



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Vanillosmopsis arborea* (ASTERACEAE) BAKER NO TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR MURINA.**

Wilany Chagas Cardoso Esposito

São Luís – MA

2015

WILANY CHAGAS CARDOSO ESPOSITO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Vanillosmopsis arborea* (ASTERACEAE) BAKER NO TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR MURINA.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Profa Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

São Luís – MA

2015

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 30 de junho de 2015 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

1º Membro

Profa. Débora Martins Silva Santos - UEMA

2º Membro

Profa. Maria do Socorro Oliveira Braga - UEMA

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva - UEMA

Orientador

À DEUS, o SENHOR da minha vida que se mostra presente em todos os momentos da minha existência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter estado ao meu lado em todos os momentos desta jornada e por ter colocado nesta trajetória pessoas com um coração puro e reto que me auxiliaram na realização deste sonho;

Aos meus pais, Jerônimo e Iraneide (*in memoriam*), a meu filho Matheus, meus irmãos Jean e Jiamme fonte de inspiração e incentivo;

A minha orientadora, Profa Ana Lucia Abreu Silva, pela orientação, amizade, apoio, incentivo e principalmente por ter acreditado em mim e sempre compreender as minhas dificuldades o que a faz um ser humano único e inesquecível em minha vida;

As amigas Alessandra, Isadora e Larissa pela força, incentivo e companheirismo de fundamental importância na realização deste trabalho;

Ao Prof Fábio pela orientação, apoio e conselhos no desenvolvimento do experimento;

A Fernando um amigo que ganhei, principalmente pelas sugestões neste experimento;

A Aracélio, pela confiança e oportunidade em desenvolver este experimento;

Aos amigos do laboratório de Anatomopatologia Aarão, Carol, Anderson, Higor, Breno, Alana, Douglas, Sara, Vanessa, Joana e Izabel pelo apoio e companhia;

As amigas Mylena, Joyce, Renata, Yara e Natália pela amizade e conselhos descritos no desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos de trabalho do Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal do Maranhão - UFMA Profa.Nilce, Richard, Marisa, Bruno, Mayara, James, Ludmila, Will, Andrea e Vanessa que sempre me deram força e incentivo;

Todas as palavras e frases nunca serão suficientes para demonstrar e agradecer o que todos fizeram por mim. O que posso lhe oferecer é minha eterna gratidão e sincera amizade a todo o sempre. Muito obrigado por tudo!

ESPOSITO. W.C.C. **Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* (asteraceae) Baker no tratamento da leishmaniose tegumentar murina.** [Veterinary Medicine Post graduation Teaching in Brazil] . 2015. xx f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2015

RESUMO

As leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas, por acometerem principalmente populações de países com baixos indicadores socioeconômicos. No Brasil, tanto a forma cutânea quanto a visceral estão presentes em todos os estados da federação, com a espécie *Leishmania amazonensis* apresentando elevado potencial patogênico para o homem e demais hospedeiros. As drogas de eleição para o tratamento da doença são os antimoniais pentavalentes, no entanto, o aparecimento de vários efeitos colaterais faz com que se busque por alternativas terapêuticas. *Vanillosmopsis arborea* Baker, ou candeeiro, é uma planta da família Asteraceae, encontrada na Floresta Nacional do Araripe, estado do Ceará. Apresenta grande potencial econômico, vinculado à presença do composto bioativo α -bisabolol, muito utilizado na indústria farmacêutica. Estudos têm demonstrado que o óleo essencial desta planta possui atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, gastroprotetora e leishmanicida *in vitro* contra *L. amazonensis*. Nosso estudo avaliou a atividade leishmanicida *in vivo* do óleo essencial de *V. arborea* Baker no tratamento de leishmaniose tegumentar murina. Para tal, foi feita a infecção de camundongos BALB/c com e posterior tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial e com a droga padrão. Os resultados mostraram que o óleo essencial apresentou atividade leishmanicida na concentração de 5% e baixa toxicidade, demonstrando o potencial terapêutico do α -bisabolol.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, óleo essencial, *Vanillosmopsis arborea*, α -bisabolol.

