez que este obteve um melhor resultado quando comparado ao eugenol, sendo capaz de inibir o crescimento dos parasitas testados (LEITE et al., 2013), este estudo ainda aponta a necessidade de realização de mais testes de toxicidade para estas substâncias.

Neste cenário, os medicamentos fitoterápicos inserem-se como uma alternativa promissora para melhoria do tratamento das LTAs. Muitos trabalhos corroboram a importância terapêutica atribuída a produtos de origem vegetal, bem como descrevem a atividade leishmanicida de vários princípios ativos naturais. As plantas têm se mostrado uma boa alternativa na busca por novos medicamentos contra a leishmaniose, uma vez que algumas espécies podem ser rica fonte de substâncias com atividade contra as formas de

Leishmanias e se apresentam como uma direção promissora na busca de drogas eficazes (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015).

1.9 *Siparuna guianensis*

A *Siparuna Guianensis*, anteriormente pertencia à família Monimiaceae, agora pertence à família Siparunaceae desde 2003, no sistema de Grupo para a Filogenia das Angiospermas II. A família Siparunaceae consiste em dois gêneros, *Glossocalyx*, uma espécie da África Ocidental, e *Siparuna*, com aproximadamente 65 espécies nos neotrópicos, a maior parte nos Andes (PEIXOTO; SANTOS; MOURA, 2011; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

Ocorre desde a Nicarágua, por todo o norte da América do Sul até o Paraguai e no Brasil, onde há 19 espécies de *Siparuna* com ocorrência maior na Floresta Amazônica. Nos estados de Goiás e Tocantins há a presença de 3 espécies: *Siparuna bifida*, *Siparuna brasiliensis* e *Siparuna guianensis*. Pode ser encontrada também nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Mato Grosso, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (PEIXOTO; SANTOS; MOURA, 2011).

Nos estados de Tocantins e Goiás a *S. guianensis* é tolerante à sombra e à exposição ao sol sendo encontrada em florestas adjacentes ao cerrado e em capões de mata no cerrado, cresce em solo arenoso, latossolo vermelho e solo argilo-pedregoso com frequência baixa ou mediana nestes estados onde floresce e frutifica o ano todo, com maior floração em janeiro e março e maior frutificação em setembro e novembro (PEIXOTO; SANTOS; MOURA, 2011).

São caracterizadas como espécies de arbustos e arvoretas de 5 a 9 metros de altura com casca cinza e lisa com folhas simples, membranáceas, de margens lisas alongadas a elípticas ou lanceoladas, floresce em cachos e produz frutos múltiplos e globosos, conforme a Figura 9 (VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010). São caracterizadas também como arbustos aromáticos pela presença de células de óleo esféricas encontradas em todas as partes das plantas (PEIXOTO; SANTOS; MOURA, 2011).



FIGURA 9: Caraterísticas da planta *Siparuna guianensis*. A – Arbusto; B - folhas; C - frutos de *Siparuna guianensis* do Bosque Paulo Siqueira, Cuiabá-MT, Fotos de Valentini, C.M.A, adaptado de Valentini; Rodríguez-Ortiz; Coelho, 2010.

O nome popular da *S. guianensis* no Brasil pode variar segundo a diversidade das regiões em que ocorre onde recebe nomes como Negramina, Folha-santa, Limão Bravo, Capitíu, Mata Cachorro, Catingoso dentre outros nomes populares. Nas regiões de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Tocantins a planta é mais conhecida como Negramina (VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

O uso popular da *S. guianensis* é grande na medicina tradicional na produção de cataplasmas, chás, infusões, garrafadas ou banhos para tratamento de diversas afecções. Em muitos países da América, a decocção de folhas da *S. guianensis* é usada como bebida contra problemas estomacais e as folhas são usadas para compressas ou cataplasmas contra dor de cabeça e reumatismo. No Panamá e Guiana, extratos são usados para matar insetos daninhos ou como inseticidas (VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

No Brasil, a planta é utilizada no estado de Goiás para dores na coluna, tratamento de artrite e reumatismo (SOUZA; FELFILI, 2006), no estado do Mato Grosso sua principal forma de preparo é a decocção das folhas, utilizada na forma de banho para alívio da gripe, febre e dores no corpo e na região das Guianas no Amazonas utilizam as folhas para preparação de um chá que é usado para alívio de febres, pressão arterial alta, para doenças reumáticas e também contra cólicas (VALENTINI et al., 2009). Na região do Alto do Rio Grande, em Minas Gerais, a planta é utilizada como infusão usando toda a planta como anti-inflamatório, para flatulência, estimulante, para cefaleia, nas gripes, resfriados e como

cataplasma, compressa ou banho é usada para tratar o reumatismo (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

S. guianensis apresenta variação do rendimento do óleo essencial (OE) em função de seu ciclo biológico e de variações meteorológicas locais, a composição do óleo obtido de partes distintas da planta (folhas, caules, frutos e folhas) também pode apresentar compostos químicos diferentes (VALENTINI et al., 2010). A composição do OE pode apresentar-se diferente entre espécies de países distintos ou variar por região geográfica dentro de um país, estudos fitoquímicos demonstram que é possível que essa variação ocorra até mesmo dentro de uma determinada região, devido as estações do ano (AGUIAR et al., 2015; SILVA; VALENTINI; BARROS, 2015).

A quantidade de óleo extraído da planta também pode variar de acordo com o período de desenvolvimento em que a mesma se encontra. Estudos demonstraram que o período de maior rendimento do óleo tem coincidido com o período reprodutivo da planta quando esta emite flores e frutos e o período de menor rendimento na fase vegetativa da planta (SILVA; VALENTINI; BARROS, 2015; VALENTINI et al., 2010).

Os principais componentes químicos identificados em OE de *S. guianensis* foram β -mirceno, 2-undecanona, d-elemeno, germacreno d, α -limoneno, biciclo-germacreno, 2-tridecanona, β -mirreno, α -terpinoleno, α -bisabolol, siparunona, espatulenol, ácido decanoico, ledol, emol, quercetin-3 e kaempferol-3 (AGUIAR et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; FACUNDO et al., 2012; MONTANARI, 2010; NEGRI; SANTI; TABACH, 2012; SILVA; VALENTINI; BARROS, 2015; ZOGHBI et al., 1998).

Apesar de haver escassez de estudos sobre o uso da *S. guianensis* em pesquisas para seu uso farmacológico, alguns estudos têm encontrado múltiplos usos e indicações promissoras da planta para desenvolvimento de novos fármacos. Estudo realizado por Aguiar e colaboradores (2015), identificou principalmente a presença de hidrocarbonetos sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e de hidrocarbonetos de monoterpene nos OEs das folhas frescas, caules e frutos de *S. guianensis* e os autores sugerem que o OE desta planta pode ser usado como um repelente promissor uma vez que as doses utilizadas para repelir 50% da população de mosquitos adultos (RD50) foram 0,438 e 0,662 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para a espécie de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, respectivamente e a atividade repelente obtida pela concentração de OE acima de 0.450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ foi maior que a de um repelente comercial (AGUIAR et al., 2015).

O uso do OE de *S. guianensis* também foi sugerido para o uso medicinal na terapia de transtornos de ansiedade, uma vez que a planta possui alto teor de flavonoides que podem ser antioxidantes, ansiolíticos e sedativos (NEGRI; SANTI; TABACH, 2012).

O OE da *S. guianensis*, possui uma variedade de compostos voláteis, incluindo monoterpenos e sesquiterpenos e tem demonstrado a possibilidade de obtenção de compostos promissores contra a infecção por leishmanias como o α -Bisabolol e terpenos, a partir do OE desta planta (VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

1.10 α -Bisabolol

O α -Bisabolol, também conhecido como levomenol, é um álcool sesquiterpeno presente em OEs de várias plantas, inclusive na *S. guianensis* (BALDISSERA et al., 2016).

