

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**Ação de óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaios
experimentais *in vitro* com *Leishmania amazonensis*.**

MARIANA MARGATTO ROTTINI

Rio de Janeiro
2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R851

Rottini, Mariana Margatto.

Ação de óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaios experimentais *in vitro* com *Leishmania amazonensis*. / Mariana Margatto Rottini. – Rio de Janeiro, 2011.

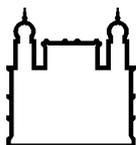
xii, 76 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2011.

Bibliografia: f. 66-76

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Plantas. 3. Óleos essenciais. 4. Atividade leishmanicida. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Medicina Tropical

MARIANA MARGATTO ROTTINI

**Ação de óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaios
experimentais *in vitro* com *Leishmania amazonensis*.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Dra. Kátia da Silva Calabrese

RIO DE JANEIRO

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Medicina Tropical

MARIANA MARGATTO ROTTINI

**Ação de óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaios
experimentais *in vitro* com *Leishmania amazonensis*.**

ORIENTADOR: Dra. Kátia da Silva Calabrese

Aprovada em: 31 / agosto / 2011

EXAMINADORES:

Dr^a. Celeste da Silva Freitas de Souza
Dr. Márcio Galdino dos Santos
Dr. Sérgio Coutinho Mendonça

SUPLENTE:

Dr. Reginaldo Brazil

Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2011.

“A minha Mãe”

Agradecimentos

À minha família, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha tia Izabel pela ajuda infinita e por tudo que teve que aprender para me ajudar.

À Dra. Kátia Calabrese pela atenta orientação, amizade e carinho.

Ao Dr. Sylvio Celso pela oportunidade e pelo aprendizado no laboratório.

À Dra. Celeste Freitas por me ensinar como funciona um laboratório e pelas inúmeras ajudas.

Aos amigos do laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Luiz Otávio, Luiz d'Escoffier, Tânia Zaverucha, Luciana Pereira, Caroline, Carolina, Bruno, Fernando Almeida, Daiana Haroim, pelas idéias, conselhos, conversas, cálculos e ajuda na realização dos experimentos.

As amigas Cupricas, Mariana Almeida, Flávia Cardoso e Caroline Almeida, pela ajuda, brincadeiras, conversas e por se tornarem minhas grandes amigas.

À Dra. Ana Cláudia Amaral, Aline e Arith, do laboratório de Produtos Naturais (Farmanguinhos), pelo auxílio com os óleos essenciais e realização das análises cromatográficas.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Resumo

As leishmanioses são um conjunto de doenças de natureza crônica provocadas por parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, que podem causar lesões dérmicas ou, dependendo da espécie do parasito, podem também acometer órgãos internos tais como fígado, baço e medula óssea. As opções de tratamento disponíveis para a leishmaniose apresentam problemas envolvendo a eficácia além de inúmeros efeitos colaterais e casos de resistência relacionados aos principais fármacos. Isso tem incentivado a pesquisa de novos agentes com características leishmanicidas, que apresentem menos efeitos colaterais. Assim, a utilização de produtos naturais, derivados de plantas medicinais, vem despertando o interesse de pesquisadores para a busca de tratamentos alternativos, principalmente, para a leishmaniose cutânea. Alguns óleos essenciais ou compostos isolados, obtidos de plantas, têm mostrado, em ensaios experimentais, efetiva ação leishmanicida, o que faz desses compostos opções promissoras no tratamento da leishmaniose cutânea. No presente trabalho avaliamos, *in vitro*, a atividade leishmanicida e a citotoxicidade de diferentes óleos essenciais como: *Citrus limon*, *Citrus aurantium*, *Eucalyptus globulus*, *Endlicheria bracteolata* e do α -bisabolol contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Nossos resultados demonstraram que todos os óleos essenciais pesquisados apresentaram atividade leishmanicida contra as formas promastigotas. Além disso, o óleo essencial de *E. bracteolata* e o α -bisabolol demonstraram uma excelente atividade contra as formas amastigotas intracelulares, o que indica serem estes, compostos promissores para o desenvolvimento de um tratamento alternativo para a leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, plantas, óleos essenciais, atividade leishmanicida.

Abstract

Leishmaniasis are a group of chronic diseases caused by an obligate intracellular parasite of the *Leishmania* genus. These parasites can cause skin lesions or, depending on the parasite species, can also affect internal organs such as liver, spleen and bone marrow. Leishmaniasis treatment have several issues that involves lack of effectiveness due to cases of drug resistance, and numerous side effects. These problems have encouraged the search for new anti-leishmanial compounds. Therefore, the use of natural products, derived from medicinal plants, has raised the interest of researchers in the quest for on alternative treatment for cutaneous leishmaniasis. Some essential oils or isolated compounds obtained from plants have shown, an effective anti-leishmanial action in experimental studies, making these compounds promising options for the treatment of cutaneous leishmaniasis. For this reason, the present study has evaluated the anti-leishmanial activity and cytotoxicity of the following different essential oils: *Citrus limon*, *Citrus aurantium*, *Eucalyptus globulus*, *Endlicheria bracteolata* and α -bisabolol. The activity against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* was tested *in vitro*. Our results showed that all essential oils above showed anti-leishmanial activity against promastigotes. The essential oil of *E. bracteolata* and α -bisabolol showed also an excellent activity against intracellular amastigotes, indicating that they are promising compounds for the development of an alternative treatment for cutaneous leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, plants, essential oils, leishmanicidal activity.

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Leishmaniose – considerações gerais	14
1.2. Tratamento.....	16
1.3. Produtos de origem vegetal.....	18
1.4. Óleos voláteis.....	19
1.5. Terpenos.....	20
1.5.1. <i>Matricaria chamomilla</i> – α -bisabolol.....	21
1.5.2. <i>Citrus aurantium</i> e <i>Citrus limon</i> – Limoneno.....	22
1.5.3. <i>Eucalyptus globulus</i> - 1,8 – cineol.....	23
1.5.4. <i>Endlicheria bracteolata</i> – Guaiol.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Parasitos.....	29
3.1.1. Isolamento do parasito.....	29
3.2. Cultivo celular.....	29
3.3. Óleos essenciais.....	29
3.3.1. Obtenção do óleo essencial da <i>Endlicheria bracteolata</i>	30
3.3.2. Coleta da planta.....	30
3.3.3. Extração do óleo essencial.....	30
3.4. Análise em CG/EM.....	30
3.5. Atividade leishmanicida, <i>in vitro</i> , dos óleos essenciais e do α -bisabolol contra promastigotas.....	30
3.6. Citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	31
3.7. Atividade leishmanicida do óleo essencial de <i>E. bracteolata</i> e α -bisabolol contra amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	32

3.7.1. Avaliação da infecção de células.....	32
3.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	32
3.8.1. Microscopia eletrônica de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	33
3.8.2. Microscopia eletrônica de transmissão de formas amastigotas intracelulares.....	33
3.9. Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Análise dos óleos essenciais.....	35
4.2. Atividade dos óleos essenciais e do α -bisabolol contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	38
4.3. Citotoxicidade celular dos óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaio <i>in vitro</i>	40
4.4. Atividade leishmanicida do óleo essencial de <i>E. bracteolata</i> e α -bisabolol contra amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	41
4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	44
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão de formas amastigotas intracelulares.....	49
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	micrograma
μL	microlitro
CC ₅₀	concentração citotóxica 50%
CG	cromatografia gasosa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
EM	espectrometria de massas
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CLAE/RMN	cromatografia líquida de alta eficiência a acoplada ressonância magnética nuclear
DMEM	meio Eagle Dulbecco modificado
IC ₅₀	concentração inibitória de 50% da população
IPP	isopentenil-pirofosfato
NO	óxido nítrico
PBS	tampão fosfato salino
PFA	paraformaldeído
RMN	ressonância magnética nuclear
ROS	espécies reativas de oxigênio
Sb ^{III}	antimônio trivalente
Sb ^V	antimônio pentavalente

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial de <i>Citrus aurantium</i> .	29
Tabela 2 - Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial de <i>Citrus limon</i> .	30
Tabela 3 - Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> .	30
Tabela 4 - Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do α – bisabolol.	30
Tabela 5 - Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial das folhas de <i>Endlicheria bracteolata</i> .	31
Figura 1 - Gráfico de inibição de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com os óleos essenciais de <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus aurantium</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Endlicheria bracteolata</i> e do α - bisabolol, nas concentrações de 1,87 a 60 μ g/mL.	32
Figura 2 - Gráfico da citotoxicidade celular de macrófagos J774.G8 incubados por 24 horas com os óleos essenciais ou o α -bisabolol, nas concentrações de 1,87 a 60 μ g/mL	34
Figura 3 – (A) Macrófagos de linhagem J774.G8, infectados com <i>L. amazonensis</i> , após 24 horas de infecção. (B e C) Macrófagos de linhagem J774.G8, infectados com <i>L. amazonensis</i> , tratados com α -bisabolol ou com <i>E. barcteolata</i> e analisados por microscopia de luz.	42

Figura 4 – Gráfico mostrando a porcentagem de amastigotas intracelulares viáveis, após 24h de tratamento com α -bisabolol ou com <i>E. bracteolata</i> .	43
Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> não tratadas.	44
Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com óleo essencial de <i>C. limom</i> por 24 horas.	45
Figura 7 - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com óleo essencial de <i>C. aurantium</i> , por 24 horas.	46
Figura 8 - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com α -bisabolol, durante 24 horas.	47
Figura 9 - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com óleo essencial de <i>E. bracteolata</i> durante 24 horas.	48
Figura 10 - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> incubadas com óleo essencial de <i>E. bracteolata</i> durante 24 horas.	49
Figura 11 - Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8, não infectados e não tratados.	50
Figura 12 - Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8, infectados com <i>L. amazonensis</i> .	51
Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8, não infectados mas tratados com α -bisabolol	52

ou com *E. bracteolata*.

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8 infectados com *L. amazonensis*, e tratados com α -bisabolol ou com *E. bracteolata*. 53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose – considerações gerais

As leishmanioses são doenças endêmicas que constituem um grave problema de saúde pública, ameaçando cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países (Neves *et al.* 2009 apud Reguera *et al.* 1998). No Brasil, a incidência desta doença de 1990 a 2005 foi de aproximadamente 19 casos em cada 100 mil indivíduos, sendo quase 90% destes casos de forma cutânea (Neves *et al.* 2009).

As leishmanioses são causadas por parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976), família Trypanosomatidae (Doflein, 1901, emend. Grobben, 1976), gênero *Leishmania* (Ross, 1903), os quais são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por insetos flebotomíneos. Esses parasitos apresentam-se principalmente sob as formas amastigotas nos hospedeiros vertebrados e promastigotas nos hospedeiros invertebrados.

Segundo Lainson e Shaw (1987) as diferenças de comportamento dos parasitas no organismo do inseto vetor permitiram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros: o subgênero *Viannia* (Lainson e Shaw, 1987), o qual engloba parasitos que se desenvolvem no intestino posterior do inseto vetor, e o subgênero *Leishmania* (Saf'janova, 1982), englobando as espécies que se desenvolvem no intestino anterior. No Novo Mundo são reconhecidas algumas espécies de *Leishmania* pertencentes a esses dois subgêneros, responsáveis pelas leishmanioses (Lainson e Shaw, 1987 e 1992):

Subgênero *Leishmania*

Leishmania chagasi Cunha e Chagas, 1937

Leishmania mexicana Biagi emend. Garnham, 1962

Leishmania pifanoi Medina e Romero, 1959 emend. Medina e Romero, 1962

Leishmania hertigi Herrer, 1971

Leishmania amazonensis Lainson e Shaw, 1977

Leishmania venezuelensis Bonfante-Garrido, 1980

Subgênero *Viannia*

Leishmania braziliensis Vianna, 1911 emend. Matta 1916

Leishmania peruviana Velez, 1913

Leishmania guyanensis Floch, 1954

Leishmania panamensis Lainson e Shaw, 1972

Leishmania lainsoni Silveira e cols. 1987

Leishmania naiffi Lainson e Shaw, 1989

Leishmania shawi Lainson e cols. 1989

Leishmania colombiensis Kreutzer e cols. 1991

Leishmania lindenbergi Silveira e cols. 2002

Os vetores das leishmanioses são fêmeas de pequenos dípteros que possuem características específicas como, o corpo revestido por cerdas e coloração clara (castanho claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas (MS, 2003).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas de flebotomíneos fazem seu repasto sanguíneo em mamíferos infectados e ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No intestino médio do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas que se diferenciam em formas flageladas denominadas de promastigotas procíclicas. Essas formas se replicam intensamente por divisão binária e através do processo de metaciclogênese diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide do inseto vetor (SVS, 2003; Sacks & Perkins, 1985). Assim, durante um novo repasto sanguíneo, essas formas infectivas são transmitidas a um novo hospedeiro. No novo hospedeiro, são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente macrófagos. A partir daí, no interior do macrófago, dentro do fagolisossomo, as promastigotas transformam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento da célula, liberando as amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos (Murray *et al.*, 2005; MS, 2003).

As manifestações clínicas da doença dependem de interações complexas relacionadas ao parasito, a resposta imunológica e a genética do hospedeiro, entre outros fatores (Handman, 2002). Como consequência temos um espectro de efeitos que podem variar desde infecções assintomáticas ou subclínicas a lesões tardias de mucosas, até o envolvimento generalizado do sistema fagocítico mononuclear (Sacks *et al.* 1993; Pearson & Souza 1996). Em função do caráter espectral da doença, várias formas clínicas estão incluídas no termo leishmanioses, mais notavelmente as leishmanioses cutânea, mucosa e visceral que resultam respectivamente da replicação dos parasitos no sistema linfomonocitário da derme, da mucosa oronasofaríngea e de forma sistêmica, respectivamente (Herwaldt, 1999). Em todas as formas clínicas, os macrófagos são os principais alvos de replicação intracelular do parasito e a clínica da doença é determinada tanto pela resposta imunoinflamatória do hospedeiro quanto

pela espécie do parasito e a infecção tecidual persistente é característica da leishmaniose (Murray *et al.*, 2005).

A forma cutânea da leishmaniose é a mais comum e representa 50 a 75% dos novos casos registrados. Noventa por cento desses casos cutâneos ocorrem no Afeganistão, Algéria, Brasil, Iran, Perú, Arabia Saudita e Síria. A forma mucosa, uma forma secundária das lesões cutâneas, que pode destruir as mucosas das vias aéreas e digestivas superiores, encontra sua maior frequência no Brasil, seguido da Bolívia e Peru (WHO, 1998).

1.2 Tratamento

No início do século passado, mais precisamente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna, observou que o antimônio trivalente (Sb^{III}), o tártaro emético, era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar. Depois de alguns anos, na Itália, foi confirmada a eficácia deste fármaco no tratamento da leishmaniose visceral. Entretanto, devido aos graves efeitos colaterais tóxicos, associados ao emprego de tártaro emético, este foi sendo substituído pelo antimônio pentavalente (Sb^{V}).

Em 1920, Bramachari desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, o uréia estibamina, um derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio pentavalente sódico, conhecido comercialmente como Pentostam® (Glaxo). Entretanto, foi durante a Segunda Guerra Mundial, que surgiu na França um medicamento alternativo, o antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como Glucantime® (Aventis) ou antimoniato de meglumina (Rath *et al.*, 2003).

Até hoje pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dos antimônios, embora haja indícios de que o antimônio trivalente (Sb^{III}) seja substancialmente mais potente do que o antimônio pentavalente (Sb^{V}) contra formas promastigotas e amastigotas do parasito. Estudos sugerem que o antimônio pentavalente (Sb^{V}) seja uma pró-droga que, quando convertido em antimônio trivalente (Sb^{III}) por uma conversão metabólica intramacrofágica, transforma-se em droga ativa (Rath *et al.*, 2003). Assim o antimônio trivalente (Sb^{III}) agiria interferindo nos processos bioenergéticos do parasito. O fármaco interfere no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e glicólise do parasito, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelulares (Mishra *et al.*, 2009). Contudo, o maior problema associado à terapia com os antimônios está relacionado à sua toxicidade e a resistência adquirida a estes fármacos. Acredita-se que alguns mecanismos moleculares de resistência ocorram por interferência

durante o processo de redução deste fármaco da forma pentavalente (Sb^{V}) para a forma trivalente (Sb^{III}) (Gourbal *et al.*, 2004). No entanto, ainda hoje, as principais drogas indicadas para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes. Fármacos de segunda escolha como a anfotericina B e a pentamidina são utilizados como tratamento em alguns casos (Monzote, 2007; Amato *et al.*, 1998; Herwaldt & Berman, 1992; Gadelha *et al.*, 1990).

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo, muito utilizado como antifúngico. Seu mecanismo de ação baseia-se na sua afinidade com os esteróides, principalmente ergosterol, formando poros aquosos na membrana celular. Estes poros fazem com que a célula perca íons, levando a lise celular (Brajtburg *et al.*, 1996). Já a pentamidina é um antiprotozoário cujo o mecanismo de ação parece envolver a inibição do transporte de arginina e também, por sua capacidade de ligar-se ao DNA do parasito, provocando assim, desintegração e colapso da membrana mitocondrial (Bray *et al.*, 2003).