ESPOSITO. W.C.C. **Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker no tratamento da leishmaniose tegumentar murina.**[Veterinary Medicine Post graduation Teaching in Brazil] . 2015. xx f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2015

ABSTRACT

Leishmaniasis are considered neglected tropical diseases, mainly because it affects people from countries with low socioeconomic indicators. In Brazil, both cutaneous and visceral forms are found in all federation states, and the specie *Leishmania amazonensis* presents a high pathogenic potential for humans and other hosts. The standard treatment for leishmaniasis uses pentavalent antimonials, however, the occurrence of many side effects has led to the search for alternative therapies. *Vanillosmopsis arborea* Baker, or candeeiro, is an Asteraceae plant, found in the Araripe National Forest, Ceará State. It has great economic potential, due to the presence of the bioactive compound α -bisabolol, widely used in pharmaceutical industry. Studies have demonstrated that *V. arborea* essential oil have antimicrobial, anti-inflammatory, gastroprotective and *in vitro* leishmanicidal activity against *L. amazonensis*. Our study evaluated the *in vivo* leishmanicidal activity of *V. arborea* Baker essential oil in the treatment of murine cutaneous leishmaniasis. For this, BALB/c mice were infected *with L. amazonensis* amastigotes and treated with different concentrations of the essential oil and the reference drug. The results showed that the essential oil showed antileishmanial activity in a concentration of 5% and low toxicity, demonstrating the therapeutic potential of α -bisabolol.

Keywords: α -bisabolol, essential oil, *Leishmania amazonensis*, *Vanillosmopsis arborea*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Leishmaniose	16
2.2. Fitoterapia	22
2.3. Espécie em estudo	26
2.3.1 <i>Vanillosmopsis arborea</i> Baker (Asteraceae)	26
3. OBJETIVOS .	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Material Vegetal	29
4.2 Obtenção do óleo essencial	30
4.3 Análise do óleo essencial	30
4.4 Animais	30
4.5 Manutenção de parasito e infecção dos animais	31
4.6 Formulação dos cremes utilizados no tratamento	31
4.7 Ensaios terapêuticos e de toxicidade	31
4.8 Quantificação de carga parasitária	33
4.9 Histopatologia	34
4.10 Análise Bioquímica de função hepática e renal	34
4.11 Análise estatística	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Determinação da composição química do OEVA	35
5.2 Avaliação da carga parasitária	37
5.3 Avaliação histopatológica	42
5.4 Avaliação da função hepática e renal	43
	29
6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão em grupos do ensaio terapêutico com camundongos

BALB/c infectados com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* na região caudal do dorso e tratados com formulação tópica à base de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea*

Tabela 2. Divisão em grupos do ensaio de toxicidade com camundongos BALB/c tratados com formulação tópica à base de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea*

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do α -bisabolol

Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker.

Figura 3. Estrutura química do α -bisabolol

Figura 4 A/B Pele. A. Camundongo infectado com 10^4 amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratado com (colocar a dose intermediária). Observa-se reação inflamatória circunscrita rica em vacúolos parasitóforos (seta). B. Camundongo infectado com 10^4 amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratado glucantime. Lesão ulcerativa não circunscrita rica em parasitos. Coloração HE barra 100 μ m.

Figura 5 A/B/C/D/E/F/G/H – Dosagem de ALT, AST, ureia e creatinina de soro de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania amazonensis* e tratados por 21 dias com formulações tópicas de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* ou glucantime, 20mg/kg por via intramuscular. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado em quintuplicata. ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase.