Este composto é abundante em plantas do cerrado brasileiro, possui aspecto oleoso, límpido porém levemente amarelado, odor amadeirado e floral, com peso molecular de 222,37 g/mol. A denominação química do α -Bisabolol é 1-metil-4(1,5-dimetil-1-hidroxi-4(5)-hexenil)-1-cicloexano, representado pela fórmula estrutural apresentada na Figura 10 (MAPRIC, 2018).

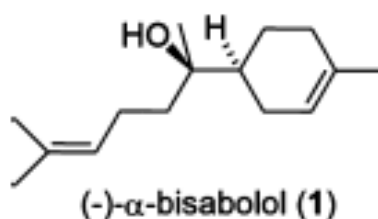


FIGURA 10: Fórmula química do α -Bisabolol. Fonte: Corpas-López et al., 2018.

O α -Bisabolol é utilizado em grande escala na fabricação de cosméticos dermatológicos por conter propriedades organolépticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas (CORPAS-LÓPEZ et al., 2018).

De acordo com Colares et al, 2013, o α -Bisabolol isolado da planta *Vanillosmopsis arborea* (candeeiro) demonstra atividade leishmanicida *in vitro*, alterando o parasito morfológicamente com o acúmulo de vesículas, o que sugere o seu potencial leishmanicida (COLARES et al., 2013).

Estudo realizado em 2015 por Baldissera e colaboradores avaliou a susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Trypanosoma evansi* a α -Bisabolol e nanopartículas lipídicas sólidas contendo α -Bisabolol, observou-se que quando utilizados em concentrações de 0,5, 1 e 2%, obteve-se um efeito tripanocida mais rápido quando comparados à quimioterapia convencional e sugere o uso deste composto como um forte candidato no tratamento contra infecções da família Trypanosomatidae (BALDISSERA et al., 2016).

O α -Bisabolol isolado de *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), também demonstrou atividade leishmanicida e viável para uso em macrófagos de mamíferos (camundongos Balb) em um estudo realizado por Corpas-López (2015), ao ser testado *in vitro* e *in vivo* contra amastigotas intracelulares de *L. infantum* e *L. donovani* (com IC₅₀ 55 e 39 μ m, respectivamente). No teste *in vivo* o α -Bisabolol reduziu a carga parasitária no baço e no fígado em 71,60% e 89,22%, respectivamente, a 200 mg / kg sem mostrar toxicidade por via oral demonstrando neste estudo ser mais eficaz do que o antimoniato de meglumina (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015).

O uso de plantas medicinais no desenvolvimento de novos fármacos coopera para a valorização do saber popular e para a preservação do bioma cerrado brasileiro que é uma área muito rica em biodiversidade, protegida em apenas 2,2% de seu território, além disso, o uso medicinal da *S. guianensis* e de outras plantas, pode garantir o seu cultivo e a valorização da espécie que vem sendo apontada por estudiosos como espécie prioritária de conservação para a região do cerrado (VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

Mediante estes estudos e possibilidades apresentadas, a *S. guianensis* e o α -Bisabolol isolado de *S. guianensis*, podem ser compostos promissores contra a leishmaniose, pois são utilizadas como plantas medicinais na sabedoria popular há muitos anos. A pesquisa da atividade leishmanicida do óleo de *S. guianensis* e o α -Bisabolol isolado de *S. guianensis*, pode contribuir para novas perspectivas ao tratamento da leishmaniose cutânea, principalmente por tratar-se de uma planta de fácil obtenção e abundante no cerrado brasileiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial citotóxico do OE de *S. guianensis* e do α -Bisabolol isolado de *S. guianensis in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar a viabilidade de células basais Vero e de *L. amazonensis* tratadas com diferentes concentrações *in vitro*;

Determinar a concentração inibitória (IC₅₀) do OE de *S. guianensis* e do α -Bisabolol isolado de *S. guianensis* para tratamento *in vitro*;

Verificar o potencial de invasão celular de *L. amazonensis* após tratamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

O OE de *S. guianensis* e o α -Bisabolol derivado da *S. guianensis*, utilizados nos experimentos foram gentilmente cedidos pelos colaboradores do curso de Química, Professora Dra. Liliane Nebo e Professor Dr. Claudinei Silva. O OE da planta *S. guianensis* foi processado nos laboratórios de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Regional Jataí, GO.

O isolamento do α -Bisabolol foi realizado nos laboratórios de Química Analítica e Físico-química da UFG – Regional Jataí. Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos pertencente ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, em Uberlândia, Minas Gerais e a leitura das lâminas do ensaio de invasão foi realizada no laboratório de microscopia óptica do Centro Universitário Unicerrado – Goiatuba/GO.

3.2 - Produção e processamento do óleo essencial de *S.guianensis*

Para a produção do OE, folhas de *S. guianensis* foram coletadas em São Miguel do Anta, no Estado de Minas Gerais (MG), trituradas e submetidas a quatro horas de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. O óleo obtido foi recolhido juntamente com o hidrolato e extraído com diclorometano (3x10 mL) em funil de separação. As fases orgânicas foram secas com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido sob baixa pressão à 40°C em evaporador rotativo.

A massa do OE foi medida em balança analítica e os rendimentos expressos em relação à massa seca e em natura do material vegetal. A matéria seca foi determinada pela secagem de três alíquotas de aproximadamente 10g de cada amostra, em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ até massa constante. Ao final, o óleo essencial foi acondicionado em frascos de vidro e armazenados até o momento da realização dos ensaios.

3.3 Isolamento do α -Bisabolol

O α -Bisabolol foi isolado utilizando o OE das folhas de *S. guianensis* coletadas em São Miguel do Anta, MG. O isolamento se deu a partir de uma coluna cromatográfica (36cm

x 18mm) empacotada com sílica gel. Foram pesados 0,2 g de OE de *S. guianensis* e aplicados no topo da coluna. A eluição ocorreu em gradiente de hexano/éter etílico, com as seguintes proporções: 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5.

As frações obtidas foram avaliadas por cromatografia de camada delgada tendo como eluente hexano/éter etílico na proporção de 7:3 e o ácido fosfomolibdico como revelador. A identificação do α -Bisabolol foi realizada por meio da cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas em comparação com um padrão de α -Bisabolol, previamente caracterizado pelo Laboratório de Análises e Síntese de Agroquímicos (LASA) da Universidade Federal de Viçosa - UFV (DINIZ, 2014). O α -Bisabolol isolado por fim foi armazenado até o momento dos ensaios.

3.4 Parasitos

Foram utilizados promastigotas de *L. amazonensis*, na fase estacionária, cultivadas em meio BHI - Brain Heart Infusion, com a suplementação de soro fetal bovino (SFB) a 10%, mantidos a 26°C pelo Laboratório de Tripanosomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.5 Células hospedeiras

Para avaliar o efeito do OE de *S. guianensis* e do α -Bisabolol isolado de *S. guianensis*, foram utilizadas células basais Vero obtidas de fibroblastos de rim de macaco verde africano obtidas pelo Laboratório de Tripanosomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia, mantidas em garrafas com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), para crescimento e replicação em estufa a 37°C em 5% de CO₂.

3.6 Avaliação da citotoxicidade celular *in vitro*

Para verificar a atividade biológica dos compostos de *S. guianenses* e do α -Bisabolol isolado de *S. guianensis*, foi realizado um ensaio de viabilidade celular usando o método

colorimétrico sal de resazurina (Alamar Blue®) como indicador de metabolismo celular. Este método é capaz de indicar o metabolismo e o crescimento celular quando o indicador de redução-oxidação resazurina (Alamar Blue®) é adicionado à amostra e após um período de incubação a cor azul típica da resazurina se transforma em rosa, indicando que a resazurina foi metabolizada pelas células em resorufina (YAJKO et al., 1995).