Embora o tratamento com o antimonial pentavalente seja na maioria das vezes efetivo e indicado, algumas desvantagens devem ser consideradas, tais como: o modo de administração parenteral, a longa duração e custo elevado do tratamento, a toxicidade, a contra indicação para cardiopatas e nefropatas e a indução de resistência nos parasitos (Mayrink *et al.*, 2006; Grögl *et al.*, 1989). Essas desvantagens também ocorrem com as drogas de segunda escolha, o que determina que a administração das mesmas seja cuidadosamente monitorada por serviços médicos especializados.

Devido a todas essas desvantagens e dificuldades no tratamento com as principais drogas, tem havido um crescente interesse na busca de novos agentes com características leishmanicidas que apresentem menos efeitos colaterais (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001, Morale-Yuste *et al.*, 2010). Com isso, houve um maior desenvolvimento na pesquisa de produtos naturais com atividades contra protozoários. Nesse sentido, algumas plantas começaram a ser utilizadas no tratamento de algumas doenças, principalmente doenças cutâneas como a leishmaniose cutânea (Monzote *et al.*, 2007^a). O crescente interesse científico no estudo e avaliação de plantas utilizadas nas preparações de remédios populares forneceu à medicina moderna uma grande variedade de substâncias eficazes que podem ser utilizadas para o tratamento de doenças parasitárias (Monzote *et al.*, 2007^c).

1.3 Produtos de origem vegetal

Os produtos de origem vegetal fazem parte da vida do homem desde os primórdios como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário e ainda como meio restaurador da saúde. Contudo, nos dias de hoje, eles representam mais uma alternativa dentre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de serem renováveis. Além disso, numerosos produtos de origem vegetal têm sido empregados na medicina popular, como tentativa de controle das mais diversas doenças como, bronquites, pneumonia, úlcera e diarreia (Lima *et al.*, 2006, Schenkel *et al.*, 2004).

Em todo o mundo, o uso de plantas medicinais ainda contribui de forma significativa para os cuidados primários à saúde. No Brasil, um número significativo de plantas tem sido utilizado na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos no tratamento de infecções comuns, embora, existam poucas evidências científicas comprovando a eficácia dos mesmos. Contudo, a medicina tradicional ainda é amplamente utilizada por pessoas que vivem no interior do país. Sob este aspecto, verifica-se que a fitoterapia vem crescendo no Brasil, ganhando importância econômica devido a sua popularidade como alternativa nos cuidados com a saúde (Lima *et al.*, 2006).

No início do século passado, os produtos de origem vegetal começaram a ser estudados e estabeleceu-se uma tendência na utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos”. A partir dos anos 80, dificuldades como o lento desenvolvimento e alto custo para se chegar aos componentes ativos, devido aos processos trabalhosos para a separação e purificação dos produtos naturais e para a sua elucidação estrutural em busca de novos fármacos, foram sendo ultrapassadas. Através de avanços técnicos significativos, tanto no desenvolvimento de *screening*, como nas técnicas de isolamento e elucidação estrutural, estes novos métodos permitiram, em pouco tempo, avaliar um número elevado de amostras quanto à atividade sobre alvos específicos, enzimas, receptores, determinadas células ou organismo. O desenvolvimento de técnicas cromatográficas e técnicas de elucidação estrutural, particularmente relacionados com a ressonância magnética nuclear (RMN) e com a espectrometria de massas (EM), também têm sido considerados como capazes de acelerar a obtenção de novos protótipos e tornar mais fácil e rápida as tarefas que condicionavam um lento desenvolvimento dos projetos (Schenkel *et al.*, 2004).

Novas possibilidades analíticas, como a análise de óleos voláteis através da aplicação da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e uso de técnicas

combinadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/EM) e (CLAE/RMN), permitiram maior rapidez na busca de novas substâncias ativas e na obtenção de informações preliminares sobre constituintes em amostras complexas. Tais tecnologias têm determinado o ressurgimento do interesse na investigação de produtos naturais como possíveis fontes de novos protótipos (Schenkel *et al.*, 2004).

1.4 Óleos Voláteis

Os óleos voláteis, também denominados óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas que são obtidos de partes de plantas. A designação de óleos deriva de algumas características físico-químicas principalmente por serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra, importante característica, é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo, por isso, também chamados de essências. Eles são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, e recebem por isso a denominação de óleos etéreos. Em geral, os óleos voláteis não são muito estáveis principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (Simões & Spitzer, 2004).

Os constituintes dos óleos voláteis variam desde terpenos ou terpenóides, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações e, normalmente, um deles é o composto majoritário e os outros estão em menores teores ou até mesmo em baixas quantidades (Simões & Spitzer, 2004).

Os óleos voláteis podem estar estocados em diferentes partes das plantas, tais como: flores, folhas, cascas dos caules, madeira, raízes, frutos ou sementes. Embora, qualquer parte de uma planta possa acumular óleos voláteis, a composição destes pode variar segundo sua localização. Além disso, dependendo da época da coleta, condições climáticas e tipo de solo pode haver variação significativa na composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal (Simões & Spitzer, 2004).

Alguns dos metabólitos obtidos a partir de plantas, que podem ser utilizados no tratamento de doenças causadas por protozoários, incluem os alcalóides, as quinolonas e os terpenóides (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001). Quimicamente, a grande maioria dos

óleos voláteis é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo este último predominante (Simões & Spitzer, 2004).

Recentes trabalhos publicados com óleos essenciais relatam a sua atividade biológica e/ou de seus compostos majoritários isolados, contra protozoários. Em estudo publicado por Ueda-Nakamura e colaboradores em 2006, foram demonstrados os efeitos do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contra formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados dos experimentos, *in vitro*, demonstraram que parasitos incubados com 100µg/ml desse óleo foram totalmente destruídos. Monzote *et al.*, (2007), também evidenciaram, *in vitro*, a atividade do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* contra *Leishmania donovani*. Outros trabalhos semelhantes mostram a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Artemisia absinthium*, *Echinops kebericho* (Tariku *et al.*, 2011) e da *Lippia sidoides Cham.* (Medeiros *et al.*, 2011). Tais resultados demonstram que os óleos essenciais, derivados de plantas, representam fontes promissoras de compostos que poderão, futuramente, serem empregados como tratamento alternativo da leishmaniose cutânea. E em razão da limitada disponibilidade de medicamentos eficazes, a maioria das pessoas que vivem em áreas onde a doença é endêmica dependem em grande parte de tratamentos realizados pela medicina tradicional e popular (Monzote *et al.*, 2007^b). Com isso, investimentos nesta área tornam-se importantes para o conhecimento e obtenção de matéria-prima ou o desenvolvimento de outras classes de substâncias ativas com maior eficácia e menos efeitos colaterais.

1.5 Terpenos

Como citado anteriormente, os terpenos são compostos lipofílicos que formam uma diversificada classe de substâncias derivadas de plantas (Morale-Yuste, 2010, Sikkema, 1995) e constituem a maior família de produtos naturais. Um número superior de 22.000 compostos desta classe estão descritos na literatura, e o número de estruturas definidas tem duplicado a cada década, desde 1970 (McGarvey, 1995). O termo terpenos é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidade de isopreno (Farmacognosia, 2004). A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP), a unidade básica na formação dos terpenos. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono (C₅). A molécula de IPP e seu isômero dimetilalil-pirofosfato formam *trans*-geranil-pirofosfato, a partir do qual se formam os demais terpenos. Os principais terpenos formados são: os monoterpênicos (C₁₀) que são formados a partir do acoplamento de duas unidades de isopreno e os sesquiterpenos (C₁₅) que

são formados a partir da montagem de três unidades de isopreno. Os terpenos que contêm oxigênio são chamados de terpenóides (Bakkali *et al.*, 2008; Farmacognosia, 2004)

Os terpenos possuem diversas funções nas plantas como, por exemplo, hormônios (giberelinas, ácido abscísico), pigmentos fotossintéticos (fitol, carotenóides), carreadores de elétrons (umbiquinona, plastoquinona), mediadores na construção de polissacarídeos (poliprenil fosfatos) e componentes estruturais de membranas (fitosteróis) (Harbone, 1991). Eles também possuem inúmeras atividades biológicas como, ação antiinflamatória, bactericida, antiparasitária, entre outras (Bezerra, 2009; Baghalian, 2010).

A característica lipofílica dos terpenos facilita a sua penetração na bicamada lipídica de membranas celulares e, conseqüentemente, estes compostos podem produzir alterações importantes nas células e na estrutura da membrana mitocondrial de diferentes patógenos, modificando assim, sua integridade e permeabilidade (Morales-Yuste *et al.*, 2010, Burt, 2004. Sikkema, 1995). A interação dos terpenos com as membranas celulares provoca alterações na organização da cromatina nuclear e do cinetoplasto de tripanosomatídeos, gerando também um aumento de volume da mitocôndria, que pode levar parasitos como a *Leishmania*, a morte (Morales-Yuste *et al.*, 2010).

1.5.1 *Matricaria chamomilla* – α -bisabolol

O chá de camomila é utilizado em vários países como hábito alimentar. Entretanto, suas propriedades medicinais somente começaram a ser elucidadas há trinta anos (Bezerra, 2009). Em países europeus, o chá de camomila é amplamente empregado na medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias, febres, diarreias e por suas propriedades sedativas. Muitas propriedades medicinais desta planta são atribuídas ao seu óleo essencial. O óleo de camomila possui um alto teor de bisabolol que possui diversas atividades farmacológicas como, ação antiinflamatória, analgésica e bactericida (Hojati *et al.*, 2010; Gomes-Carneiro *et al.*, 2005).

O α -bisabolol é um álcool sesquiterpeno encontrado no óleo essencial da *Matricaria chamomilla* e, devido ao seu odor agradável e propriedades farmacológicas, tem sido amplamente utilizado na indústria de dermatologia em preparações cosméticas como, cremes pós-barba, cremes para as mãos, loções para o corpo, desodorantes entre outros (Gomes-Carneiro, 2005). Além disso, segundo Kadir & Barry (1991) o α -bisabolol é capaz de aumentar, *in vitro*, a penetração epidérmica de drogas. Estes achados corroboram os

resultados de Brehm-Stecher & Jonson (2003), no qual este sesquiterpeno demonstrou atividade contra uma grande variedade de agentes patogênicos. Estes autores descreveram o aumento da permeabilidade de células bacterianas para certos compostos químicos exógenos, incluindo compostos antimicrobianos na presença de baixas concentrações de bisabolol. Esta descoberta pode ser importante para aumentar a suscetibilidade de bactérias aos antibióticos e a compostos antimicrobianos.

Em estudo recente foi demonstrada a atividade leishmanicida do α -bisabolol contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*. Nesse estudo, foram testadas 16 concentrações diferentes de α -bisabolol e o resultado da atividade leishmanicida contra o parasito foi igual ao obtido com a pentamidina, um dos medicamento utilizado no tratamento da leishmaniose. Os valores de inibição do parasito obtidos foram semelhantes entre os dois compostos (Morales-Yuste *et al.*, 2010).

1.5.2 *Citrus aurantium* e *Citrus limon* - limoneno

A laranja e o limão são pertencentes à família da *Rutaceae*, gênero *citrus* e são divididas em várias espécies, que são caracterizadas por suas variabilidades botânicas. Embora, o suco da laranja e do limão seja o principal produto comercial destas frutas, seus óleos essenciais também são explorados, principalmente pela indústria de alimento e cosmético (Lota *et al.*, 2002). Somado a isso, a casca da laranja contém fragrância abundante e várias substâncias que são processadas para a obtenção de óleos essenciais utilizados comercialmente (Qiao *et al.*, 2008).

O limoneno é um monoterpeneo que pode ser encontrado em uma variedade de plantas, principalmente plantas cítricas como, limão e laranja, sendo ele o composto majoritário dos óleos essenciais destas plantas (Ferrarini *et al.*, 2008; Lota *et al.*, 2002). Estas plantas possuem propriedades naturais de defesa como, inseticidas e antimicrobicidas, que estão associadas à ação do limoneno (Arruda *et al.*, 2009). A eficácia em promover a permeabilidade percutânea de certos medicamentos, característica muito importante relacionada a vários terpenos, também pode ser observada com o limoneno (Zhao & Singh, 1999). Além das propriedades naturais, propriedades farmacológicas também já foram associadas a este terpeno como, atividade bactericida, antifúngica entre outras (Filipowicz *et al.*, 2003).

Em trabalho publicado por Arruda e cols em 2009 foi avaliada a atividade leishmanicida, *in vitro* e *in vivo*, do limoneno. Nos experimentos *in vivo* os autores utilizaram tratamento tópico com pomada contendo 10% de limoneno em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis*. O tratamento induziu à cura de 67-87% dos camundongos. Os autores sugerem que a razão da variação de resposta ao tratamento, não uniforme em todos os grupos tratados, ocorreu devido a possíveis diferenças comportamentais nos animais. Uma hipótese seria a retirada da pomada por fricção pelos próprios camundongos, interrompendo antecipadamente o tratamento, o que poderia ter influenciado na redução de absorção do fármaco e conseqüentemente na ausência de cura clínica de todos os grupos. Os experimentos *in vitro* demonstraram que a atividade leishmanicida do limoneno, em culturas de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, assim como em cultura com formas promastigotas, é dose-dependente. A concentração capaz de inibir o crescimento de parasitos em 50% no ensaio com formas promastigotas foi de 49µM. No ensaio com formas amastigotas intracelulares, foi necessário uma concentração de 200µM de limoneno por 48 horas, para a redução de 52% nos números de parasitos. Além disso, neste mesmo trabalho, a atividade leishmanicida do limoneno foi testada com sucesso contra formas promastigotas *Leishmania chagasi* e *Leishmania braziliensis*.

1.5.3 *Eucalyptus globulus* - 1,8 – cineol

O gênero *Eucalyptus*, nativo da Austrália, pertencente à família da *Myrtaceae*, e é uma das plantas mais cultivadas em todo o mundo, com mais de 700 espécies. No entanto, menos de 20 espécies foram exploradas para a produção de óleo essencial (Elaissi, 2010, Maciel, 2010). O óleo essencial de *Eucalyptus* possui propriedades bactericida, antiviral e antifúngica, além de uma longa história de uso contra os efeitos de resfriados, gripes, rinites e sinusites (Sadlon, 2010). Este óleo essencial é classificado como óleo medicinal, destinado a fabricação de produtos farmacêuticos como, inalantes, estimulantes de secreção nasal, produtos de higiene bucal ou simplesmente utilizado como flavorizante em medicamentos. A principal espécie produtora deste tipo de óleo no Brasil é o *Eucalyptus globulus* (Siqueira *et al.*, 2007).

Assim como em outros óleos essenciais brutos, existem numerosos componentes que podem contribuir para os efeitos antimicrobianos associados a esse óleo essencial como, 1,8 cineol, α - pineno, canfeno, limoneno, entre outros. O composto majoritário desse óleo é o 1,8 cineol, um éter monoterpênico (Bakkali *et al.*, 2008). Entretanto, o percentual deste composto varia dependendo da espécie da planta (Hendry, 2010). Por se tratar de uma mistura complexa

constituída por muitos compostos, os óleos essenciais não apresentam um mecanismo de ação totalmente elucidado. Alguns mecanismos sugeridos como, a desnaturação protéica, a inibição enzimática e a desintegração da membrana, são algumas das alterações que podem ser responsáveis pelos seus mecanismos de ação contra patógenos (Siqueira *et al.*, 2007).

Além das propriedades bactericida, antifúngicas e antivirais associadas ao *Eucalyptus*, outras atividades biológicas já foram atribuídas a este gênero, como a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Cheng *et al.*, 2009). Outra atividade inseticida foi descrita por Maciel e colaboradores em 2010, contra larvas e ovos de *Lutzomyia longipalpis*, o principal vetor da leishmaniose visceral. Estes estudos demonstraram que o óleo essencial de *E. globulus* foi capaz de inibir 92.73% da eclosão dos ovos e eliminar 100% das larvas dessa espécie de flebotomíneo. O uso de plantas com atividades inseticidas possui benefícios sobre o uso de produtos sintéticos. Os inseticidas naturais são obtidos a partir de recursos renováveis e são rapidamente degradados não deixando resíduos tóxicos no ambiente, além disto, tem sido observado que os insetos não apresentam resistência aos inseticidas naturais, o que é observado com o uso de inseticidas sintéticos (Maciel *et al.*, 2010).

1.5.4 *Endlicheria bracteolata* - Guaiol

A *Endlicheria bracteolata* é uma espécie da família das *Lauraceae*, e até hoje, não há relatos na literatura sobre a atividade de seu óleo essencial e nem dos compostos presentes neste óleo. Entretanto, algumas espécies da mesma família já tiveram alguma atividade biológica relatada contra patógenos; *Ocotea odorífera*, espécie da família das *Lauraceae*, possui atividade antifúngica (Yamaguchi *et al.*, 2010) e também atividade contra *Plasmodium* sp (Botsaris, 2007). Outra espécie é a *Ocotea duckei* que possui constituintes com atividade contra formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (Monte *et al.*, 2007).