As células Vero foram plaqueadas em placas de 96 poços na ordem de 2×10^4 células/poço em triplicata e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C em 5% de CO₂ para adesão das células, *overnight*. Em seguida, foram adicionados o OE de *S. guianenses* e o α -Bisabolol isolado, identificados como SG e AB, respectivamente. Para cada óleo foi preparado uma solução de 640 µg/mL em meio de cultura (DMEM). Após, os compostos foram adicionados à placa em concentrações crescentes de 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL, 256 µg/mL e 512 µg/mL.

Os controles foram organizados da seguinte forma: 1) Nos controles de viabilidade celular foram adicionados 100µL de DMEM; 2) Nos controles de diluição dos óleos com dimetilsulfóxido (DMSO) (1%) foram adicionados 99 µL de DMEM e 1 µL de DMSO; 3) Nos controles de morte celular foram adicionados DMSO a 30% (concentração padronizada previamente), sendo 30 µL de DMSO e 70 µL de DMEM; 4) Nos controles de reação da resazurina com meio de cultivo sem células foram adicionados 100 µL de DMEM; 5) Nos controles de reação das amostras com a resazurina foram adicionados 80 µL da solução mãe de cada óleo e 20 µL de meio (512 µg/mL).

Após 24 horas, foi acrescentado 8 µL/poço de sal de resazurina (Alamar Blue®) (3uM) em volume previamente padronizado para este tipo celular. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% CO₂ coberta com papel alumínio, evitando contato com a luz, *overnight*.

Em seguida, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa com comprimento de onda de 594nm. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem de viabilidade celular em relação aos poços controle (100%), determinando assim, a concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular, concentração inibitória - IC₅₀.

3.7 Atividade leishmanicida, *in vitro*, dos compostos

Para verificar a atividade leishmanicida *in vitro*, contra *L. amazonensis*, foi realizado teste de viabilidade no qual promastigotas de *L. amazonensis* foram plaqueadas em placa

de 96 poços na quantidade de 2×10^6 /poço em conjunto com concentrações crescentes de 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL, 256 µg/mL e 512 µg/mL dos compostos.

De forma semelhante ao ensaio com células Vero, os controles foram organizados da seguinte forma: 1) Nos controles de viabilidade celular foram adicionados 80 µL de BHI e 20 µL de parasitas; 2) Nos controles de diluição dos óleos com DMSO (1%) foram adicionados 79 µL de BHI, 20 µL solução de parasitos e 1 µL de DMSO; 3) Nos controles de morte celular foram adicionados 79 µL de meio, 1 µL de solução de Anfotericina B lipossomal à 5 mg/mL e 20 µL de parasitas; 4) Nos controles de reação da resazurina com meio de cultivo sem parasitas foram adicionados 100 µL de BHI; 5) Nos controles de reação das amostras com a resazurina foram adicionados 80 µL da solução mãe de cada óleo e 20 µL de meio.

O teste foi realizado em triplicata e as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 72 horas envoltas em papel alumínio e após este período foi adicionado o sal de resazurina por *overnight*. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 594 nm. Os resultados foram expressos em % de viabilidade.

3.8 Ensaio de invasão com os parasitos após tratamento

Após a realização do ensaio de citotoxicidade dos compostos, foi obtido valores de IC_{50} para SG e AB de acordo com o item 3.6, os quais foram utilizados para verificar a capacidade de invasão ativa de promastigotas de *L. amazonensis* em células Vero. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13mm em solução DMEM suplementadas com SFB 10% e solução de antibióticos, na quantidade de 2×10^5 células/poço, incubadas a 37°C e 5% de CO_2 *overnight* para adesão celular nas lamínulas. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e incubadas com promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária proporção de 10:1 parasitos/célula por 3 horas. Estes parasitos foram previamente tratados com SG na concentração de 131,5 µL em BHI ou AB na concentração de 94,61 µL em BHI, por 24 horas. Após esse período, foi realizada a lavagem das células com PBS por 3 vezes para retirada dos parasitos sobrenadantes que não se aderiram às células. Em seguida as células foram fixadas em solução Bouin por 15 minutos e coradas com Giemsa (SIGMA-ALDRICH 1:20) por 35 minutos. Em seguida as lamínulas

foram retiradas da placa e banhadas de forma sucessiva nos reagentes para desidratação (Acetona 100% - 2 vezes, 90% acetona + 10% xilol, 70% acetona + 30% xilol, 30% acetona + 70% xilol e xilol 100%) e após 12 horas de secagem foi realizada a análise em microscopia óptica considerando 300 células totais por lamínula.

3.9 Análise estatística

Para realização da análise estatística foi utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foi realizado teste de distribuição Gaussiano e no teste de comparação entre as amostras e o controle foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn's para múltiplas comparações. Para dados paramétricos foi realizado o teste de one-way ANOVA e Holm-Sidak's para testes de múltiplas comparações. Todos os experimentos foram realizados em duplicata com pelo menos dois experimentos independentes.

Para análise do IC₅₀ foram utilizados os testes de regressão não linear e a curva de dose resposta foi obtida utilizando o software GraphPad Prism (log [óleo essencial] vs. resposta – slope variável).

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes, em triplicata. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da Citotoxicidade celular

4.1.1 Atividade citotóxica do Óleo de *S. guianensis*

Para verificar o efeito de diferentes concentrações (4 – 512 µg/mL) do OE de *S. guianensis* foi realizado o teste de viabilidade celular utilizando células Vero.

Verificou-se que as células Vero demonstraram viabilidade de 100% nas concentrações de 4 – 32 µg/mL de SG. Porém, observou-se efeito citotóxico significativo em relação ao controle ($p < 0,05$) sobre as células nas concentrações de 256 e 512 µg/mL com taxa de viabilidade de 23% e 25% respectivamente (Figura 11).

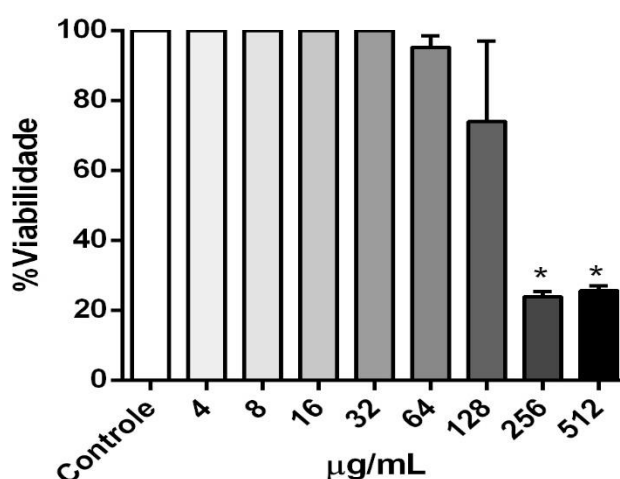


FIGURA 11: Viabilidade das células Vero frente ao óleo de *S. guianensis*. Células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM, tratadas com diferentes concentrações de SG (4 a 512 µg/mL). Após 72 horas, a viabilidade celular foi verificada pelo método de ensaio de resazurina (Alamar Blue®). Os ensaios foram realizados em pelo menos três ensaios independentes. * $p < 0,05$.

4.1.2 Atividade citotóxica do α -Bisabolol isolado

O α -Bisabolol isolado de *S. guianensis* (AB) foi testado em células Vero nas concentrações de 4 - 512 µg/mL. Observou-se que AB demonstrou citotoxicidade celular sobre células Vero frente as concentrações de 128 µg/mL (48% - $p < 0,05$), 256 µg/mL (16%

- $p < 0,002$) e 512 $\mu\text{g/mL}$ (14% - $p < 0,002$). Somente na concentração inicial de 4 $\mu\text{g/mL}$ que a viabilidade celular foi de 100% (Figura 12).

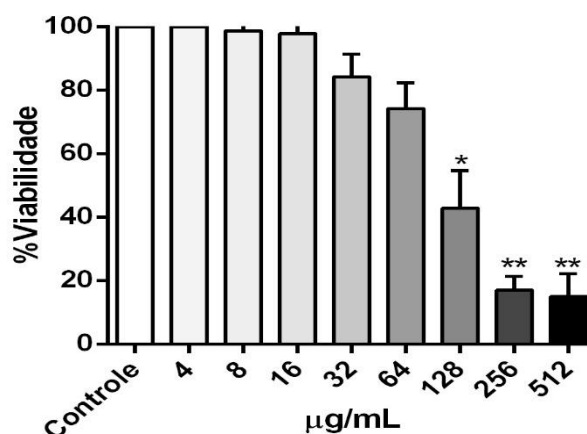


FIGURA 12: Viabilidade de células Vero frente a diferentes concentrações do óleo de α -Bisabolol. Células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM, tratadas com diferentes concentrações de AB (4 a 512 $\mu\text{g/mL}$). Após 72 horas, a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de resazurina (Alamar Blue®). Os ensaios foram realizados em pelo menos três ensaios independentes.

4.2 Atividade inibitória em 50% da viabilidade celular

Para a obtenção do índice de citotoxicidade de 50% - IC_{50} , foi construído um gráfico de concentração-resposta para cada óleo essencial e o composto isolado.

No ensaio de viabilidade celular, o IC_{50} foi calculado para SG e AB, indicando que o OE de SG inibe 50% do crescimento celular em 131,5 $\mu\text{g/mL}$, o AB apresenta atividade inibitória em 50% do crescimento celular na concentração de 94,61 $\mu\text{g/mL}$, conforme a Tabela 1 e a Figura 13.

Tabela 1. Citotoxicidade de SG e AB sobre células Vero.

Compostos testados	$\text{IC}_{50} \pm \text{DP}$ ($\mu\text{g/mL}$)
SG	$131,5 \pm 3,02$
AB	$94,61 \pm 3,48$

SG – OE *S. guianensis*. AB – α -Bisabolol. IC_{50} – Concentração inibitória em 50%. DP – desvio padrão.

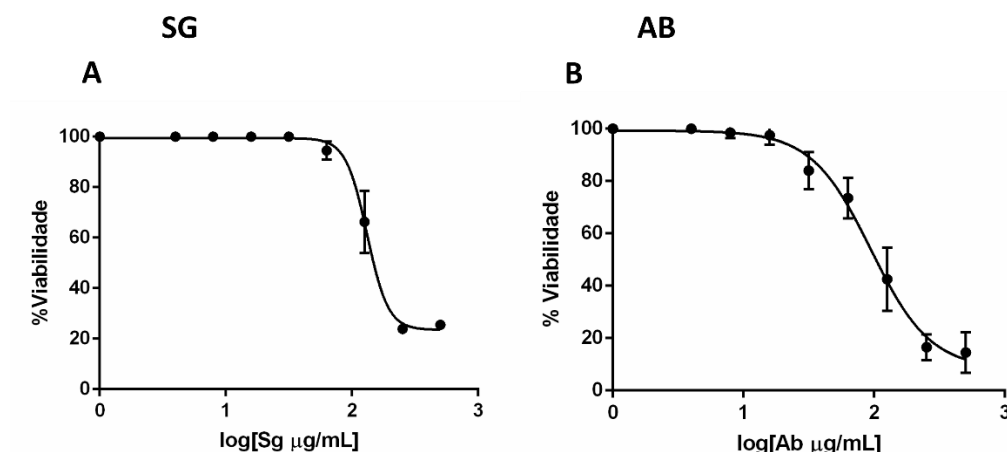


FIGURA 13: Curva de concentração-resposta para SG e AB. Para o cálculo do IC_{50} foi realizado um gráfico de concentração-resposta para SG e AB no qual R^2 foi considerado aceitável em cada curva ($R^2 > 0,800$).

4. 3 Atividade leishmanicida dos compostos

4.3.1 Atividade leishmanicida do SG

A atividade leishmanicida de SG foi testada contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* com concentrações variando de 4 a 512 $\mu\text{g/mL}$ e em seguida foi realizada a análise da atividade do parasito. Verificou-se que houve dano ao parasito em todas as concentrações testadas (Figura 14). No entanto, destaca-se que nas concentrações de 4 a 16 $\mu\text{g/mL}$ a atividade leishmanicida foi parcial: 37% em 4 $\mu\text{g/mL}$, 9% em 8 $\mu\text{g/mL}$ e 10% em 16 $\mu\text{g/mL}$.

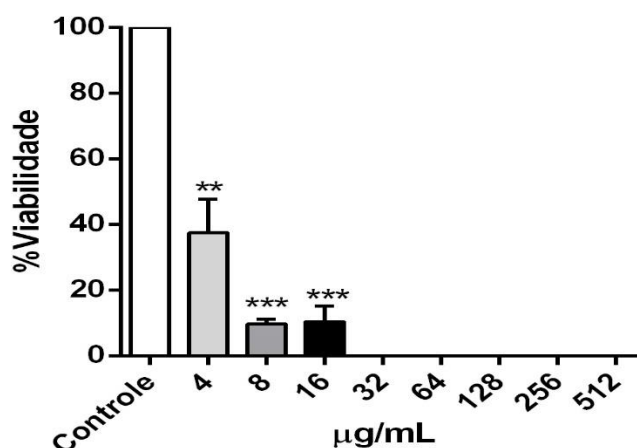


FIGURA 14: Atividade leishmanicida do SG. Promastigotas de *L. amazonensis* foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de SG (4 a 512 $\mu\text{g/mL}$). Após 72 horas, a

viabilidade dos parasitos foi verificada pelo método de ensaio de resazurina (Alamar Blue®). Os ensaios foram realizados em pelo menos três ensaios independentes.

4.3.2 Atividade leishmanicida do AB

Ao analisar a viabilidade para promastigotas de *L. amazonensis*, utilizando o AB, observou-se que houve dano ao parasito em todas as concentrações testadas, com taxa de 100% da viabilidade nas concentrações de 32 – 512 µg/mL (Figura 15). As concentrações iniciais demonstraram não inibir totalmente o crescimento dos parasitos, nas concentrações de 4 µg/mL, 8 µg/mL e 16 µg/mL houve o crescimento de 84%, 37% e 43% respectivamente.

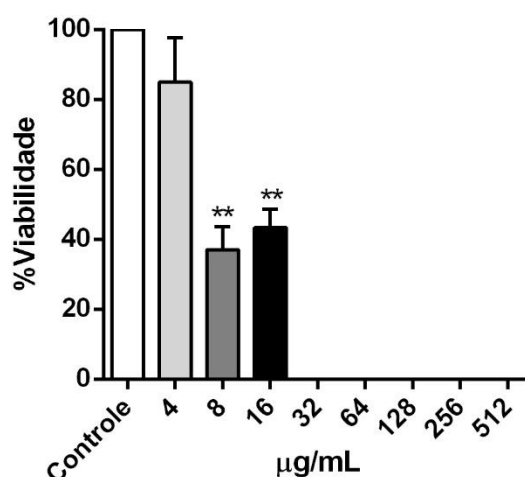


FIGURA 15: Atividade leishmanicida do AB. Promastigotas de *L. amazonensis* foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações de AB (4 a 512 µg/mL). Após 72 horas, a viabilidade dos parasitos foi verificada pelo método de ensaio de resazurina (Alamar Blue®). Os ensaios foram realizados em pelo menos três ensaios independentes.

4.4 Atividade inibitória em 50% da viabilidade dos parasitos após tratamento.

No ensaio de viabilidade dos parasitos, foi construído um gráfico de concentração-resposta para SG e AB, para a obtenção do IC₅₀. O óleo de SG inibe 50% do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* em 2,59 µg/mL e o AB apresentou atividade inibitória em 50% do crescimento dos parasitos em 7,84 µg/mL, conforme a Tabela 2 e a Figura 16.