A identificação e caracterização dos constituintes do óleo essencial de *E. bracteolata* foi possível graças a aplicação de técnicas como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) (Schenkel *et al.*, 2004). Além da caracterização química foi possível fazer uma correlação entre a sua composição e suas propriedades biológicas.

A análise do óleo essencial de *E. bracteolata* demonstrou a presença de vários compostos, entre eles, o guaiol que está em maior concentração. O guaiol é um álcool sesquiterpênico presente em várias espécies de plantas. Foi descrito na literatura que alguns óleos essenciais, derivados de plantas como a *Salvia lanígera* e a *Helictis longifoliata*,

possuem o guaiol como composto majoritário, e apresentam uma potente atividade bactericida deste composto (Choudhary *et al.*, 2007). Através do estudo de suas propriedades biológicas saberemos se este óleo essencial possui alguma atividade contra parasitos do gênero *Leishmania*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, a atividade leishmanicida e a citotoxicidade dos óleos essenciais de *Citrus limon*, *Citrus aurantium*, *Eucalyptus globulus*, *Endlicheria bracteolata* e do α -bisabolol.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar o composto majoritário e os principais compostos, presentes em menor quantidade, nos óleos essenciais.
- Avaliar a atividade leishmanicida dos diferentes óleos essenciais e do α -bisabolol contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.
- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais e do α -bisabolol em culturas de células de linhagem contínua J774.G8.
- Avaliar a atividade leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares com os óleos que apresentaram melhores resultados nos ensaios de IC50 de promastigotas de *L. amazonensis*
- Avaliar as alterações ultraestruturais causadas em formas promastigotas de *L. amazonensis* pelos óleos essenciais que apresentaram melhores resultados e resultados intermediários nos ensaios de IC50 de promastigotas de *L. amazonensis*.
- Avaliar as alterações ultraestruturais em células de linhagem contínua J774.G8 infectadas ou não por *L. amazonensis* e tratadas com os óleos que apresentaram melhor atividade nos ensaios de IC50 de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Parasitos

Foram utilizadas nos experimentos formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa H21 (MHOM/BR/76/MA-76), isolada de um caso humano de leishmaniose cutânea difusa e mantida por passagens seriadas em camundongos e em meio de cultura LIBHIT (Gonçalves da Costa *et al.*, 1981).

3.1.1. Isolamento do parasito

Os parasitos utilizados nos experimentos foram obtidos de uma lesão nodular não ulcerada de camundongos BALB/c, purificados após ruptura do tecido infectado em um homogeneizador Potter e mantidas em meio LIBHIT. Para garantir a característica de infectividade, foram utilizados parasitos proveniente de culturas com no máximo 6 passagens *in vitro*. A utilização de camundongos para a manutenção *in vivo* da cepa de parasito utilizada neste projeto, foi aprovada pela Comissão de ética para uso de animais (CEUA) com licença número 0001/07.

3.2. Cultivo celular

Foram utilizadas células de linhagem contínua J774.G8, mantidas em garrafas de cultura de 25cm² com meio DMEM (Dubelcco's modified Eagle's médium, Sigma, USA), 5% de soro fetal bovino (SFB; Sigma F3018), penicilina (10.000U/mL) e estreptomicina (10.000µg/mL). Periodicamente, essas células eram submetidas a tratamento com tripsina 0,025% (Sigma, T8003) e EDTA 0,01% (Reagen) para que se desprendessem das garrafas e fossem plaqueadas em novas garrafas.

Parte das células utilizadas durante o experimento foram criopreservadas para manter a variabilidade genética original da amostra, assegurando resultados reprodutíveis e a continuidade do estudo, além de, evitar perda das amostras devido a possíveis contaminações.

O Dimetil Sulfóxido (DMSO) foi utilizado como agente crioprotetor, em uma concentração final de 10% em meio de cultura com 10% de SFB. O congelamento das células foi realizado de forma gradativa, reduzindo a temperatura até -70 °C. A seguir, as células foram estocadas em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização.

3.3. Óleos essenciais

Foram utilizados os seguintes óleos essenciais: *Eucalyptus globulus*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon*, e o padrão α -bisabolol, os quais foram obtidos comercialmente. Além desses óleos, obtidos comercialmente, utilizamos o óleo essencial da planta *Endlicheria bracteolata*.

3.3.1. Obtenção do óleo essencial da *Endlicheria bracteolata*

3.3.2. Coleta da planta

A coleta da espécie da *Endlicheria* utilizada neste trabalho foi realizada em maio de 2009, na reserva Ducke em Manaus (AM). A exsicata desta espécie foi depositada no Herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia), em Manaus – AM.

3.3.3. Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *E. bracteolata* foi obtido de folhas frescas da planta, através de hidrodestilação, com equipamento do tipo Clevenger, com algumas modificações, como recomenda a Farmacopéia Brasileira. Este método de extração consiste na adição do material vegetal previamente triturado, juntamente com água, a um balão que, por sua vez é aquecido à ebulição. Como o óleo essencial apresenta uma pressão de vapor mais elevada que a da água este é arrastado sob a forma de vapor e, posteriormente, ao se encontrar com uma superfície fria se condensa, sendo armazenado na forma líquida junto com a água. Posteriormente, o óleo essencial é separado da água por imiscibilidade entre eles, através de um recipiente cilíndrico. O óleo essencial obtido foi analisado pela cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM).

3.4. Análise em CG/EM

A CG/EM foi utilizada para analisar todos os óleos essenciais utilizados neste trabalho e também para quantificar a pureza do padrão de α -bisabolol. Os constituintes majoritários e minoritários dos óleos essenciais foram identificados por esta técnica. Utilizando um cromatógrafo a gás 6890N (Agilent Technologies, USA), com detector de massas 5973 Network (Agilen Technologies, USA), injetor 7683B Serie (Agilent Technologies, USA) e coluna DB-5MS com dimensões de 30m x 0.32 mm e filme de 0.25 μ m de espessura. As análises foram realizadas com temperatura inicial de 40 °C e final de 290 °C, com um tempo de corrida de 67min. Um microlitro/min de gás Hélio foi utilizado como arraste para cada amostra.

3.5. Atividade leishmanicida, *in vitro*, dos óleos essenciais e do α -bisabolol

A atividade leishmanicida foi verificada através de experimentos *in vitro*, com formas promastigotas do parasito. As promastigotas foram plaqueadas em placa de 96 poços em uma concentração de 10^5 parasitos por poço em um volume de 100µl de meio de cultura LIBHIT. Os parasitos foram incubados por 24 horas com todos os óleos essenciais e com o α -bisabolol separadamente nas concentrações de 60, 30, 15, 7.5, 3,75 e 1,87µg por poço. Após este período realizamos a contagem dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer para determinar a concentração inibitória (IC₅₀). Os resultados foram expressos como a concentração capaz de inibir o crescimento do parasito em 50% (IC₅₀). Foi utilizado como controle positivo a Pentamidina e controle negativo somente o parasito.

3.6. Citotoxicidade celular *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade, *in vitro*, foi realizado para avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais e do α -bisabolol, *in vitro*. A linhagem de célula utilizada para este experimento foi a J774.G8. O ensaio foi realizado através de avaliação quantitativa por incorporação do corante Neutral Red, um corante vital, solúvel em água que atravessa a membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, e fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal (Rogerio, 2003). Este método colorimétrico é baseado na incorporação deste corante no lisossomo de células viáveis, portanto, células mortas ou danificadas não conseguem reter o corante após a lavagem e o procedimento de fixação (Babich & Borenfreund, 1991).

As células J774.G8 cultivadas em DMEM foram colocadas para placas de 96 poços numa densidade de 10^4 células por 100µL. Após 24h de incubação em estufa, a 37 °C em 5% CO₂, as células foram incubadas com todos os óleos essenciais e o α -bisabolol separadamente nas diluições de 60, 30, 15, 7,5, 3,75 e 1,87µg e como controle negativo foram utilizados poços somente com células e como controle positivo foi utilizado o DMSO. Após o intervalo de 24 horas foi realizado o ensaio de absorção de Neutral Red. O meio com as concentrações dos óleos essenciais e do α -bisabolol foi retirado e adicionado em cada poço a solução de Neutral Red (50µg/ml) diluída em DMEM. Após 3 horas de incubação a 37 °C em 5% CO₂ as células foram fixadas com PFA 2%. Para extração do corante contido dentro das células, foi adicionada uma solução de 50% de etanol e 1% de ácido acético glacial e posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de placa (BioRad-Benchmerk Microplate Reader) com comprimento de onda de 540nm. A citotoxicidade foi expressa em porcentagem de viabilidade celular em relação aos poços controle (100%), determinando assim, a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular CC₅₀.

3.7. Atividade leishmanicida do óleo essencial de *E. bracteolata* e α -bisabolol contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

A atividade leishmanicida sobre formas amastigotas intracelulares foi avaliada somente com os óleos, *E. bracteolata* e o α -bisabolol, que apresentaram melhores resultados nos testes de atividade leishmanicida sobre formas promastigotas.

Para este ensaio as células J774.G8 foram plaqueadas em lamínulas dispostas no interior de placas de 24 poços, na concentração de 10^4 células por poço. As placas foram mantidas em meio de cultura DMEM, por 24 horas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. Após, 24 horas as células foram infectadas com um número 10 vezes maior de formas promastigotas de *L. amazonensis* por célula.

Vinte e quatro horas após a infecção, a cultura foi lavada três vezes com PBS, para retirada dos parasitos que permaneciam no meio extracelular, e incubadas com o óleo essencial de *E. bracteolata* nas concentrações de 15, 8, 4, 2, 1 e 0,5 μ g e com o α -bisabolol nas mesmas concentrações, separadamente, por 24 horas. Como controle, foram utilizados poços somente com células infectadas. A seguir, as lamínulas com as células aderidas, foram lavadas 2 vezes em PBS, e fixadas em solução de Bouin por 5 minutos. Após a fixação foram lavadas 2 vezes com álcool 70% por 30 minutos, para remoção do excesso do fixador e lavadas com água destilada. Após essa etapa, as lamínulas foram coradas pelo Giemsa (solução de azur – eosina azul de metileno, segundo Giemsa (Merck 9204), solução a 10% filtrada em papel de filtro) por 30 minutos e lavadas em água destilada. Para finalizar, foram desidratadas em uma bateria de acetona 100% (2 vezes), acetona 70% + xilol 30%, acetona 50% + xilol 50%, acetona 30% + xilol 70%, xilol 100% (2 vezes) e montadas em Entellan (Merck UN1866).

3.7.1. Avaliação da infecção das células

Para determinar a porcentagem de células infectadas e a média de parasitos por célula as lamínulas foram analisadas em microscópio de luz modelo Axioplan 2 (Zeiss) e a infecção das células avaliada através da contagem de amastigotas no interior de 100 células.

3.8. Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi empregada em formas promastigotas tratadas com os óleos que apresentaram melhor resultado de IC 50% (*E. bracteolata* e α -bisabolol) e com os que apresentaram resultados intermediários (*Citrus*

aurantium e *Citrus limon*). Nas formas amastigotas intracelulares a técnica foi empregada somente nos parasitos tratados com os óleos que apresentaram melhor resultado de IC 50%.

3.8.1. Microscopia eletrônica de formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com os óleos essenciais: *C. aurantium*, *C. limon*, *E. bracteolata* e α -bisabolol, separadamente por 24 horas na concentração determinada no ensaio de IC₅₀. Como controle foi utilizado parasitos não tratados. Após este período, os parasitos foram fixados com 2,5% de glutaraldeído (Sigma, USA) em solução tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 overnight. Em seguida, lavadas 3 vezes com tampão cacodilato 0,1M e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato 0,1M por 30 min. As células pós-fixadas foram desidratadas em acetona e emblocadas em Epon. Cortes ultrafinos foram obtidos em micrótomo e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio de transmissão eletrônica Jeol JEM 1011 (JEOL, Japan). (Duarte *et al.* 1992).

3.8.2. Microscopia eletrônica de transmissão de formas amastigotas intracelulares

Células J774.G8 foram cultivadas em uma concentração de 10⁵ células por garrafa em meio de cultura DMEM por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas as células foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Para isso, foram utilizados um número de parasitos 10 vezes maior do que o número de células. Vinte e quatro horas após a infecção, a cultura foi lavada três vezes com PBS, para retirada dos parasitos que permaneciam no meio extracelular. Em seguida foram incubadas com o α - bisabolol na concentração de 8.07 μ g/mL e com o óleo essencial de *E. bracteolata* na concentração de 7.93 μ g/mL, separadamente por 24 horas. Como controles, foram utilizadas culturas com células não infectadas e tratadas com os dois óleos separadamente, culturas com células infectadas (sem tratamento) e culturas somente com células (sem infecção e sem tratamento). Após este período, as células foram processadas conforme descrito para as formas promastigotas.

3.9. Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão, sendo organizados em tabelas ou plotados em gráficos. Para as variáveis com distribuição paramétrica foi utilizada a análise de variância (ANOVA). As análises foram feitas com o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. Análise cromatográfica dos óleos essenciais

Através da análise dos óleos essenciais e do α -bisabolol, pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas CG/EM, foi possível identificar o composto majoritário dos óleos essenciais, os principais compostos presentes em menores quantidades, assim como o grau de pureza do padrão de α -bisabolol.

Os resultados da análise do óleo essencial de *C. aurantium* mostraram que o composto majoritário deste óleo é o limoneno, cuja concentração foi de 96,97% (Tabela 1).

Na análise do óleo essencial de *C. limon*, o limoneno também foi o composto majoritário, entretanto, sua concentração foi de 52,49% (Tabela 2).

O óleo de *E. globulus* possui como composto majoritário o composto 1,8 cineol, na concentração de 99,06% (Tabela 3).

A análise do padrão α -bisabolol, mostrou que ele possui 98,19% de pureza (Tabela 4).

A avaliação cromatográfica do óleo essencial de *E. bracteolata*, mostrou que o composto majoritário deste óleo é o guaiol, cuja concentração foi de 72,14% (Tabela 5).

Tabela 1. Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial de *Citrus aurantium*

Constituintes	Tempo de retenção (min)	Área (%)
α -pineno	7,670	0,39
β -pineno	9,468	0,33
β -mirceno	10,211	1,74
Limoneno	11,711	96,97
Linalol	14,839	0,56
Total identificado		99,99

Tabela 2. Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial de *Citrus limon*

Constituinte	Tempo de retenção (min)	Área (%)
α - pineno	7,663	1,09
Sabineno	9,364	0,90
β -pineno	9,446	8,28
β -mirceno	10,248	0,92
Limoneno	11,674	52,49
γ -terpineno	12,893	15,34
α terpinoleno	13,992	0,67
α terpineol	19,308	1,16
Geranial	19,868	3,35
<i>trans</i> -cariofileno	25,403	0,89
β -bisaboleno	28,211	3,37
Total identificado		88,46

Tabela 3. Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

Constituinte	Tempo de retenção (min)	Área (%)
limoneno	10,047	0,37
1,8 cineol	10,233	99,06
Total de porcentagem identificada		99,43

Tabela 4. Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do (\pm) α - bisabolol

Constituinte	Tempo de retenção (min)	Área (%)
α - bisabolol	39,197	98,19

Tabela 5. Perfil cromatográfico obtido por CG/EM do óleo essencial das folhas de *Endlicheria bracteolata*

Constituinte	Tempo de retenção (min)	Área (%)
α - pineno	7,655	1,02
β - pineno	9,453	0,75
Felandreno	10,716	3,36
trans-cariofileno	25,410	3,14
α - guaieno	25,952	0,54
α - humeleno	26,517	0,44
β - chamigreno	27,586	1,42
guaiol	31,093	72,14
azuleno	32,549	9,29
azuleno metanol	32,757	1,65
Total identificado		93,75

4.2. Atividade leishmanicida dos óleos essenciais e do α -bisabolol contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

A atividade leishmanicida dos óleos contra formas promastigotas foi realizada através da contagem do parasito em câmara de Neubauer, 24 horas após o tratamento, e assim, determinada a concentração capaz de inibir o crescimento dos parasitos em 50% (IC₅₀).

A pentamidina, utilizada como fármaco de referência, reduziu 50% do número de promastigotas viáveis com uma concentração de 2,41 $\mu\text{g/mL}$. O IC₅₀ do óleo essencial de *E. bracteolata* foi de 7.93 $\mu\text{g/mL}$. O α -bisabolol apresentou um IC₅₀ de 8.07 $\mu\text{g/mL}$. A análise do óleo essencial de *C. limon* mostrou um IC₅₀ de 15.74 $\mu\text{g/mL}$. O IC₅₀ do óleo essencial de *C. aurantium* foi de 15.73 $\mu\text{g/mL}$. A concentração do IC₅₀ para o óleo essencial *E. globulus* foi de 30,85 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados mostraram que o óleo essencial de *E. bracteolata* e o α -bisabolol na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ foram os mais efetivos sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* com uma redução de 100% dos parasitos, enquanto os óleos do gênero *Citrus* demonstraram atividade intermediária contra o parasito, não apresentando diferenças entre eles. O óleo de *Eucalyptus*, contudo, demonstrou a pior atividade leishmanicida em comparação com os outros óleos como pode ser visualizado na figura 1 e na tabela 6.