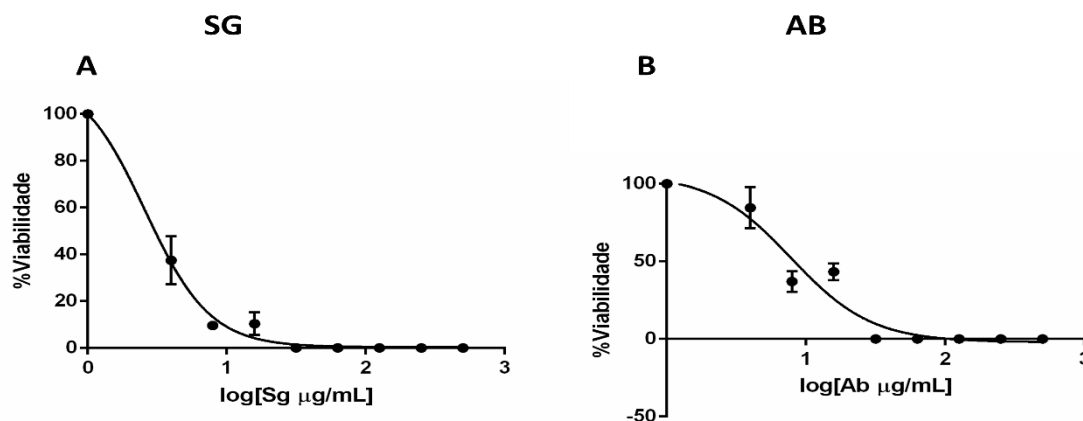


FIGURA 16: Curva de concentração-resposta para SG e AB. Para o cálculo do IC_{50} foi realizado um gráfico de concentração-resposta para SG e AB no qual R^2 foi considerado aceitável em cada curva ($R^2 > 0,800$).

Tabela 2. Atividade leishmanicida de SG e AB sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*

Compostos testados	$IC_{50} \pm DP$ ($\mu g/mL$)
SG	$2,59 \pm 1,42$
AB	$7,84 \pm 1,09$

SG – óleo de *S. guianensis*. AB – α -Bisabolol. IC_{50} – Concentração inibitória em 50%. DP – desvio padrão.

4.5 Ensaio de invasão dos parasitos após tratamento

Para análise da capacidade de invasão dos parasitos após tratamento com SG e OS, células Vero foram plaqueadas em placa de 24 poços com lamínulas circulares, os parasitos foram tratados com o IC_{50} de cada composto e deixados *overnight* e após o tratamento foram plaqueados junto às células para invasão, em seguida foram confeccionadas três laminas para leitura em microscopia óptica.

A leitura foi realizada observando o número de células infectadas por *L. amazonensis* (300 células/lamínula) em comparação ao controle (células e parasitos sem tratamento).

Os parasitos da amostra controle demonstraram capacidade de invasão celular (Figura 17A) e se aderiram à 97 células (Figura 18).

No controle, sem tratamento, 145 promastigotas de *L. amazonensis* se aderiram às células infectando-as (Figura 19), o que corresponde a um índice de 1,5 parasito/célula.

Os parasitos tratados previamente com SG demonstraram-se visivelmente reduzidos em número no interior das células, conforme evidenciado por microscopia óptica (Figura 17B) e infectaram apenas 5 células o que corresponde a 1,6% do total de células consideradas (Figura 18). A redução do número de parasitos aderidos às células também foi significativa demonstrando que apenas 6 parasitos preservaram sua infectividade após tratamento com SG (1,2 parasito/célula) conforme demonstrado na Figura 19.

Os parasitos tratados com AB também demonstraram redução no número e aspecto ao microscópio (Figura 17C). Estes parasitos foram capazes de infectar 14 células correspondendo a 4,6% do total de células consideradas (Figura 18). Após o tratamento com AB apenas 14 parasitos se aderiram às células (1 parasito/célula) conforme a Figura 19.

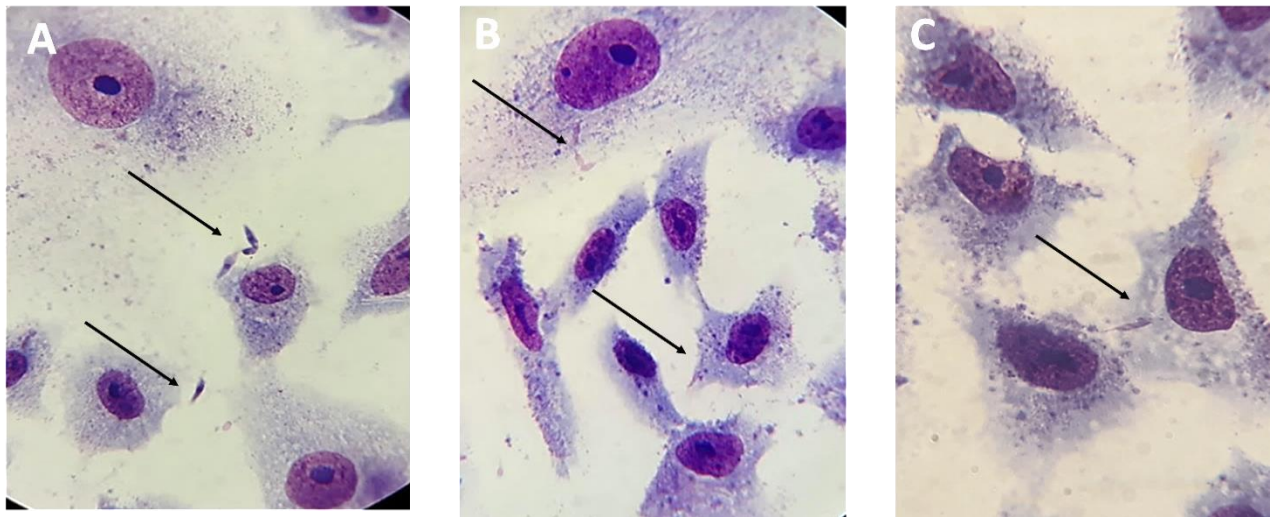


FIGURA 17: Leitura das lâminas em microscopia óptica. A – Leishmanias sem tratamento em evidência na lâmina controle. B – Leishmanias em evidência após tratamento com SG. C – Leishmanias em evidência após tratamento com AB. Fonte: Arquivo pessoal.

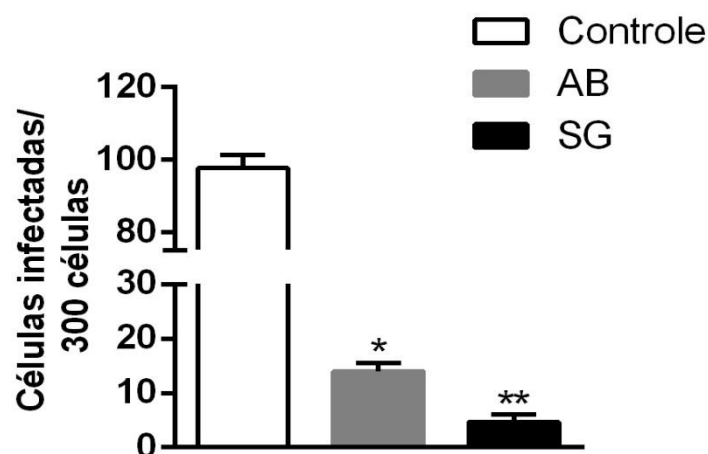


FIGURA 18: Infectividade de formas promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento. Os parasitos foram previamente tratados com as concentrações de IC₅₀ obtidas para células Vero (SG 131,5 µg/mL

e AB 94,61 $\mu\text{g/mL}$) e realizada leitura em microscopia óptica em comparação com o grupo controle. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$.

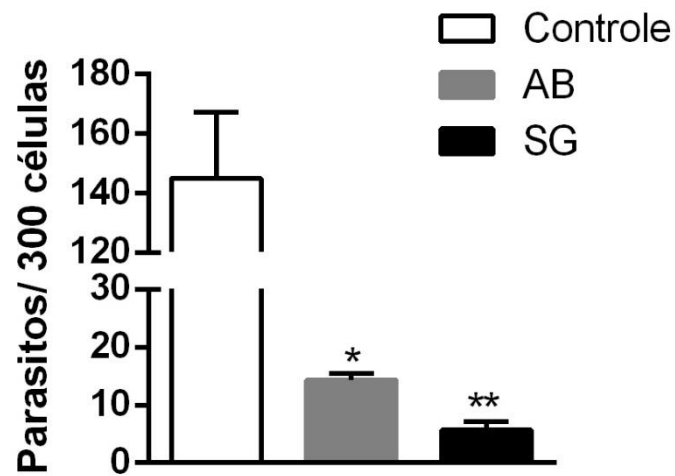


FIGURA 19: Número de parasitos presentes em 300 células após tratamento. Os parasitos foram previamente tratados com as concentrações de IC_{50} obtidas para células Vero (SG 131,5 $\mu\text{g/mL}$ e AB 94,61 $\mu\text{g/mL}$) e realizada leitura em microscopia óptica em comparação com o grupo controle. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

A LTA é considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas no mundo, devido ao alto coeficiente de detecção e por sua capacidade de produzir deformidades (BRASIL, 2017; OPAS/OMS, 2016). É uma doença endêmica em mais de 88 países e que atinge cerca de 2 milhões de novos casos por ano (MANCHENO-VALENCIA et al., 2017).

O tratamento da LTA é feito utilizando o antimonial pentavalente que é administrado por via EV, o que muitas vezes sugere a necessidade de internação do paciente para o tratamento, podendo causar efeitos adversos como arritmias cardíacas, insuficiência renal aguda, insuficiência hepática aguda, icterícia e/ou elevação de transaminases cinco vezes acima do limite superior, pancreatite aguda e/ou elevação de amilase e lipase cinco vezes acima do limite superior e óbitos. Por outro lado, há outras medicações que também podem ser usadas no tratamento da LTA como o Antimoniato de Meglumina e a Anfotericina B que também são de uso por via EV e como efeito adverso podem causar anorexia, comprometimento da função renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (BRASIL, 2017).

Neste contexto, há um interesse crescente pelo uso de produtos naturais contra doenças infecciosas, incluindo a leishmaniose, devido ao baixo custo de produção destes produtos e a possibilidade de redução dos efeitos adversos, além de vias de administração menos invasivas (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015).

Mediante o exposto, esta pesquisa teve como finalidade avaliar a viabilidade celular e a atividade leishmanicida do OE de *S. guianensis* e do α -Bisabolol isolado de *S. guianensis*, bem como a ação destes compostos sobre a capacidade infectiva dos parasitos.

Para a condução dos experimentos foi avaliado primeiramente o efeito citotóxico de SG e AB, sobre células Vero, pelo ensaio de resazurina, considerado um processo de fundamental importância e alta sensibilidade, uma vez que os componentes presentes em SG e AB, podem interferir na viabilidade das células basais, efeito este indesejável em um tratamento. Estas células foram tratadas com diferentes concentrações de SG ou AB (4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$).

Ao analisar os resultados, verificou-se que o OE de SG provocou redução da viabilidade celular nas concentrações de 128 $\mu\text{g/mL}$, 156 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a viabilidade reduziu significativamente nas concentrações de 512 $\mu\text{g/mL}$ e 256 $\mu\text{g/mL}$. Por

outro lado, ao avaliar o efeito do AB sobre a viabilidade de células Vero observou que entre as concentrações de 128 µg/mL e 512 µg/mL, AB provocou efeito citotóxico significativo.

De acordo com a “Classificação da citotoxicidade e atividade leishmanicida para extratos e frações derivados de plantas e produtos naturais”, elaborada pelo Programa de Estudos e Controle de Enfermidades Tropicais, pode-se definir um composto natural como muito tóxico se este demonstrar um IC₅₀ menor do que 10 µg/mL, para as concentrações com IC₅₀ com valores maiores do que 10 µg/mL e menores que 100 µg/mL o composto é considerado como tóxico, para valores de IC₅₀ menores do que 100 µg/mL ou até 1000 µg/mL a sua citotoxicidade é considerada moderada e para valores de IC₅₀ maiores do que 1000 µg/mL os compostos naturais são considerados como potencialmente não tóxicos (RIOS et al., 2008).

Desta forma pode se inferir que SG (IC₅₀ 131,5 µg/mL) pode ser considerado como OE com citotoxicidade celular moderada e AB (IC₅₀ 94,61 µg/mL) pode ser considerado como potencialmente tóxico.

Andrade e colaboradores em 2016, avaliaram 16 óleos essenciais incluindo o óleo de *S. guianensis* e demonstraram que a concentração citotóxica para este tipo de célula foi de 78,02 µg/mL para este óleo. Menezes (2017) avaliou a atividade citotóxica de α -Bisabolol isolado de camomila em concentrações variando de 1000 a 31,25 µM sobre células LLC-MK2 pelo método do MTT, e verificou efeito citotóxico (1000 µM e 500 µM respectivamente). Estudo realizado por Rottini e colaboradores (2015) também demonstrou atividade citotóxica do α -Bisabolol contra macrófagos J774.G8 com IC₅₀ de 14,82 µg/mL.

Mediante o exposto, infere-se que SG possui o melhor potencial de viabilidade sob a proliferação celular, sendo este o composto menos nocivo sob o teste desta pesquisa. A concentração de uso do OS para ensaios *in vitro* obtida foi de 131,5 µg/mL com crescimento celular de aproximadamente 73,93%.

Além do ensaio de viabilidade celular, foi realizado também ensaio da atividade leishmanicida de *S. guianensis* e do α -Bisabolol contra promastigotas de *L. amazonensis*, utilizando o ensaio de resazurina. Neste ensaio constatou-se que SG e AB apresentaram alguma atividade leishmanicida em todas as concentrações. O óleo de *S. guianensis* e o α -Bisabolol apresentaram inibição de 100% do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* a partir da concentração de 16 µg/mL.

O óleo essencial de *S. guianensis* foi testado por Andrade e colaboradores (2016) quanto a atividade inibitória do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* em concentrações variando de 30 a 500 µg/mL. Observou-se que o óleo de *S. guianensis* foi o

mais efetivo contra *L. amazonensis* inibindo o crescimento do parasito a partir da concentração de 48,55 µg/mL.

O α -Bisabolol (comercial) testado contra promastigotas de *L. amazonensis* no estudo de Rottini (2015), inibiu o crescimento do parasito de forma eficiente na concentração de 4,15 µg/mL. De forma semelhante, em um estudo realizado em 2010, o α -Bisabolol isolado de *Chamomilla recutita* foi testado contra *L. infantum* e demonstrou que a partir de 50 mg/mL foi capaz de inibir o crescimento do parasito (MORALES-YUSTE et al., 2010).

Com relação à atividade leishmanicida de SG, este apresentou IC₅₀ de 2,59 µg/mL e AB IC₅₀ de 7,84 µg/mL. De acordo com a classificação proposta por Rios e colaboradores (2008), os compostos SG e AB podem ser classificados como muito tóxicos para os parasitos (IC₅₀ < 10 µg/mL). Destaca-se que os resultados obtidos nesta pesquisa para o α -Bisabolol são semelhantes aos resultados apresentados por outros autores (ROTTINI et al., 2015; MORALES-YUSTE et al., 2010).

Dentre os compostos testados, o SG apresentou melhor valor de IC₅₀ (2,59 µg/mL) em comparação com a literatura, sugerindo a possibilidade de uso deste óleo em baixas concentrações e com efetividade, porém, AB demonstrou ser menos eficaz em pequenas concentrações contra *L. amazonensis* (IC₅₀ de 7,84 µg/mL).

Alguns autores sugerem que componentes de OE naturais, como derivados de terpenoides e o α -Bisabolol são ativos contra uma variedade de agentes patogênicos e que estes compostos podem agir na interação com as membranas celulares e levar os agentes patogênicos a morte (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015).