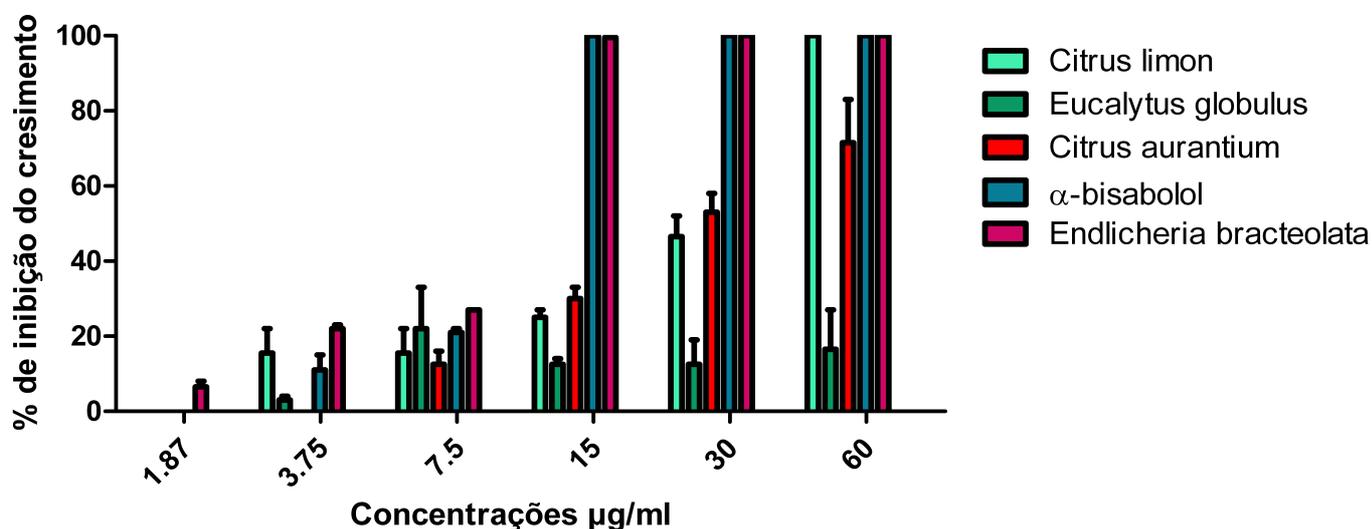


Figura 1 – Inibição de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cultivadas em meio LIBHIT, a 26 °C, e tratadas com os diferentes óleos essenciais ou com α -bisabolol, nas concentrações que variaram entre 1,87 e 60 $\mu\text{g/mL}$. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 6 – Concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* frente aos diferentes óleos essenciais, o α -bisabolol e a Pentamidina, após 24 horas de tratamento

Óleos essenciais	IC50%
<i>Endlicheria bracteolata</i>	7.932 \pm 0.152
α -bisabolol	8.075 \pm 0.092
<i>Citrus limon</i>	15.74 \pm 0.285
<i>Citrus aurantium</i>	15.73 \pm 0.136
<i>Eucalyptus globulus</i>	30.85 \pm 0.164
Pentamidina	2.412 \pm 0.168

4.3. Citotoxicidade celular dos óleos essenciais e do α -bisabolol em ensaio *in vitro*.

Os testes de citotoxicidade celular, *in vitro*, utilizando macrófagos de linhagem J774.G8, foram realizados por meio do ensaio colorimétrico com Neutral Red. As células foram incubadas com os óleos essenciais ou com o α -bisabolol por um período de 24 horas. Desta forma, foi possível determinar a concentração citotóxica capaz de eliminar 50% das células (CC_{50}).

O resultado da citotoxicidade celular do óleo essencial de *E. bracteolata* apresentou um CC_{50} de $15.14 \mu\text{g/mL} \pm 0.136$. O α -bisabolol também foi capaz de inibir 50% das células, em uma concentração de $14.82 \mu\text{g/mL} \pm 0.122$. O óleo essencial de *C. limon* demonstrou maior citotoxicidade, quando comparado com os outros óleos essenciais. Apesar do CC_{50} deste óleo ser $14.51 \mu\text{g/mL} \pm 1.392$, este mostrou-se tóxico em concentrações a partir de $3.75 \mu\text{g/mL}$. O óleo essencial de *C. aurantium* mostrou-se menos tóxico apresentando um CC_{50} de $58.50 \mu\text{g/mL} \pm 0.329$. O óleo essencial de *E. globulus* não mostrou citotoxicidade, sendo impossível assim determinar seu valor de CC_{50} (Fig. 2).

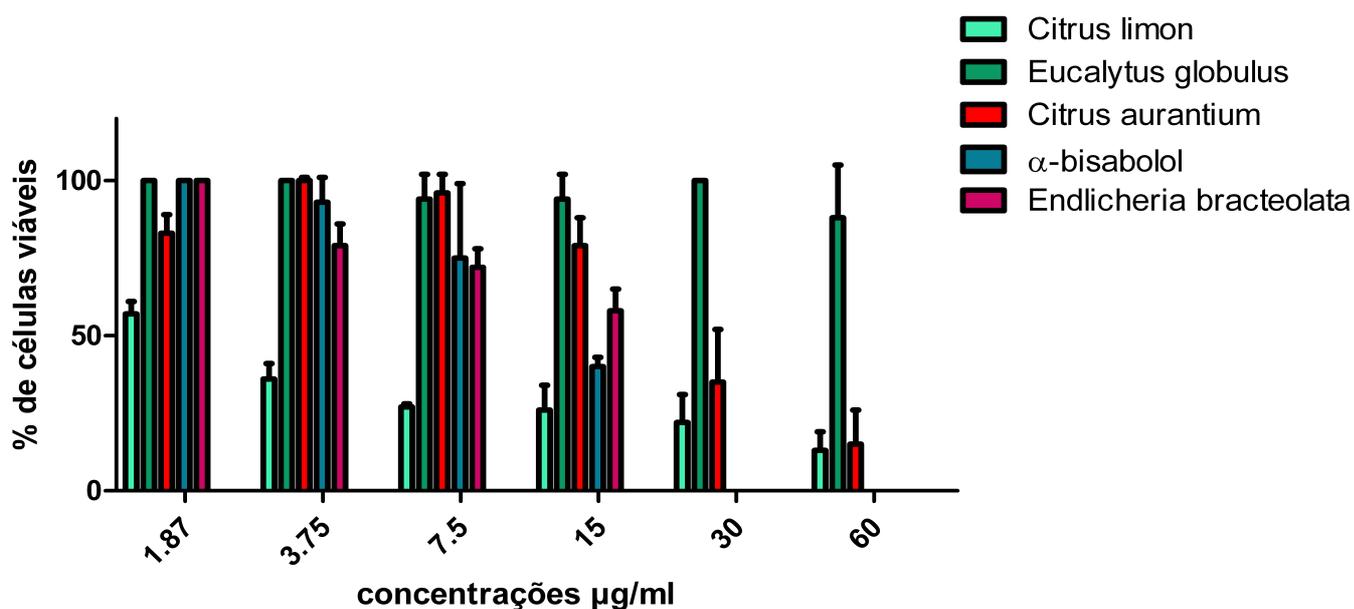


Figura 2 – Citotoxicidade dos óleos essenciais e do α -bisabolol, nas concentrações de 1,87 a 60 $\mu\text{g/mL}$, em macrófagos de linhagem J774.G8 cultivados em meio DMEM, a 37 °C, com 5% de CO_2 , e incubadas por 24 horas. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.4. Atividade leishmanicida do óleo essencial de *E. bracteolata* e do α -bisabolol contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

A atividade leishmanicida do óleo essencial de *E. bracteolata* e do α -bisabolol, contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi realizada para avaliar a ação destes óleos sobre os parasitos presentes no interior dos macrófagos de linhagem J774.G8.

A análise da células por microscopia de luz mostrou que 99% das células controle infectadas e não tratadas apresentavam amastigotas no seu interior, com uma média de infecção de 3.33 amastigotas por célula (Fig. 3A).

Nas células infectadas e tratadas com o óleo de *E. bracteolata* o índice de infecção foi de 62%, com uma média de 1.04 amastigotas por célula, utilizando a mesma concentração do IC₅₀ empregada para as formas promastigotas (Fig. 3B).

O tratamento das formas amastigotas com α -bisabolol, com a mesma concentração do IC₅₀ de formas promastigotas, mostrou que 86% das células estavam infectadas, com uma média de 1.78 amastigotas por célula (Fig. 3C). Neste ensaio foi possível observar a atividade do óleo essencial de *E. bracteolata* e do α -bisabolol contra amastigotas intracelulares, demonstrando um valor de IC₅₀ de 3.61 $\mu\text{g/mL} \pm 0.407$ para o óleo essencial de *E. bracteolata*, e um valor de 4.29 $\mu\text{g/mL} \pm 0.412$ para o α -bisabolol (Fig. 4).

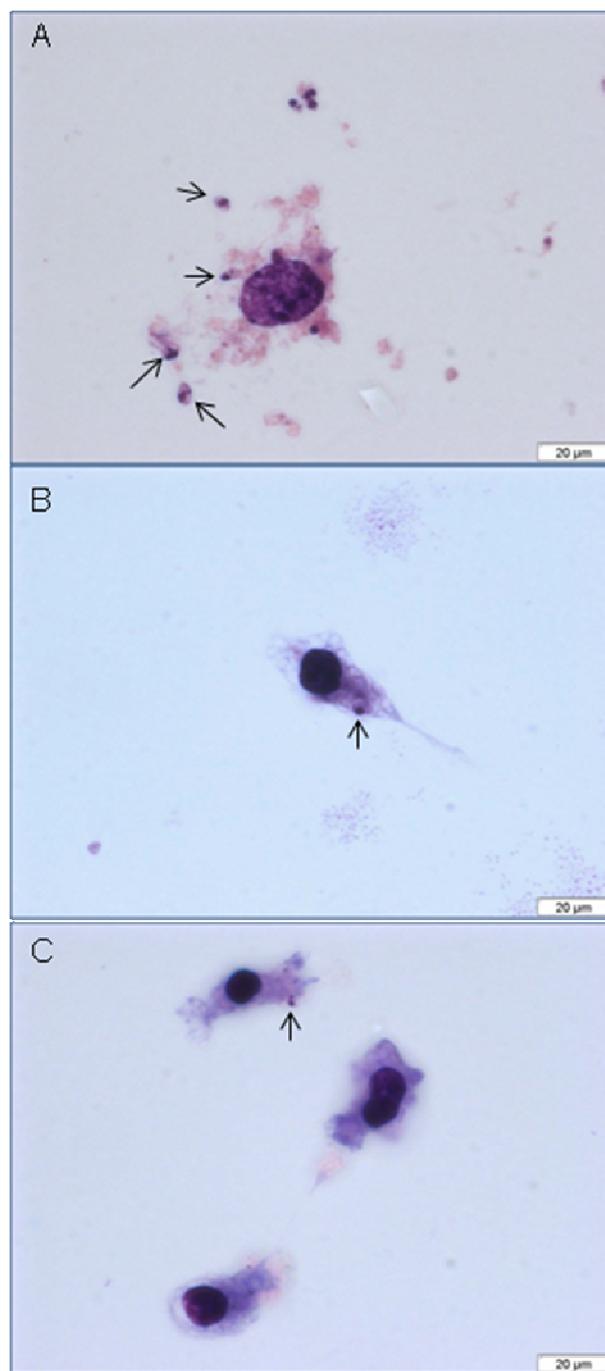


Figura 3 – Atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos de linhagem J774.G8, cultivados em meio DMEM, a 37 °C, com 5% de CO₂. (A) células infectadas com *L. amazonensis*, após 24 horas de infecção, observa-se presença de numerosas formas amastigotas internalizadas (setas). (B) células infectadas com *L. amazonensis* e tratadas, com o óleo essencial de *E. bracteolata*, utilizando a mesma concentração do IC₅₀ empregada para as formas promastigotas, mostrando baixo índice de infecção (C) células infectadas com *L. amazonensis* e tratadas, por 24 horas, com o α -bisabolol, utilizando a mesma concentração do IC₅₀ empregada para as formas promastigotas, também com baixo índice de infecção (seta).

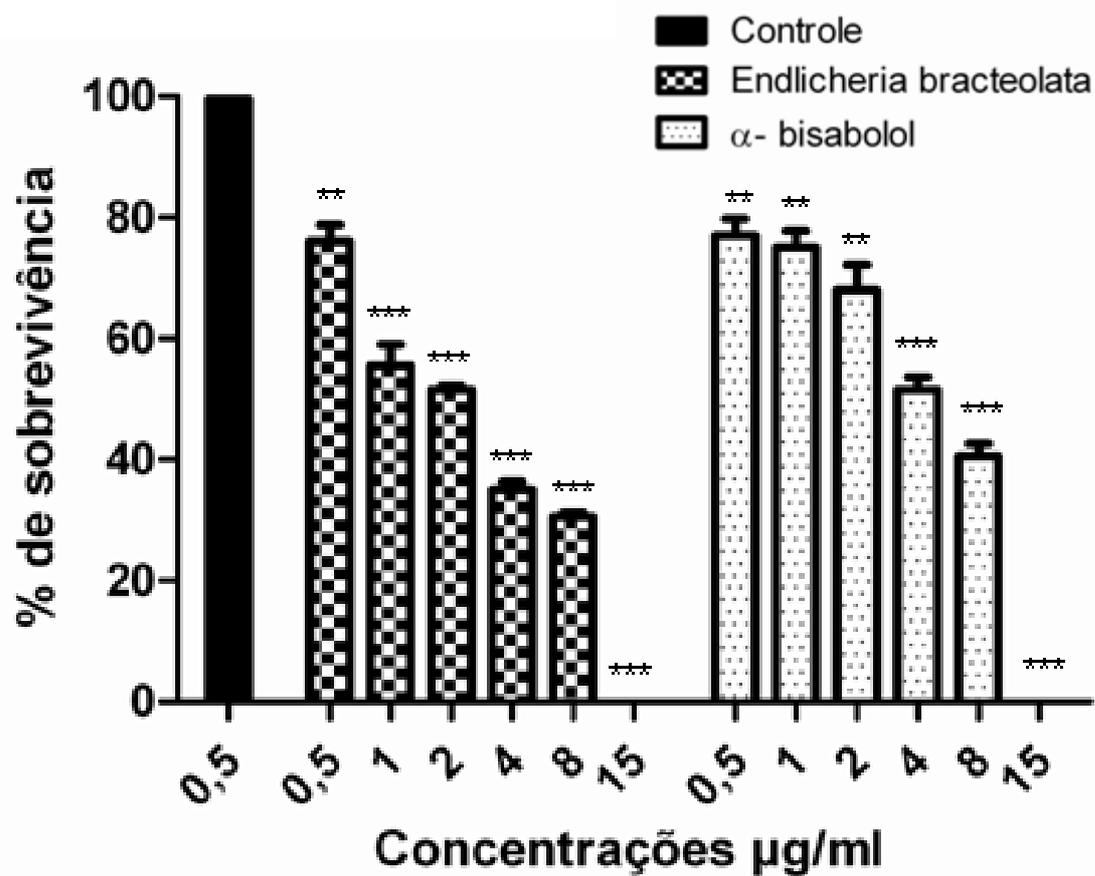


Figura 4 – Atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. amazonensis* no interior de macrófagos de linhagem J774.G8, cultivados em meio DMEM, a 37 °C, com 5% de CO₂, e incubadas, por 24 horas, com o óleo essencial de *E. bracteolata* ou o do α -bisabolol, nas concentrações que variaram de 0,5 a 15 µg/mL. Comparação com o grupo controle pelo teste de Dunnett, **p<0,01; ***p<0,001.

4.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

A análise por MET das formas promastigotas de *L. amazonensis*, tratadas com: 7.93 μ g/mL do óleo essencial de *E. bracteolata*, 15.73 μ g/mL do óleo essencial de *C. aurantium*, 15.74 μ g/mL do óleo essencial de *C. limom*, e 8.07 μ g/mL de α - bisabolol, separadamente, foi realizada para identificar as mudanças estruturais provocadas nos parasitos por estes óleos. A MET das formas promastigotas não tratadas foi realizada como grupo controle e para análise comparativa.

A análise por MET das formas promastigotas não tratadas mostrou o parasito com morfologia nuclear característica normal e com organelas citoplasmáticas preservadas (Fig. 5A e Fig.5B).

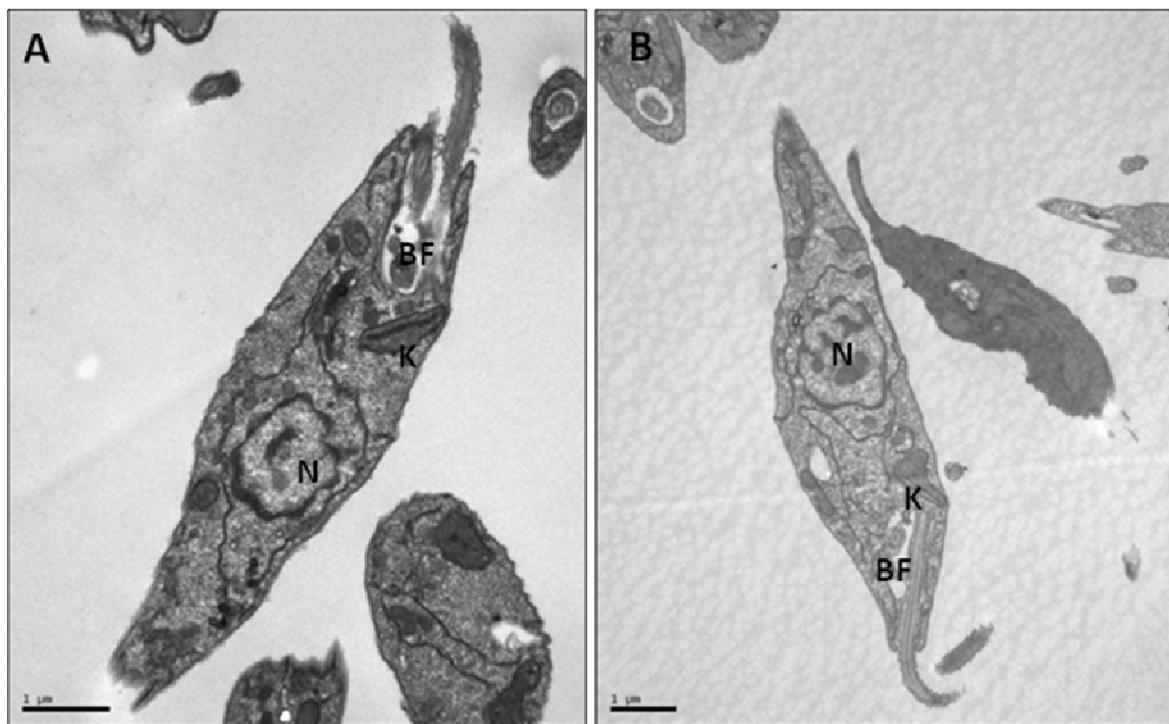


Figura 5 – (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis* não tratadas. Observam-se estruturas do núcleo (N), cinetoplasto (K) e a bolsa flagelar (BF) bem preservadas.

A avaliação dos parasitos, após 24 horas de tratamento com 15.74 μ g/mL de *C. limom* a 26° C, mostrou a presença de inúmeras inclusões lipídicas em seu citoplasma (Fig. 6A). Além disso, observamos alterações estruturais como presença de vacúolos atípicos no citoplasma com membranas eletrondensas em suas delimitações, aumento do tamanho da mitocôndria e prolongamento da membrana citoplasmática alterando a forma geral do parasito (Fig. 6B).

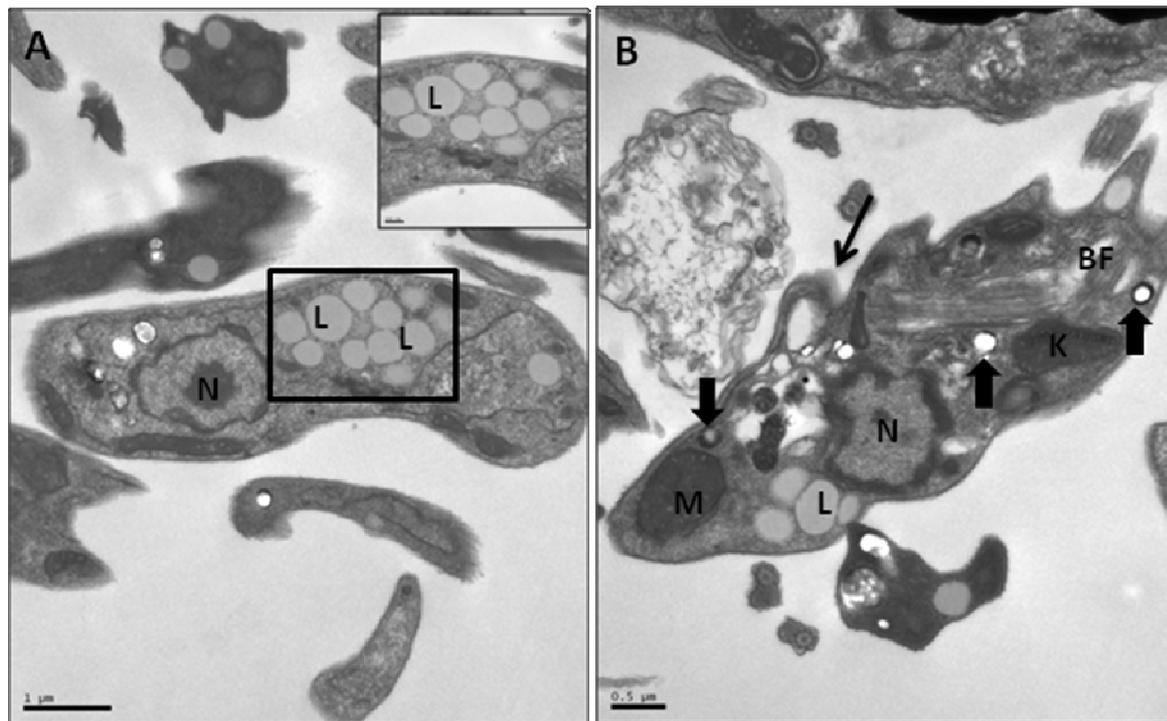


Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com óleo essencial de *C. limom* por 24 horas a 26 °C. Em (A) ultraestrutura dos parasitos mostrando a presença de inúmeras inclusões lipídicas (L) (detalhe); em (B) observa-se vacúolos atípicos (setas largas) com membranas eletrondensas, presença de inclusões lipídicas (L), aumento de tamanho da mitocôndria (M) e projeção da membrana citoplasmática (seta longa).

A avaliação ultraestrutural das formas promastigotas tratadas com 15.73 μ g/mL de óleo essencial de *C. aurantium*, por 24 horas a 26 °C mostrou desorganização celular com aumento de inclusões lipídicas no citoplasma, mudança da forma do parasito (Fig. 7A) e presença de membranas eletrondensas (Fig. 7B), não observadas nos parasitos controles não tratados.

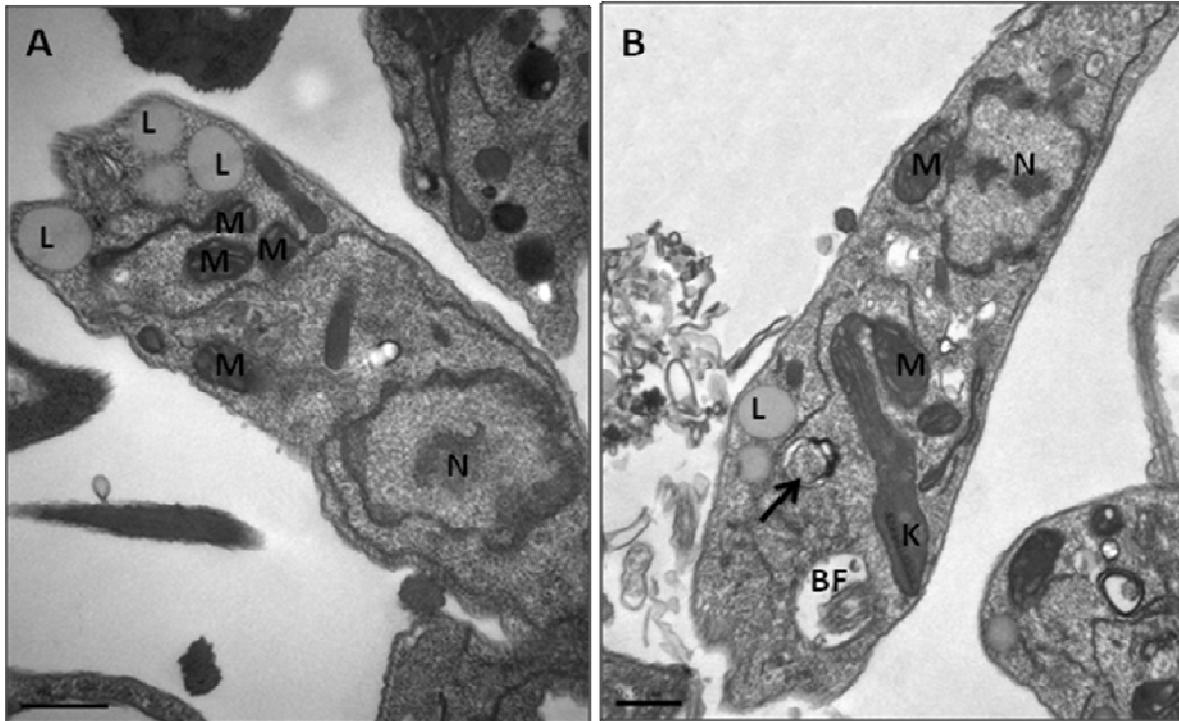


Figura 7 – Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIBHIT e incubadas com óleo essencial de *C. aurantium*, por 24 horas a 26 °C. Em (A) observa-se um aumento no número de inclusões lipídicas (L) e desorganização celular; em (B) nota-se aumento de tamanho da mitocôndria (M), presença de inclusões lipídicas (L), desorganização das organelas citoplasmáticas e presença de membranas eletrondensas (seta).

A análise dos parasitos tratados com 8.07 μ g/mL de α -bisabolol mostrou uma total destruição celular, com perda de organelas citoplasmáticas, além da presença de inclusões lipídicas (Fig. 8A) e desestruturação dos microtúbulos subpeliculares (Fig. 8B).

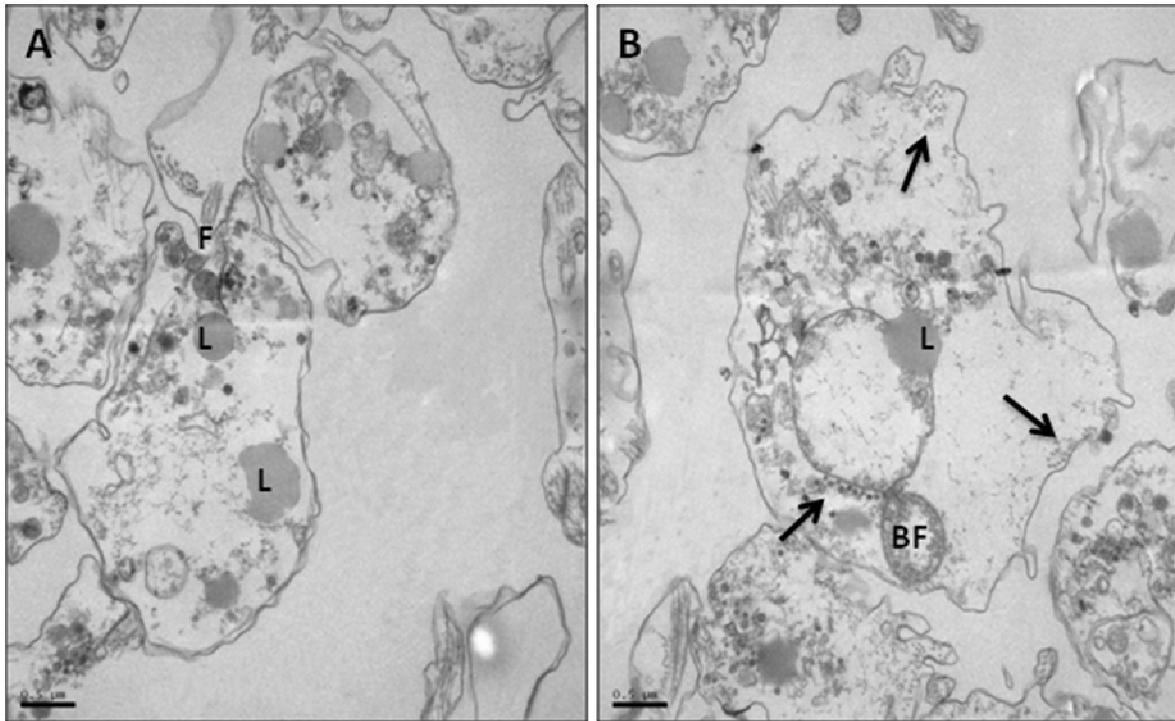


Figura 8 – Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIBHIT e incubadas com α -bisabolol, durante 24 horas a 26 °C. Em (A) e (B) promastigotas drasticamente afetadas pelo α -bisabolol. Observa-se perda de organelas citoplasmáticas, inclusive do núcleo, presença de inclusões lipídicas (L) e desestruturação dos microtúbulos subpeliculares (setas).

A análise ultraestrutural das formas promastigotas incubadas com 7.93 μ g/mL de óleo essencial de *E. bracteolata*, durante 24 horas a 26 °C, mostraram deformação celular com aumento do volume da mitocôndria e descontinuidade da membrana nuclear (Fig. 9A). Além disso, observamos a presença de vesículas na bolsa flagelar (Fig. 9B) e inclusões lipídicas no citoplasma (Fig. 9A, 9B e 10A) também foram observadas. Evidenciamos também a fragmentação e desestruturação do retículo endoplasmático além da presença de vacúolo com estruturas membranosas elétrondensas no seu interior (Fig. 10A). Em alguns parasitos observamos ainda estruturas membranosas eletrondensas e desorganização da cromatina (Fig. 10B).

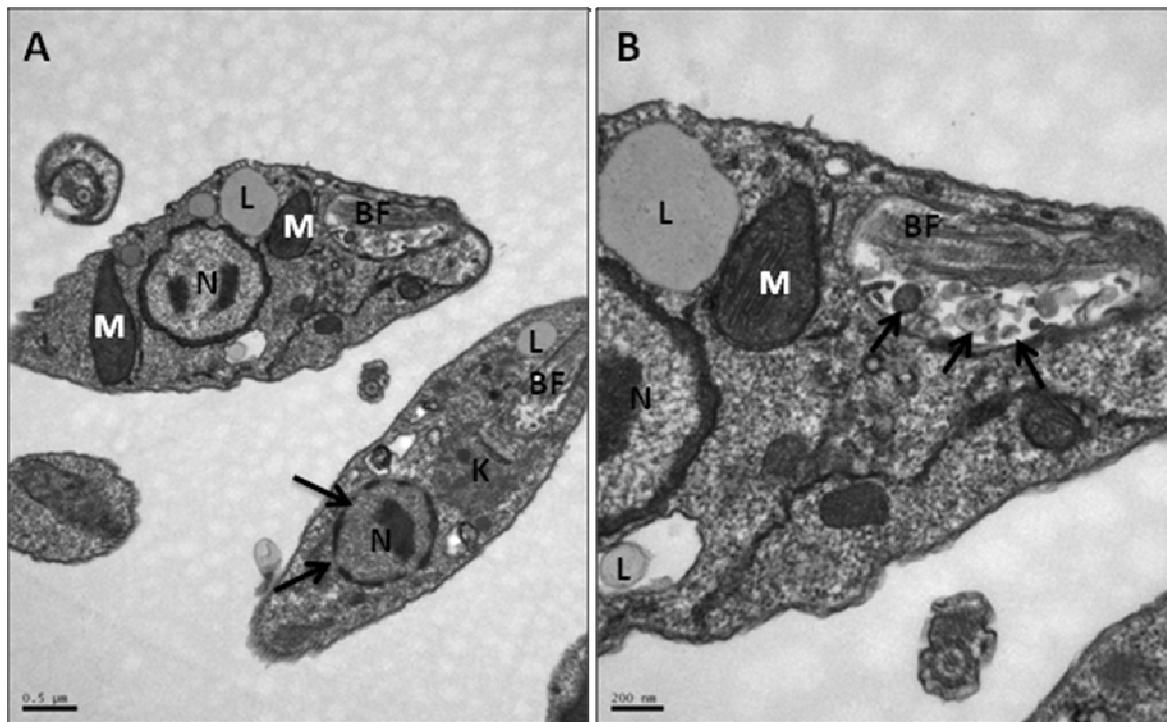


Figura 9 – Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIBHIT e incubadas com óleo essencial de *E. bracteolata* durante 24 horas a 26 °C. (A) aumento do volume da mitocôndria (M), além da descontinuidade da membrana nuclear (setas); (B) presença de vesículas na bolsa flagelar (setas).