A atividade de óleos essenciais em parasitas se deve principalmente ao terpeno em sua composição pois estes são responsáveis pela característica hidrofóbica dos óleos essenciais e permitem a sua difusão através da membrana celular do parasita, o que afeta a via metabólica intracelular e as organelas do parasita, levando-os a perda de sua vitalidade (BORGES et al., 2012). Várias análises do óleo essencial de *S. guianensis* têm identificado uma variedade de compostos voláteis, incluindo monoterpenos e sesquiterpenos (DINIZ, 2014; VALENTINI et al., 2010; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010; ZOGHBI et al., 1998).

Com relação ao efeito em conjunto sobre os parasitos e as células Vero, SG foi tóxico para os parasitos e moderadamente citotóxico para as células. Destaca-se que a concentração de 32 µg/mL de SG inibiu 100% do crescimento dos parasitos sem causar nenhum dano às células.

No ensaio de Andrade e colaboradores (2016), o óleo de *S. guianensis* foi o mais citotóxico para as células testadas e no ensaio de Rottini e colaboradores (2015), o (-)- α -

bisabolol apresentou toxicidade celular (IC_{50} 14,82 $\mu\text{g/mL}$) e atividade leishmanicida semelhante ao resultado desta pesquisa (IC_{50} 4,15 $\mu\text{g/mL}$).

Corpas-López e colaboradores (2014), testaram α -Bisabolol isolado de *Matricaria chamomilla* L. (*Asteraceae*) infectando camundongos Balbc por via intraperitoneal com promastigotas estacionárias de *L. infantum* e *L. donovani* e realizou tratamento dos camundongos por via oral com diferentes doses de α -Bisabolol. O composto demonstrou atividade leishmanicida com IC_{50} de 39 $\mu\text{g/mL}$, reduzindo a carga parasitária no baço e fígado dos camundongos em 71,6% e 89,22% a 200 mg/Kg sem mostrar toxicidade, sendo mais eficaz do que o controle positivo tratado com antimoniato de meglumina.

Corpas-Lopéz e colaboradores (2016) também testaram uma formulação tópica para o tratamento de leishmaniose cutânea a base de α -Bisabolol isolado da camomila em hamsters sírios e observaram a redução da lesão a 56% em 2,5% e sua administração por via oral também não causou efeitos tóxicos ou colaterais. Os autores sugeriram que a atividade do α -Bisabolol se deve principalmente a presença de sesquiterpenos em sua composição.

Menezes (2017) sugere que o α -Bisabolol apresenta efeito antiparasitário com possível indução de apoptose e estresse oxidativo com associação da inibição da enzima tcGAPDH ao efeito biológico encontrado.

A partir das concentrações de IC_{50} obtidas nesta pesquisa, foi realizado então um ensaio de invasão com os parasitos previamente tratados com SG ou AB, considerando o ciclo evolutivo da leishmania no hospedeiro vertebrado, no qual a forma promastigota inicia o processo infeccioso ao ser inoculada na corrente sanguínea do hospedeiro, com o intuito de demonstrar o efeito dos compostos sobre a capacidade infectiva destes parasitos.

No ensaio de invasão, considerando 300 células por microscopia óptica, os parasitos tratados com SG infectaram 1,6% das células com uma proporção de 1,2 parasito/célula. Os parasitos tratados com AB infectaram 4,6% das células consideradas com uma média de 1 parasito/célula. Mediante estes dados pode-se inferir que os compostos utilizados demonstraram ação na infectividade do parasito impedindo que estes se internalizassem na maioria das células.

Estudo realizado por Rottini (2011) demonstrou que OE de *E. bracteolata* (louro cedrinha) testado contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* evitou a infecção de 38% das células (macrófagos) com uma média de 1,04 amastigota/célula, ao mesmo tempo, o α -Bisabolol isolado desta planta tornou possível a infecção de 86% das células com uma média de 1,78 amastigota/célula (ROTTINI, 2011). Outro estudo utilizando OE de açaí (fruto da palmeira *Euterpe oleracea*) contra *L. amazonensis* e *L. infantum* demonstrou que o óleo

reduziu o número de amastigotas internalizadas nas células em 68% para *L. amazonensis* e em 82% para *L. infantum* nas diluições de 0,08 µg/mL e 0,04 µg/mL respectivamente (SILVA et al., 2017).

Garcia e colaboradores (2017) testaram de forma semelhante o OE de *Aloysia gratissima* contra amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas e contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* não internalizadas. Este estudo demonstrou que a carga parasitária foi reduzida em 61% para amastigotas intracelulares tratadas com 1 µg/mL e em 85% para promastigotas não internalizadas tratadas com 2 µg/mL.

É importante ressaltar que o presente ensaio de invasão é o primeiro relato deste tipo de ensaio feito com *S. guianensis* e α -Bisabolol isolado de *S. guianensis*. Neste estudo pode ser observado a inibição de 98,4% de capacidade infectiva de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com SG (131,5 µg/mL) e inibição de 95,4 % da capacidade infectiva do mesmo parasito tratado com AB (95,4 µg/mL).

No estudo de Garcia e colaboradores (2017), a Anfotericina B promoveu a redução de 90% da taxa de infectividade para amastigotas de *L. amazonensis* e Rocha (2009) demonstrou o efeito da Anfotericina B na infecção de macrófagos por promastigotas de *L. amazonensis*, a qual foi capaz de inibir 100% da capacidade de invasão do parasito na concentração de 1 µg/mL. Os resultados de SG e AB demonstram que estes compostos são capazes de reduzir a capacidade de infecção dos parasitos de forma semelhante ao medicamento convencional em um ensaio *in vitro*, o que sugere um refinamento da técnica e ensaios *in vivo* para determinar a ação da *S. guianensis* e do α -Bisabolol a partir das concentrações obtidas nesta pesquisa.

Os compostos testados demonstraram de maneira geral viabilidade celular e atividade leishmanicida em baixas concentrações, evidenciando o seu potencial como novas fontes alternativas para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos para o tratamento da leishmaniose.

6. CONCLUSÕES

- Na análise da viabilidade de células Vero tratadas com diferentes concentrações de SG e AB, todos os compostos testados demonstraram potencial viabilidade celular. O óleo mais efetivo foi SG sendo o menos citotóxico para células Vero, seguido de AB que apresentou valor indicativo de toxicidade.
- No ensaio da atividade leishmanicida dos compostos contra promastigotas de *L. amazonensis*, tratadas com diferentes concentrações de SG e AB, os compostos testados demonstraram boa atividade leishmanicida sendo o SG também o mais ativo contra *L. amazonensis* inibindo o crescimento do parasito em 100% na maioria das concentrações testadas.
- Na análise da concentração inibitória em 50% (IC₅₀) para o teste de viabilidade celular e da atividade leishmanicida, as concentrações ideais de SG é de 131,5 µg/mL e 2,591 µg/mL respectivamente. Para AB o IC₅₀ foi 94,61 µg/mL e 7,84 µg/mL.
- No ensaio de invasão celular, SG reduziu a infecção dos macrófagos em 98,4% e o AB em 95,4%, resultados estes próximos ao medicamento convencional, indicando seu potencial leishmanicida.
- Destaca-se que o OE de SG demonstrou maior potencial em relação ao AB, demonstrando melhor ação leishmanicida e menor citotoxicidade.
- Conclui-se que os compostos utilizados apresentaram um bom desempenho quanto à viabilidade celular e potencial leishmanicida *in vitro* inibindo o crescimento do parasito na maioria das concentrações testadas com equivalência ao controle com Anfotericina B, o que sugere principalmente a *S. guianensis* e o α -Bisabolol como novas alternativas terapêuticas.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. W. S. et al. Insecticidal and Repellent Activity of *Siparuna guianensis* Aubl . (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PLoS ONE**, p. 1–14, 2015.
- ANDRADE, M. A. et al. Essential oils : in vitro activity against *Leishmania amazonensis* , cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–8, 2016.
- BALDISSERA, M. D. et al. A nanotechnology based new approach for *Trypanosoma evansi* chemotherapy: In vitro and vivo trypanocidal effect of (-)- α -bisabolol. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 156–160, 2016.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.
- BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. D. O.; CAMARGO, L. M. A. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**, v. 38, n. 2, p. 9–20, 2012.
- BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123–128, 2012.
- BRANDÃO, M. G. L. Plantas medicinais e fitoterápicos. **Dataplant**, 2013.
- BRASIL, M. D. S. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL, M. D. S. **Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar americana**. 2. ed. atu ed. [s.l.] Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL, M. D. S. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. 1a ed ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. 1 ed. ed. [s.l.] Ministério da Saúde, 2017.
- BRITO, M. E. F. DE et al. Review Article / Artigo de Revisão Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil : a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425–429, 2012.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 7, n. 3, p. 97–106, 2005.
- CHIARI, E. et al. In vitro screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 7, p. 636–638, 1996.
- COLARES, A. V. et al. In vitro antileishmanial activity of essential oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) baker. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.