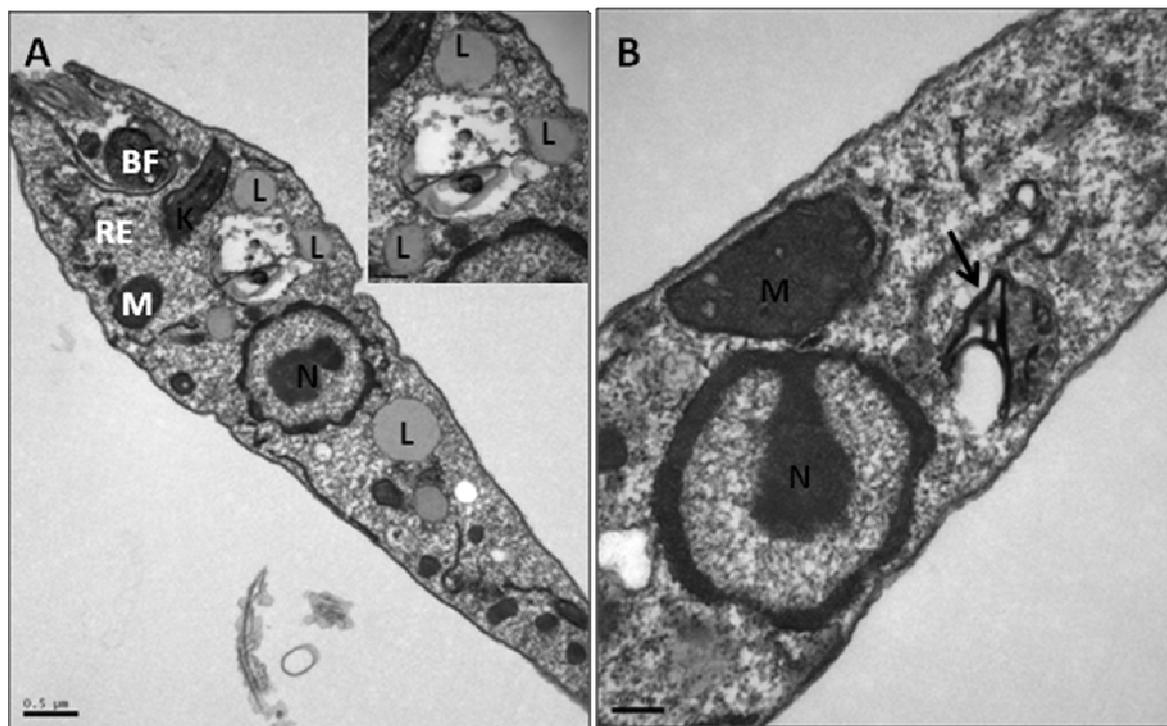


Figura 10 – Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIBHIT e incubadas com óleo essencial de *E. bracteolata* durante 24 horas a 26 °C. (A) presença de inclusões lipídicas (L) e vacúolo com estruturas membranosas elétrondensas no seu interior (detalhe), desestruturação do retículo endoplasmático (RE); (B) presença de estrutura membranosa eletrondensa no citoplasma (seta) e desorganização da cromatina (N).

4.6. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8 infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*.

As análises por MET das células infectadas com *L. amazonensis*, tratadas com 7.93µg/mL do óleo essencial de *E. bracteolata* ou com 8.07µg/mL de α - bisabolol, foi realizada para verificar a ação destes óleos nos parasitos internalizados. Como controle foram utilizadas células não infectadas e tratadas com os óleos, células infectadas (sem tratamento) e células normais (não tratadas e não infectadas).

As análises ultraestruturais dos macrófagos normais, ou seja, sem infecção e sem tratamento mostrou células com estrutura morfológica sem alterações e membranas citoplasmáticas preservadas (Fig. 11A) apresentando o citoesqueleto uniformemente distribuído (Fig. 11B).

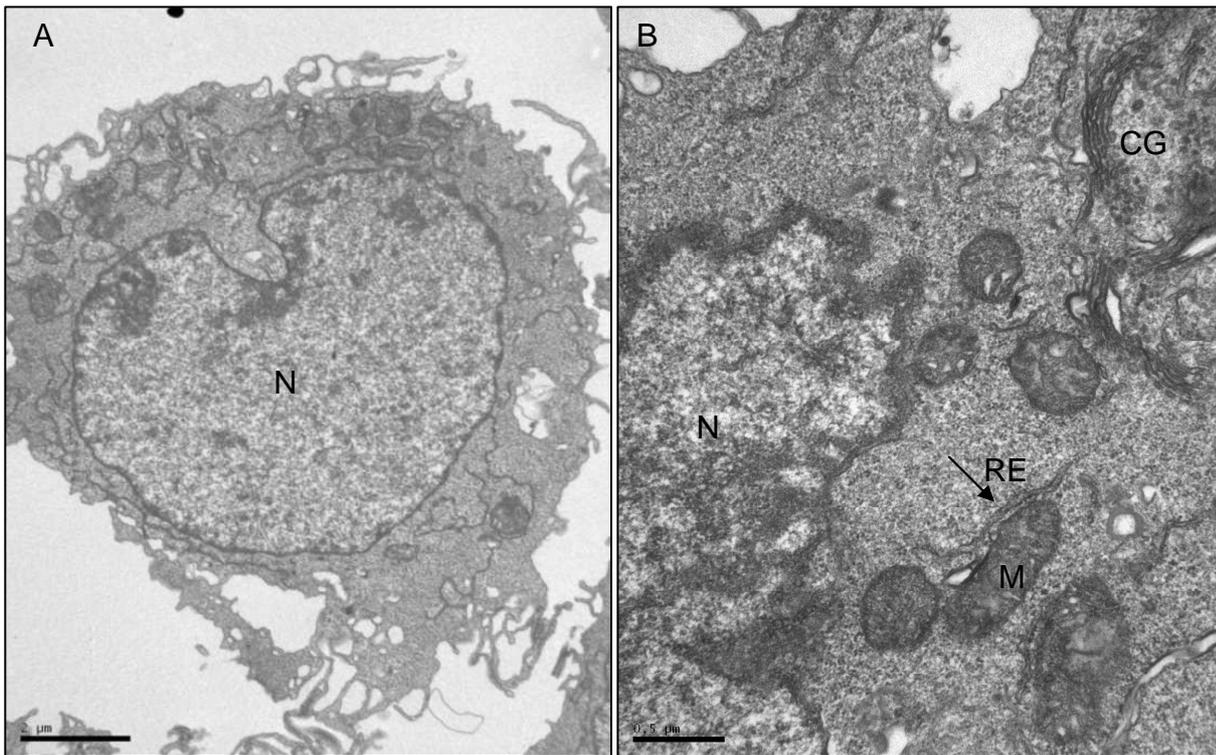


Figura 11 – (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8, não infectados e não tratados, cultivados em meio DMEM, a 37 °C, com 5% de CO₂.(A) célula apresentando morfologia normal, com estruturas bem preservadas. (B) célula apresentando estruturas normais sendo possível visualizar o núcleo (N), o retículo endoplasmático (seta), as mitocôndrias (M) e o complexo de Golgi (CG).

As análises por MET dos macrófagos J774.G8 infectados e não tratados, após 24 horas de infecção, mostrou o parasito preservado e com estrutura normal. Observa-se a carioteca bem definida e presença do cinetoplasto íntegro (Fig 12A e 12B).

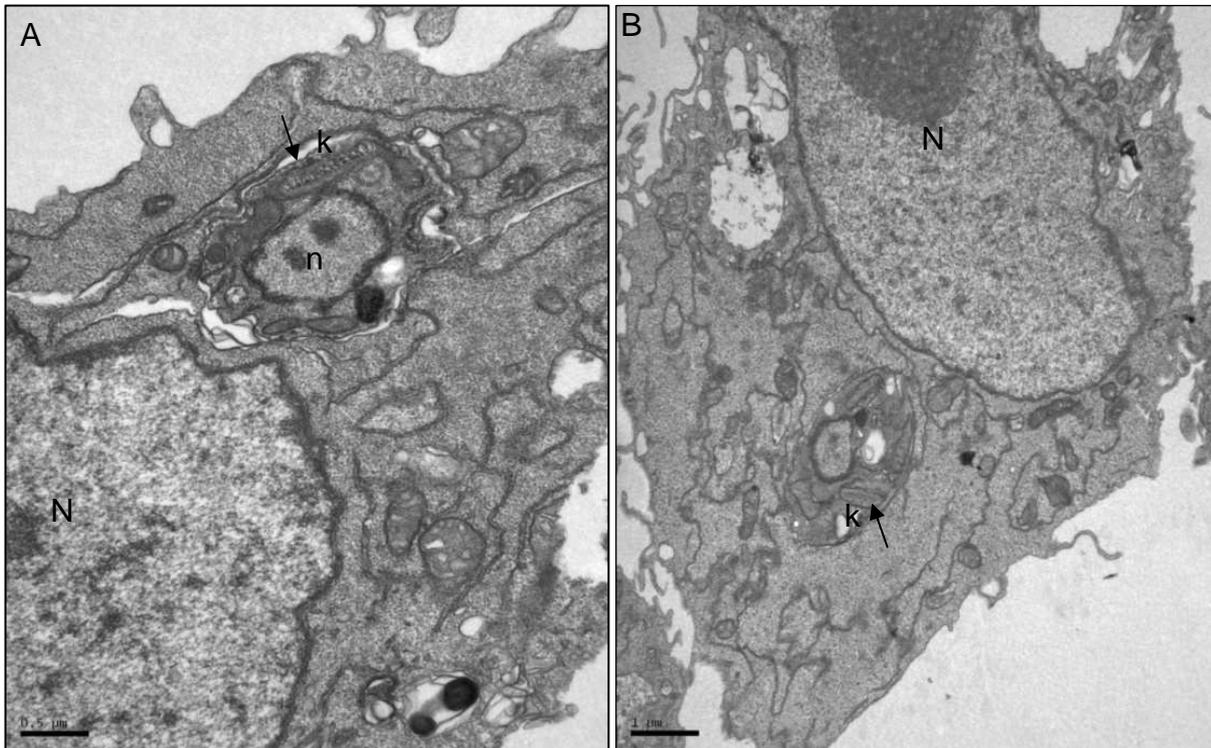


Figura 12 – (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8, infectados com *L. amazonensis*, após 24 horas de infecção, cultivadas em meio DMEM, a 37 °C, com 5% de CO₂, observamos formas amastigotas internalizadas apresentando estrutura normal e bem preservada com o cinetoplasto íntegro (setas). As células apresentam ainda suas estruturas citoplasmáticas uniformes e preservadas.

As células não infectadas e tratadas com o α -bisabolol (Fig. 13A) ou com o óleo essencial de *E. bracteolata* (Fig. 13B) não foram afetadas pelos mesmos, apresentando assim, morfologia normal.

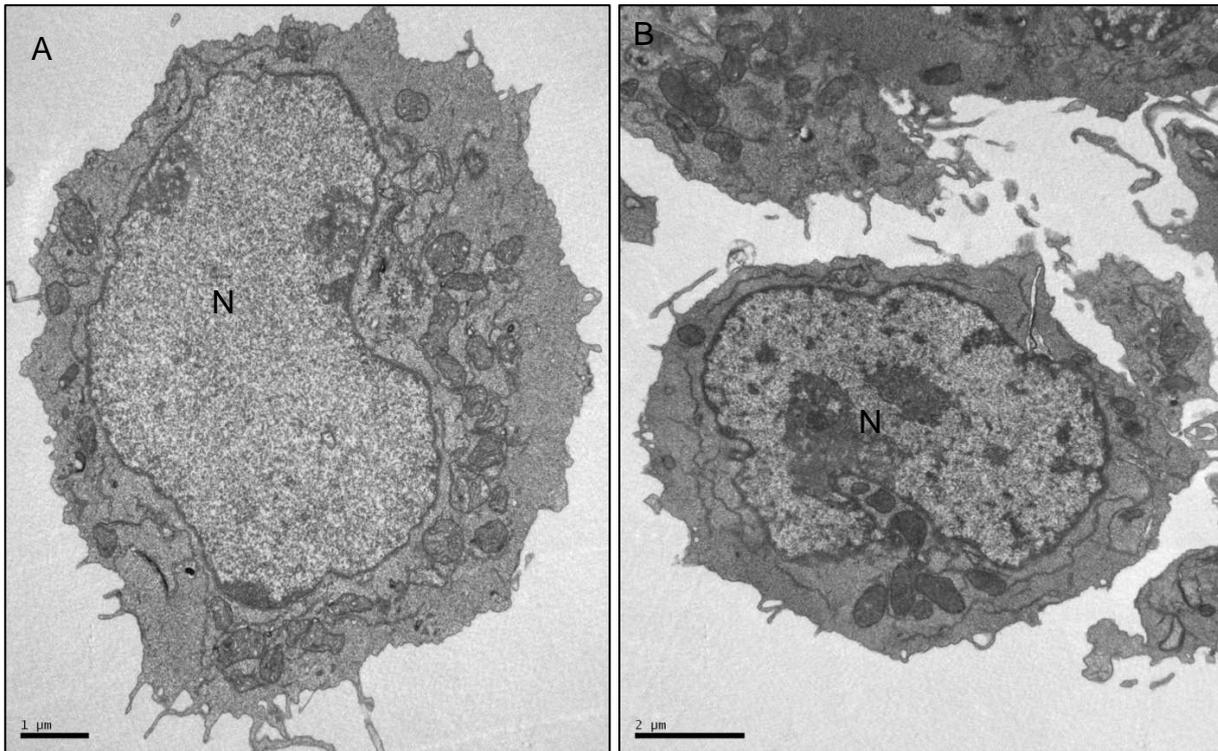


Figura 13 – (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8 cultivados em meio DMEM, a 37 °C, com 5% de CO₂. Célula não infectada e tratada, por 24 horas, com 8.07 μ g/mL de α -bisabolol (A) ou com 7.93 μ g/mL de *E. bracteolata* (B) apresentando morfologia normal após o tratamento.

A análise das células infectadas e tratadas com o α -bisabolol (Fig. 14A) ou com o óleo da *E. bracteolata* (Fig. 14B) mostrou alterações ultraestruturais nas formas amastigotas com a presença de vacúolos (setas) em seu citoplasma e destruição da mitocôndria, sem alterar, no entanto, a morfologia da célula hospedeira.

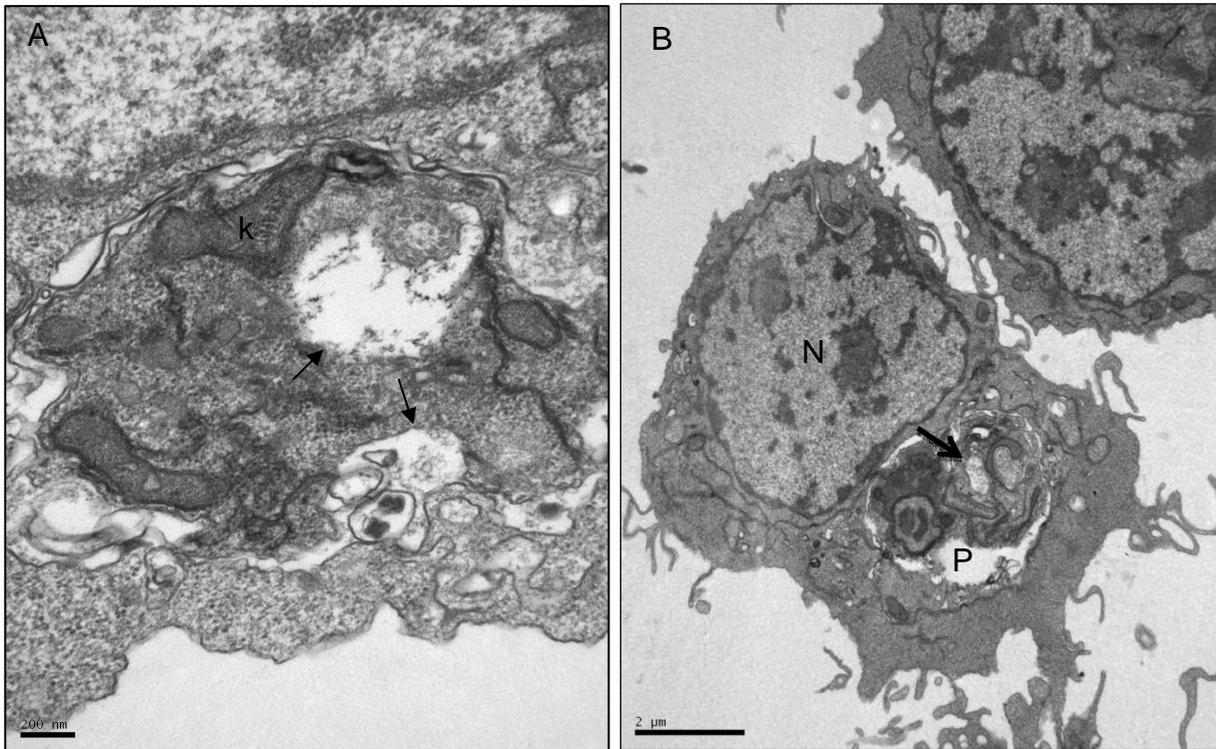


Figura 14 – (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8, cultivados em meio DMEM, a 37 °C, com 5% de CO₂, infectados com *L. amazonensis*, e tratados com os óleos, separadamente por 24 horas. (A) células infectadas e tratadas com α -bisabolol. As setas mostram a presença de vacúolos no citoplasma das formas amastigotas (B) células infectadas e tratadas com o óleo essencial de *E. bracteolata*, observa-se a destruição do parasito, no interior do vacúolo parasitófago (PV), presença de vacúolos e destruição mitocondrial.

5. DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas doenças emergentes e reemergentes, com um preocupante aumento na sua incidência, principalmente nas duas últimas décadas. (Goto & Lindoso, 2010). Os compostos orgânicos de antimônio são, desde sua introdução no tratamento da leishmaniose por Vianna em 1912, as drogas de primeira linha. Os antimoniais pentavalentes foram manufaturados e introduzidos na terapêutica entre 1935-1945, o primeiro deles sendo o stibogluconato de sódio, Pentostan (Berman, 1988). Atualmente esta droga é utilizada nos países de língua inglesa e a N-metil glucamina (Glucantime) na América Latina e países de língua francesa. Com estes medicamentos os efeitos colaterais são comuns (Antezana *et al.*, 1992; Braconnier & Miorner, 1993; Brummit *et al.*, 1996; Chulay *et al.*, 1985; Hepburn *et al.*, 1993; Horber *et al.*, 1991) e podem, as vezes, causar a interrupção do tratamento.

Como alternativa de tratamento, nos últimos anos, diversos extratos, óleos essenciais e componentes de plantas com atividade leishmanicida vêm sendo utilizados em ensaios experimentais dentre eles: *Garcinia brasiliensis* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (Pereira *et al.*, 2010), *Lippia sidoides* cham contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (Medeiros *et al.*, 2001), α -bisabolol contra forma promastigota de *Leishmania infantum* (Morales-Yuste *et al.*, 2010).

As plantas possuem uma característica típica que é a síntese e o acúmulo de diversas substâncias orgânicas, estas substâncias são normalmente chamadas de metabólitos secundários ou produtos naturais. Mais de cem mil metabólitos secundários pertencem a diferentes grupos de plantas (Wink, 2008). Dessas substâncias são formados os óleos essenciais, que são misturas complexas de metabólitos secundários, que podem conter cerca de 20 a 60 componentes em concentrações diferentes e são constituídos, principalmente, por monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides e isotiocianatos.

Os óleos essenciais são caracterizados por apresentarem um composto majoritário, ou mesmo por apresentarem dois ou três compostos em concentrações bastante elevadas, cerca de 20 a 70%, em comparação aos outros compostos presentes nos óleos (Nibret & Wink, 2010, Bakkali *et al.*, 2008). Os constituintes dos óleos essenciais variam desde terpenos ou terpenóides, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, entre outros. Estes óleos e/ou os seus constituintes apresentam diversas atividades biológicas como: bactericida, antiviral, antifúngica, antiprotozoária, analgésica, sedativa, antiespasmódica entre outras (Nibret & Wink, 2010, Monzote *et al.*, 2007).

A técnica de CG/EM vem sendo utilizada para identificar os compostos presentes nos óleos essenciais. Neste trabalho utilizamos esta técnica para identificar os constituintes dos

óleos essenciais da *E. bracteolata*, *C. limon* e *C. aurantium* e *E. globulus*, e para determinar a pureza do α -bisabolol. Nossos resultados mostraram, pela primeira vez na literatura, que o constituinte majoritário do óleo essencial de *E. bracteolata* é o guaiol, um álcool sesquiterpênico. Através desta técnica, também foi possível confirmar a pureza do padrão de α -bisabolol, também considerado um álcool sesquiterpênico. A análise dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. aurantium* demonstrou que o limoneno, um hidrocarboneto monoterpêno, é o composto majoritário destes dois óleos como anteriormente relatado por outros autores (Lota *et al.*, 2002, Botelho *et al.*, 2009). Já a análise do óleo essencial de *E. globulus* demonstrou que seu composto majoritário é o 1,8 cineol, um éter monoterpênico, corroborando os achados de Sadlon & Lamson (2010).

A identificação dos compostos majoritários e de compostos presentes em menores concentrações, nos óleos essenciais, pode ajudar a entender os mecanismos que levam à destruição de parasitos, através da ação direta sob formas promastigotas e ou através da ação indireta pela ativação do macrófago e aumento da expressão das enzimas que catalisam a produção das substâncias microbidas.

Os terpenos, por exemplo, interagem com as membranas biológicas e estas interações levam a mudanças na estrutura e funcionalidade das mesmas que, por sua vez, podem prejudicar o crescimento e a fisiologia das células. O acúmulo dos terpenos na membrana lipídica e a conseqüente mudança na sua estrutura como, a expansão, a mudança na fluidez e/ou o rompimento da interação proteína-lipídio, pode estar relacionado com a sua ação tóxica na membrana (Sikkema *et al.*, 1994).

Outro fato importante, relacionado à atividade citotóxica dos óleos essenciais e/ou de seus compostos, é em grande parte devido à presença de funções orgânicas como: fenóis, aldeídos e alcoóis nos compostos presentes nos óleos (Bakkali *et al.*, 2008). Essa pode ser uma hipótese que explique a atividade leishmanicida superior do α -bisabolol e do óleo da *Endlicheria bracteolata*, quando comparada com a dos outros óleos.

Nossos resultados mostraram que a atividade leishmanicida do óleo essencial de *E. bracteolata* e do α -bisabolol contra formas promastigotas revelou uma excelente atividade, com valores que podem ser comparados com a atividade leishmanicida da pentamidina. Esta superior atividade leishmanicida do óleo essencial de *E. bracteolata* contra as formas promastigotas pode ser atribuída ao seu composto majoritário, devido à presença de um grupo hidroxila com características de álcool, especialmente, na parte exocíclica da molécula. O α -bisabolol demonstrou atividade leishmanicida muito semelhante à do óleo de *E. bracteolata*. A presença de um grupo hidroxila, que igualmente possui função de álcool, também na parte

exocíclica da molécula do α -bisabolol, pode explicar a pequena diferença de atividade leishmanicida entre os dois óleos.

Os óleos essenciais de *C. aurantium* e *C. limon*, mostraram uma atividade leishmanicida intermediária, contra as formas promastigotas do parasito, quando comparados com os outros óleos. A semelhança estrutural entre estes dois óleos poderia explicar o valor da inibição do crescimento do parasito (IC₅₀) que foi muito próxima entre eles. O composto majoritário destes óleos é um hidrocarboneto monoterpreno, e devido a sua atividade lipofílica, ele interage com a membrana do parasito levando a mudanças estruturais que podem levar a morte celular.

O óleo essencial de *E. globulus* mostrou a menor atividade leishmanicida contra as formas promastigotas do parasito entre os óleos testados. Este resultado corrobora o trabalho publicado por Nibret & Wink (2010), onde foram avaliados os componentes individuais de três óleos essenciais diferentes, contra algumas espécies de tripanossomas. Os autores demonstraram diferenças na atividade tripanocida e na citotoxicidade destes óleos. Segundo eles os compostos que possuem aldeído como grupo funcional apresentam a maior ação tripanocida, seguido do epóxido e dos fenóis. Entretanto, os compostos que continham grupo funcional de éteres apresentaram menor atividade.

Apesar do composto majoritário muitas vezes ser o principal responsável pelas atividades contra patógenos, os outros compostos, que estão em menor concentração, podem atuar de forma sinérgica ou de forma aditiva melhorando a atividade biológica do óleo (Bakkali *et al.*, 2008).

Além, da atividade dos óleos essenciais e/ou de compostos presentes nos óleos contra patógenos, vários estudos têm demonstrado que a biossíntese do ergosterol é um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas com ação leishmanicida, como relatado por Lorente *et al.*, (2004) e Rodrigues *et al.*, (2002). Os parasitos que causam as leishmanioses possuem o ergosterol como principal esteróide presente em suas células, sendo assim, as diferentes classes de inibidores da biossíntese de ergosterol, como o azasterol, têm-se mostrado muito eficiente contra parasitos da família *Trypanosomatidae* (Lorente *et al.*, 2004). Uma enzima chave na síntese de ergosterol em tripanosomatídeos é a $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferase. Esta enzima é essencial para a biossíntese de ergosterol e, conseqüentemente, para a manutenção da organização estrutural do parasito, principalmente da membrana mitocondrial (Brenzan *et al.*, 2007). Entretanto, não está presente em células de mamíferos, sendo um alvo atraente e seletivo de drogas com ação anti-tripanosomatídeos (Rodrigues *et al.*, 2007).

As mitocôndrias são organelas celulares intimamente envolvidas na produção de energia. Pesquisas recentes têm demonstrado que a integridade dessas organelas

desempenham um papel importante na conservação da célula. A morte celular seria uma consequência da permeabilização de suas membranas (Armstrong, 2006). Na mitocôndria está localizada a cadeia transportadora de elétrons, havendo a produção de energia a partir do fluxo de elétrons e consequente fosforilação oxidativa. Os óleos essenciais provocam mudança de fluxo de elétrons nas mitocôndrias produzindo, desta forma, espécies reativas de oxigênio – (ROS), que incluem superóxidos e peróxido de hidrogênio, que oxidam e danificam lipídios, proteínas e o DNA mitocondrial (Bakkali *et al.*, 2008).

Estudos recentes mostraram que as alterações morfológicas estruturais, causadas por drogas que inibem a síntese de ergosterol são muito semelhantes às alterações causadas por diferentes compostos derivados de plantas com atividade leishmanicida (Brenzan *et al.*, 2007). Algumas das alterações causadas por inibidores da síntese de ergosterol, como: aumento de volume mitocondrial, aumento no número de inclusões lipídicas no citoplasma e a intensa atividade de exocitose na região da bolsa flagelar, também foram observados por outros grupos de pesquisa que estudam a atividade de compostos derivados de plantas com atividade leishmanicida. Dentre esses grupos, destacam-se Ueda-Nakamura *et al.* (2006), que relatou a atividade leishmanicida do Eugenol, o principal constituinte do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e Guimarães *et al.* (2010) que evidenciou a atividade de julocrotine, um alcalóide isolado de *Croton pullei* var, contra parasitos do gênero *Leishmania*. Além desses, outros autores mostraram alterações estruturais muito semelhantes às causadas pelos inibidores da síntese de ergosterol nas formas promastigotas e nas formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* tratadas com os óleos essenciais de *Lippia sidoides* cham. e *Cymbopogon citratus* (Medeiros *et al.*, 2011, Santin *et al.*, 2009). Uma das hipóteses que explicaria estas alterações é a capacidade que compostos presentes nos óleos essenciais têm de penetrarem nas células e comprometerem a biossíntese de ergosterol (Medeiros *et al.*, 2011). No presente trabalho, as alterações descritas puderam ser evidenciadas durante o tratamento com os óleos essenciais de *C. limon*, *C. aurantium*, *E. bracteolata* e com o α -bisabolol, contra formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Além disso, algumas das alterações que levaram ao comprometimento mitocondrial foram observadas nas formas promastigotas tratados com o óleo essencial de *E. bracteolata*. Dentre essas alterações destacamos o aumento de volume da mitocôndria e a descontinuidade da membrana nuclear. Outras mudanças ultraestruturais observadas nos parasitos tratados com os óleos essenciais de *C. limon*, *C. aurantium*, *E. bracteolata* e com o α -bisabolol variaram de discretas alterações à destruição celular. Dentre estas alterações, podemos destacar o aumento de volume da mitocôndria, como relatado por Ueda-Nakamura (2006) e aumento do cinetoplasto como demonstrado por Guimarães *et al.* (2010). A formação de vacúolos e a

presença de estruturas eletrondensas no citoplasma, também podem ser observadas em trabalhos publicados por Brenzan *et al.*, (2007) e Guimarães *et al.*, (2010), respectivamente, e a descontinuidade dos microtúbulos subpeliculares.

Um dos fatores que também evidenciam a mudança na morfologia dos parasitos tratados com esses óleos foi o aumento no número de inclusões lipídicas em seu citoplasma. Alguns autores sugerem que o aumento no número destas inclusões pode ocorrer em consequência do acúmulo da ação das drogas e devido à inibição do metabolismo de lipídios (Medeiros *et al.*, 2011, Rodrigues *et al.*, 2002). Outra importante alteração observada no nosso estudo ocorreu na bolsa flagelar das formas promastigotas tratadas com o óleo essencial de *E. bracteolata*. Os parasitos apresentaram formação de vesículas nesta estrutura, o que pode ser produto de um aumento na atividade exocítica do parasito, como relatado por Brenzan *et al.* (2007) e por Rodrigues *et al.* (2002).

Embora ensaios de atividade leishmanicida, *in vitro*, contra promastigotas sejam utilizados por muitos grupos de pesquisa e tenha sido também a estratégia utilizada neste trabalho, para triagem e busca de possíveis drogas para o tratamento da leishmaniose, resultados positivos obtidos somente com esses testes não podem ser considerados como o único indicativo de eficácia da droga. Para que uma droga seja considerada realmente eficaz é necessário que ela tenha ação principalmente contra formas amastigotas intracelulares, ou seja, a droga terá que ser capaz de atravessar a membrana da célula hospedeira e atuar sobre as amastigotas intracelulares.

Para avaliar essa capacidade de atravessar a membrana da célula e matar as formas amastigotas intracelulares, realizamos ensaios com macrófagos infectados com *L. amazonensis* e incubados com o óleo essencial de *E. bracteolata* e α -bisabolol, separadamente, em diferentes concentrações por 24 horas. Estes dois óleos foram selecionados por apresentarem os melhores resultados no *screening* realizado com as formas promastigotas do parasito. Os resultados obtidos neste ensaio demonstraram que o óleo essencial de *E. bracteolata* e o α -bisabolol são capazes de atravessar a membrana celular e atuar sob parasitos internalizados em macrófagos, confirmando sua potente atividade leishmanicida.

A ação leishmanicida, contra amastigotas intracelulares, pode ocorrer através da ação direta dos óleos contra o parasito ou pela ação indireta, através da produção de mecanismos celulares como a produção de óxido nítrico (NO) (Martín-Quintal *et al.*, 2009). O NO é a principal molécula efetora que medeia à morte intracelular de *Leishmania*, entretanto, pouco se sabe sobre o efeito de plantas e de seus compostos em relação à resposta dos macrófagos. Contudo, foi demonstrado por Ueda-Nakamura *et al.* (2006) que a produção de NO foi aumentada quando macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com 150 μ g/mL de

óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L., antes e depois da infecção de macrófagos por *L. amazonensis*.

Nossos resultados nos testes de atividade leishmanicida revelaram a ação direta de todos os óleos essenciais testados, assim como do α -bisabolol, sobre as formas promastigotas. Contudo, os resultados obtidos nos experimentos de atividade leishmanicida do óleo essencial de *E. bracteolata* e do α -bisabolol, contra formas amastigotas intracelulares, mostraram que possivelmente estes óleos possam atuar também, de forma indireta, através da ativação de macrófagos; já que quando comparada a atividade leishmanicida, do óleo essencial de *E. bracteolata* e do α -bisabolol, contra formas promastigotas com a atividade leishmanicida contra formas amastigotas intracelulares, verificamos que foi necessário uma menor concentração destes óleos para matar 50% dos parasitos intracelulares quando comparado as concentrações necessárias para matar 50% dos parasitos em cultura com formas promastigotas. Entretanto, serão necessários estudos mais aprofundados para que possamos comprovar este mecanismo.

A atividade citotóxica dos óleos essenciais e do α -bisabolol também foi investigada para saber em qual concentração estes compostos também se tornam tóxicos para as células. Os metabólitos secundários, lipofílicos derivados de plantas, penetram na membrana por difusão passiva e formam interações hidrofóbicas com as cadeias laterais lipofílicas de fosfolipídios. Além disso, estas moléculas podem perturbar a interação de proteínas de membrana com lipídios de membrana, o que é importante para manter à correta conformação tridimensional das proteínas. Esta mudança pode modular a atividade das proteínas, com isso, as células podem sofrer desordem, o que aumenta a fluidez e a permeabilidade da membrana (Wink, 2008). Este fato poderia explicar a citotoxicidade dos óleos essenciais de *E. bracteolata*, *C. limon* e *C. aurantium* e do α -bisabolol observada no presente trabalho. Devido à lipofilicidade destes óleos a interação com a membrana celular pode alterar sua fluidez tornando-a anormalmente permeável e levando a morte celular.

Até recentemente os óleos essenciais eram estudados somente para utilização na indústria alimentícia e de cosméticos. Entretanto, atualmente, estes óleos e os seus constituintes estão ganhando um crescente interesse pelo seu potencial multifuncional de uso (Baghalian 2010; Bezerra 2009; Sacchetti *et al.*, 2005). Estes produtos naturais estão em crescente demanda, por isso, a importância da pesquisa com óleos essenciais não reside apenas na sua caracterização química, mas também na possibilidade de articular a química com as suas propriedades funcionais (Sacchetti *et al.*, 2005).

Na literatura tem havido uma ampla discussão sobre as vantagens na utilização de drogas que melhorem a permeabilidade celular e que atravessem a barreira transdérmica mais

facilmente. Brehm-Stecher & Johnson (2003) relataram que o aumento da permeabilidade celular bacteriana poderia ser um dos mecanismos para impedir a resistência das mesmas aos antibióticos. Isso seria possível com a utilização de substâncias que aumentem a absorção de agentes microbianos. Os autores demonstraram que alguns compostos sesquiterpenos, como o bisabolol, o nerolidol, o farnesol e o apritone, podem alterar a função normal da membrana celular bacteriana, permitindo a permeação da célula por compostos exógenos, como os antibióticos, sugerindo desta forma, o uso de sesquiterpenos como potencializadores da permeabilidade bacteriana aos antibióticos e antimicrobianos.

A capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular também foi verificada em estudo realizado por Kadir & Barry (1991) utilizando dois compostos e amostras de pele humana tratadas com uma mistura de bisabolol e propileno-glicol. As amostras de pele tratadas foram 17 vezes mais permeáveis ao 5-fluorouracil e 73 vezes mais permeáveis à triancinolona acetona quando comparada às amostras de pele não tratadas.

Com os resultados obtidos no presente trabalho constatamos a atividade leishmanicida de todos os óleos essenciais testados e do α -bisabolol, contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Enfatizando que dois desses óleos, *E. bracteolata* e α -bisabolol, demonstraram superior atividade leishmanicida, e foram testados contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Os resultados confirmaram a potente atividade leishmanicida dos mesmos uma vez que foram capazes de afetar os parasitos intracelulares.

Diante dos nossos resultados e dos relatados por outros grupos de pesquisa em ensaio com óleos essenciais contra parasitos do gênero *Leishmania* (Medeiros *et al.* 2011; Morale-Yuste *et al.* 2010; Ueda-Nakamura *et al.*, 2006), associados aos estudos que demonstram que certos terpenos possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade celular (Nibret & Wink 2010; Bakkali *et al.* 2008 e Kadir & Barry, 1991) abrem-se novas perspectivas para pesquisas que podem contribuir para o desenvolvimento de produtos para tratamento tópico à base de óleos essenciais, ou a associação de óleos essenciais com compostos antimoniais, contra a leishmaniose cutânea.

Sendo a leishmaniose cutânea uma doença dermatológica com lesões ulcerosas, um tratamento tópico seria ideal, pois, diminuiria os custos, facilitaria a aplicação do medicamento, além de reduzir ou até mesmo eliminar os efeitos colaterais observados no tratamento tradicional com glucantime. No tratamento tópico não haveria absorção sistêmica, como ocorre no tratamento atual, ou esta absorção seria, praticamente, desprezível. Este fato poderia evitar os inúmeros efeitos colaterais associados ao tratamento tradicional.

Diante de todas as evidências mostradas neste trabalho sugerimos que o óleo essencial de *E. bracteolata* e o α -bisabolol podem ser compostos promissores para um tratamento alternativo na leishmaniose cutânea.

6. Conclusões

Através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa foi possível identificar os compostos majoritários e os compostos minoritários dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais de *Citrus limon*, *Citrus aurantium*, *Eucalyptus globulus*, *Endlicheria bracteolata* e o α -bisabolol demonstraram atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

O óleo essencial de *Endlicheria bracteolata* e o α -bisabolol também demonstraram atividade contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

Os testes de citotoxicidade realizados com os óleos essenciais e com o α -bisabolol mostraram que, nas concentrações capazes de inibir o crescimento dos parasitos em 50%, estes não são tóxicos para as células.

A análise da ultraestrutura das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* revelou como principais alterações morfológicas a vacuolização citoplasmática, as inclusões lipídicas, o aumento da atividade exocítica, o aumento de tamanho da mitocôndria e a desorganização das organelas citoplasmáticas.

A análise da ultraestrutura das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* intracelulares revelou que o óleo essencial de *Endlicheria bracteolata* e o α -bisabolol são capazes de penetrar nas células e atuar sobre as amastigotas sem alterar a morfologia da célula hospedeira.

7. BIBLIOGRAFIA

Amato V, Amato J, Nicodemo A, Uip D, Amato-Neto V, Duarte M. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. *Ann. Dermatol.Venereol.* 1998, 125: 492-5.

Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays.* 2006, 28: (3) 253-60.

Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM., Uliana SRB. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2009 63: 643-9.

Bakkali F., Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-75.

Bezerra SB, Leal LKAM., Nogueira NAP, Campos AR. Bisabolol-Induced Gastroprotection Against Acute Gastric Lesions: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide, and K⁺_{ATP} Channels. *J Med Food.* 2009, 12:(6) 1403– 6.

Bonfante-Garrido R. New sub-species of leishmaniasis isolated in Venezuela. *Proc 10th Int Cong Trop Med Malar, Manila, 1980, p203.*

Botelho PS, Moraes MM, Neves IA, Neves RCS, Ribeiro NC, Born FS, Camara CAG. Composição química e Ação Repelente do óleo essencial da laranja lima (*Citrus aurantium* L.) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* koch 2009. [Acesso em 2011julho 19]. Disponível em:

WWW.eventosufrepe.com.br/jepex2009/ed/resumos/R0451-3.pdf

Botsaris AS. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 2007, 3: 1-8.

Brajtburg Janina & Bolard Jacques. Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. *Clin Microb Reviews.* 1996, 9: 512 – 31.

Bray PG., Barrett MP., Ward SA, Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology.* 2003, 19: 232 – 9.

Brehm-Stecher BF. & Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, Oct: 3357– 60.

Brenzan MA, Nakamura CV, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Cortez DAG. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res*. 2007, 101:715– 22.

Chan-Bacab MJ & Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep*. 2001, 18: 674–88.

Choudhary MI, Badoo I, Atif M, Hussain S, Rahman A. Microbial Transformation of (-)-Guaiol and Antibacterial Activity of Its Transformed Products. *J. Nat. Prod*. 2007, 70: 849-852.

Cunha AM & Chagas E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*, sp. Nota prévia. *Hospital (Rio de Janeiro)* 1937, 11:3-9.

Floch H. *Leishmania tropica guyanensis* spp. agent de la leishmaniose tégumentaire des Guyanes et de l'Amérique Centrale. *Arch. Inst. Pasteur Guyane Territ de l'Inini*. 1954. 328.

Gadelha AR, Oliveira WC, Assuncao IJ, Dourado HV. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana com a pentamidina, esquema em dose unica intravenosa. *An.Bras.Dermatol*. 1990, 65: 198-200.

Garnham PCC. Cutaneous leishmaniasis in the New World with special reference to *Leishmania mexicana*. *Sci Rep Inst Sup Sanit*. 1962, 2:76-82.

Gomes-Carneiro MR., Dias DMM., de-Oliveira ACAX. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*. 2005, 585: 105–12.

Goto H & Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2010, 8: (4) 419–33.

Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen B P., Mukhopadhyay R 2004. Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin. *The Journal Of Biological Chemistry.* 279, 23: 31010–31017.

Grögl M, Odula AMJ, Cordero LDC, Kyle DE. *Leishmania* spp.: Development of pentostam-resistant clones *in vitro* by discontinuous drug exposure. *Experimental Parasitology.* 1989, 1: 78 – 90.

Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. 2a ed. ANVISA. 2008. [Acesso em 2011 junho 7]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf.

Guimarães LRC, Rodrigues APD, Marinho PSB, Muller AH, Guilhon GMS, Santos LS, Nascimento JLM, Silva EO. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasitol Res.* 2010, 107:1075–81.

Handman E & Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology.* 2002, 18: 332-4

Harborne JB. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. In *ecological chemistry of plant terpenoids*. Ed. Oxford: Clarendon Press. 1991, 399-426.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999, 354:1191- 9.

Herwaldt BL & Berman JD 1992. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am.J.Trop. Med. Hyg* 46: 296-306.

Herrer A. *Leishmania hertigi* sp. n., from the tropical porcupine, *Coendou rothsdrildi thomas*. J Parasitol. 1971, 57(3):629.

Hojatia M, Modarres-Sanavya SAM, Ghanatib F, Panahic M. Hexaconazole induces antioxidant protection and apigenin-7-glucoside accumulation in *Matricaria chamomilla* plants subjected to drought stress. Journal of Plant Physiology. 2010, 15: (8) 782-91.

Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. J Protozool. 1963, 10: 20-63.

Kadir R & Barry BW. α -Bisabolol, a possible safe penetration enhancer for dermal and transdermal therapeutics. Intern J of Pharmaceutics. 1991, 70: (31) 87-94.

Kreutzer RD, Souraty N, Semko ME. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and suspecies. Am J Trop Med Hyg, 1987, 36:22-32.

Lainson R & Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil, XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. J Trop Med Hyg. 1977, 80: 29-35.

Lainson R & Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. 1979. Pp116 In: Biological of Kinetoplastida W. Peters & R. Killick-Kendrick, eds. Academic Press, London.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120. W. Peters, R. Killick-Kendrick (eds) 1987. The leishmaniasis in Biology and Medicine, Volume I, Biology and Epidemiology. Academic Press Inc, Londres

Lainson R & Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasybus novemcitus* (L.) in Amazonian Brazil. Ann parasit Hum Comp. 1989, 64:3-9.

Lima MRF, Ximenes ECP, Luna A, Josiane S., Goulart Sant'Ana AE. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006, 16: (3) 300 - 6.

Lota ML, Serra DR, Tomi FL, Jacquemond C, Casanova J. Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *J. Agric. Food Chem*. 2002, 50: 796-805.

Lorente SO, Rodrigues JCF, Jiménez CJ, Joyce-Menekse M, Rodrigues C, Croft SL, Yardley V, Luca-Fradley K, Ruiz-Pérez LM, Urbina J, Souza W, Pacanowska DG, Gilbert IH. Novel Azasterols as Potential Agents for Treatment of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004, 48: 2937–50.

Mayrink W, Botelho Ana CC, Magalhães PA, Batista SM, Lima AO, Genaro O, Costa CA, de Melo MN, Michalick MSM, Williams P, Dias M, Caiaffa WT, Nascimento E, Machado-Coelho GLL. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006, 39: (1): 14-21.

Martín-Quintal Z, García-Miss MR, Mut-Martín M, Matus-Moo A, Torres-Tapia LW, Peraza-Sánchez SR. The Leishmanicidal Effect of (3S)-16,17- Didehydrofalconinol, an Oxylinol Isolated from *Tridax procumbens*, is Independent of NO Production. *Phytotherapy research*. 2009, 1-5.

Matta AA. Sur les leishmanioses tegumentaires. Classification general des leishmanioses. *Bull Soc Path Exo*. 1916, 9: 494-503.

McGarvey DJ. & Croteau R. Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists. 1995, 7: 1015-26.

Medeiros MGF, Silva AC, Citó AMGL, Borges AR, Lima SG, Lopes JAD, Figueiredo RCBQ. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides Cham*. *Parasitol Int*. 2011, 60: 237-241.

Medina R, Romero J. *Leishmania pifanoi* n. sp. El agente causal de la leishmaniasis tegumentaria difusa. Arch Vem Pat Trop Parasit Méd. 1962, 4:349-353.

Mendonça AC, Ferreira AS, Barbieri CH, Thomazine JA, Mazzer N. Effects of low-power pulsed ultrasound on second-intention healing of total skin injuries in rats. Acta Ortop Bras. 2006, 14: (3): 152 – 7.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde. 2003, 122 p.

Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia. 2009, 80: 81–90.

Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium Ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania Amazonensis*. Rev. Inst. Med. trop. 2007, 49: (4) 257-260.

Monzote L, Montalvo AM., Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2007, 61: 148-53.

Monzote L, García M, Montalvo AM., Scull R, Miranda M, Abreu J. In Vitro Activity of an Essential Oil against *Leishmania donovani*. Phytotherapy Research. 2007, 21: 1055–8.

Morales-Yuste M, Morillas-Marquez F, Martín-Sánchez J, Valero-López A, Navarro-Moll MC. Activity of (-) α - bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. Phytomedicine. 2010, 17: 279-281.

Muniz J & Medina H. Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania enrietti* n. sp.). Hospital (Rio de Janeiro). 1948, 33:7-25.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005, 366: 1561-77.

Neves DBJ, Caldas ED, Sampaio RNR. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis – relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Tropical Medicine and International Health*. 2009, 12: 1515-22.

Nibret E & Wink M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocyimifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine*. 2010, 17: 911-20.

Passero LFD, Bonfim-Melo A, Corbett CEP, Laurenti MD, Toyama MH, Toyama DO, Romoff P, Fávero OA, dos Grecco SS, Zalewsky CA, Lago JHG. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. Dc. (Asteraceae). *Parasitol Res*. 2011, 108: 529–36.

Pereira IO, Marques MJ, Pavan ALR, Codonho BS, Barbieri CL, Beijo LA, Doriguetto AC, D’Martin EC, Santos MH. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. *Fruits. Phytomedicine*. 2010, 17: 339–345.

Pupo JA. Leishmaniose tegumentar. *Epidemiologia, profilaxia e tratamento da leishmaniose. Sciencia Medica*. 1926, 4: 387-409.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, de Jesús MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. *Quim. Nova*. 2003, 26: (4): 550-5.

Rodrigues JCF, Bernardes CF, Visbal G, Urbina JA, Vercesi AE, Souza Wanderley. Sterol Methenyl Transferase Inhibitors Alter the Ultrastructure and Function of the

Leishmania amazonensis Mitochondrion Leading to Potent Growth Inhibition. *Protist*. 2007, 158: 447 – 56.

Rodrigues JCF, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, Souza W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-Azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002, 46: 487–99.

Ross R. Further notes on Leishman's bodies. *Br Med J*. 1903, 11: 1401.

Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 2005, 91: 621–632.

Sacks DL & Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 1985, 34 (3): 456-9.

Sadlon A E & Lamson D W. Immune-modifying and antimicrobial effects of Eucalyptus oil and simples inhalation devices. *Alternative Medicine Review*. 2010, 15: 33 – 47.

Sakthianandeswaren A, Curtis JM., Elso C, Kumar B, Baldwin TM., Lopaticki S, Kedzierski L, Smyth GK., Foote SJ., Handman E. Fine Mapping of *Leishmania major* Susceptibility Locus *lmr2* and Evidence of a Role for *Fli1* in Disease and Wound Healing. *Infection And Immunity*. 2010, June: 2734–44.

Sklavos AV, Walls T, Webber MT, Watson AB. Cutaneous leishmaniasis in a child treated with oral fluconazole. Case report. *Australasian Journal of Dermatology*. 2010, 51: 195–197.

Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 5nd ed., UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis. 2004, 524 pp.

Siqueira AA, Siqueira AA, Tonini MAL, Martins JDL. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*: Uma alternativa aos antibióticos convencionais. 2007. Scientia: Rev. Cent. Univ. Vila Velha, Vila Velha (ES), v. 8, n. 2, p. 199-214, jul./dez.

Silveira FT, Ishikawa EAY, de Souza AAA, Lainson R. Na outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brasil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. Parasite Paris France. 2002, 9: 43-50.

Simões CMO, Spitzer. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Óleos Voláteis. 5nd ed., UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis. 2004. 524 pp.

Sikkema J, Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. Microbiological Reviews. 1995, 59: 201–22.

Soto J, Hernandez N, Mejia H, Grogl M, Berman J. Successful treatment of New World cutaneous Leishmaniasis with a combination of topical romomycin/methylbenzothonium chloride and injectable meglumine antimoniate. Clin.Infect.Dis. 1995, 20: 47-51.

Tarikua Y, Hymeteb A, Hailuc A, Rohloff J. In vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Essential Oils of Artemisia absinthium and Echinops kebericho. Chemistry & Biodiversity. 2011, 8: 614-23.

Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA, Maza PK, Filho BPD, Cortez DAG, Alviano DS, Rosa MSS, Lopes AHCS, Nakamura CV. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. Parasitology Int. 2006, 55: 99 – 105.

Van G, & Vervoort AT. Chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. Current Opinion in Infectious Diseases. 1997. 10: 469-474.

Vendrametto MC, Santos AO, Nakamura CV, Filho BPD, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. *Parasitology International*. 2010, 59: 154-158.

Velez LR. Uta et Espundia. *Bull Soc Path Exo et de ses filiales*. 1913, 6:545.

World Health Organization. Leishmania and HIV in gridlock. WHO/UNAIDS. CDT/LEISH.98.9.1998 Add.I UNAIDS/98.23(1), 1-23. Geneve. Leishmaniasis in the world.

World Health Organization. The Leishmaniasis. Technical Report Series. 1984; 701: 1-140.

Wink Michael. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism*. 2008, 9: 996-1009.

Yamaguchi MU, Garcia FP, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura CV. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011, 99: (3) 507-14.

Zhao K& Singh J. In vitro percutaneous absorption enhancement of propranolol hydrochloride through porcine epidermis by terpenes / ethanol. *Journal of Controlled Release*. 1999, 62: 359–66.