2013, 2013.

CORPAS-LÓPEZ, V. et al. (-)- α -Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1202–1207, 2015.

CORPAS-LÓPEZ, V. et al. Effectiveness of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol in dogs with naturally acquired canine leishmaniosis: an exploratory clinical trial. **Veterinary Research Communications**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2018.

CUNHA, L. F. **PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO: TRIAGEM FITOQUÍMICA E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES NATIVAS DO MUNICÍPIO DE DIAMANTINA, REGIÃO DO VALE DO JEQUITINHONHA, MINAS GERAIS**. [s.l.] Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2016.

DAVID, C. V; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491–502, 2009.

DE CARLI, G. A.; TASCA, T. Diagnóstico e Identificação de Parasitos. In: DE CARLI, G. A. (Ed.). . **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 743–840.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DELMONDES, G. DE A. ET AL. Avaliação Da Citotoxicidade e Atividade Leishmanicida e Tripanocida de extratos de Passiflora Cincinnata Mast L. **Caderno de Cultura e Ciência**, v. 13, n. 88, p. 31–38, 2014.

DINIZ, J. A. **Siparuna guianensis Aublet COMO NOVA FONTE DE α -BISABOOL PARA O CONTROLE DE Rhipicephalus microplus**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2014.

FACUNDO, V. A. et al. Chemical constituents from three medicinal plants : Piper renitens , Siparuna guianensis and Alternanthera brasiliana. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.**, v. 22, n. 5, p. 1134–1139, 2012.

FOGANHOLI, J. N.; ZAPPA, V. Importância da Leishmaniose na Saúde Pública. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 17, 2011.

FRANÇA, I. S. X. DE et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev Bras Enferm**, v. 61, n. 2, p. 201–208, 2008.

GARCIA, M. C. F. et al. The in vitro antileishmanial activity of essential oil from Aloysia gratissima and guaiol , its major sesquiterpene against Leishmania amazonensis. **Parasitology**, 2017.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo. In: NEVES, D. P. (Ed.). . **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010a. p. 65–66.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D. P. (Ed.). . **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010b. p. 47–64.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

HASHIGUCHI, Y. et al. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health**, v. 44, n. 1, p. 2, 2016.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: Um mercado promissor. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.

LEITE, N. F. et al. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 522–528, 2013.

LUCA, V. D. DE et al. Utilização de plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra Furada , Santa Catarina , Brasil : uma abordagem etnobotânica. p. 59–65, 2014.

MACEDO, I. T. F. et al. Sazonalidade De Flebotomíneos Em Área Endêmica De Leishmaniose Visceral No Município De Sobral, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v. 18, n. 2, p. 67–74, 2008.

MANCHENO-VALENCIA, A. et al. Case report: disseminated cutaneous leishmaniasis (LCD). **Gaceta medica de Mexico**, v. 153, n. 2, p. 251–254, 2017.

MAPRIC. **Alpha Bisabolol**. Disponível em: http://www.mapric.com.br/anexos/boletim30_23082007_093049.pdf Acesso em 07 jun 2018.

MARINHO, D. S. et al. Health Economic Evaluations of Visceral Leishmaniasis Treatments: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003527, 2015.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MENEZES, R. R. P. P. B. DE. **EFEITO TRIPANOCIDA DO (-)-ALFA-BISABOLOL SOBRE A CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi***. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 67–84.

MIRANDA, T. M. DE et al. Descriptive study of American tegumentary leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 27–35, 2011.

MOHAMMADPOUR, I. et al. Lip leishmaniasis: a case series with molecular identification and literature review. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 96, 2017.

MONTANARI, R. M. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS**

ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE ANACARDIACEAE , SIPARUNACEAE E VERBENACEAE. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2010.

MORALES-YUSTE, M. et al. Activity of (-)- α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine**, v. 17, n. 3–4, p. 279–281, 2010.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percorso - NEMO**, v. 6, n. 1, p. 147–168, 2014.

NEGRI, G.; SANTI, D. DE; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.**, v. 22, n. 5, p. 1024–1034, 2012.

OPAS/OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. **Informe Leishmanioses**, v. 2, p. 1–4, 2016.

ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, p. 97–104, 2015.

PEIXOTO, A. L.; SANTOS, I. DA S.; MOURA, M. V. L. P. **Flora dos Estados de Goiás e Tocantins: Monimiaceae e Siparunaceae.** Goiânia: FUNAPE/PRPPG/UFG, 2011.

REIS, A. J. et al. Avaliação das atividades antifúngica, antimicobacteriana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. **Revista de epidemiologia e controle de infecção**, v. 6, n. Supl, 2016.

REMADI, L. et al. Clinical Presentation of Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **Dermatology**, v. 232, n. 6, p. 752–759, 2017.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica.** 3.ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RÍOS, Y. et al. Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). **Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**, v. 37, n. 2, p. 200–211, 2008.

ROCHA, M. N. **Desenvolvimento de espécies de Leishmania fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de L. amazonensis GFP como modelo para testes quimioterápicos.** [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou, 2009.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. DE. Levantamento Etnobotânico De Plantas Medicinais No Domíniado Cerrado Na Região Do Alto Etnobotanical Survey of Medicinal Plants in the Dominion of Meadows in the Region of the Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102–123, 2001.

RONDON, F. C. M. et al. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 185–191, 2012.

ROTTINI, MA. M. **Ação de óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaios experimentais in vitro com Leishmania amazonensis.** [s.l.] INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2011.

ROTTINI, M. M. et al. In vitro evaluation of (-)- α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 66–72, 2015.

SANTOS-LIMA, T. M. et al. Plantas medicinais com ação antiparasitária: Conhecimento tradicional na etnia Kantaruré, aldeia Baixa das Pedras, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 240–247, 2016.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SILVA, B. J. M. DA et al. Selective effects of *Euterpe oleracea* (açai) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania infantum*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. November 2017, p. 1613–1621, 2018

SILVA, L. E. DA; VALENTINI, C. M. A.; BARROS, W. M. DE. Siparuna guianensis : obtenção do óleo essencial e avaliação do potencial farmacológico. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. August, p. 59–65, 2015.

SOUZA, C. D. DE; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135–142, 2006.

TOLEDO, A. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7–13, 2003.

VALENTINI, C. M. A. et al. Uso e conservação da negramina (*Siparuna guianensis* Aubl .) em Bom Sucesso , Várzea Grande-MT. **Interações**, v. 10, n. 2, p. 195–206, 2009.

VALENTINI, C. M. A. et al. VARIAÇÃO ANUAL DO RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DA *Siparuna guianensis* AUBLET. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1506–1509, 2010.

VALENTINI, C. M. A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): Uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 96–104, 2010.

YAJKO, D. M. et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2324–2327, 1995.

ZOGHBI, M. DAS G. B. et al. Essential Oils of *Siparuna guianensis* Aubl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. August 2014, p. 543–546, 1998.