Figura 6. Quantificação de DNA de *Leishmania amazonensis* em lesão de camundongos BALB/c infectados e tratados por 21 dias com creme à base de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* ou com glucantime, 20mg/kg por via intramuscular. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo infectado e não tratado, após análise pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (SOONG et al., 2012). Estes parasitos estão amplamente distribuídos em 98 países e três territórios de acordo com Organização Mundial de Saúde (Alvar et, 2012) e representam um grande problema de saúde pública e um risco para as pessoas que vivem ou viajam para áreas endêmicas. A doença possui incidência anual estimada de 600.000 casos em todo o mundo e prevalência de 12 milhões de casos.

Essas doenças tropicais são transmitidas por vetores, e pelo menos 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas por serem patogênicas para os seres humanos (BANULS et al., 2007). Hide et al. (2013) apontaram evidências de que há diferentes genótipos de leishmânia entre pacientes sintomáticos e assintomáticos, contudo, torna-se necessário, a amostra seja maior e tenha representatividade para que a hipótese seja concluída.

Na América do Sul, o complexo *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. pifanoi*) está relacionado com um amplo espectro de formas clínicas das leishmanioses, como por exemplo, a leishmaniose tegumentar e localizada, leishmaniose cutânea difusa e cutânea disseminada (SILVEIRA et al., 2004) e mais raramente podem ser associados com leishmaniose visceral (FERNANDES et al., 2014). A replicação de forma descontrolada de *Leishmania* spp. pode levar a não cicatrização da forma cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucosa ou leishmaniose visceral (SOONG et al., 2012). Todas as espécies de *Leishmania* que são patogênicas para os seres humanos podem causar a doença cutânea (VAN DER AUWERA & DUJARDIN et al., 2015).

Leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico, que acomete o homem e os animais domesticados de maneira secundária (BASANO e CAMARGO, 2004). A doença é transmitida ao hospedeiro mamífero por insetos

vetores, dípteros da subfamília Phlebotominae e do gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo. O gênero *Lutzomyia* é o responsável pela transmissão do parasito nas Américas. Todas as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas. Estes insetos são conhecidos no Brasil como flebotomíneos, tatuquira, mosquito palha, asa dura, asa branca, cangalhinha, birigui, anjinho, entre outros (SILVEIRA et al., 2008). Nas Américas, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas). Dessa forma, o homem adquire a infecção ao entrar em contato com as áreas florestais onde existem as enzootias pelas diferentes espécies de *Leishmania* spp. No Brasil, a LTA tem distribuição em todo o território nacional, onde atualmente todos os Estados federativos têm registros da enfermidade (SILVEIRA, 2001).

Leishmania amazonensis é uma das espécies de *Leishmania* que apresenta maior potencial patogênico para o homem, responsável pela forma mais benigna da doença: a leishmaniose cutânea localizada, mas, também pode levar à formas clínicas mais graves, de longa evolução, com lesões cutâneas e/ou mucosas bastante destrutivas e de difícil tratamento. Além disso, esta espécie também está associada a leishmaniose cutânea anérgica difusa, uma das formas clínicas de maior gravidade no espectro clínico-imunológico da LTA relacionada a sistema imunológico hiporreativo. Pode ainda ser agente causal da leishmaniose cutânea disseminada borderline, uma forma intermediária entre leishmaniose cutâneo-mucosa e a leishmaniose cutânea anérgica difusa (SILVEIRA et al., 2008). Um fator agravante, é o registro de infecções causadas por essa espécie de *Leishmania* em várias localidades do Brasil, e atualmente responde por apresentações clínicas incomuns em novas áreas de transmissão (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007).

A leishmaniose está entre as doenças infecciosas mais importantes em termos de mortalidade e morbidade (ALVAR et al. 2012). A taxa de incidência de leishmaniose cutânea está aumentando e a distribuição geográfica da doença está se expandindo para novos focos devido à presença de vários fatores de

risco, incluindo o crescimento da população e o seu deslocamento, a urbanização, as modificações antrópicas ambientais, comportamentos humanos, a resistência aos medicamentos e devido às novas práticas agrícolas (DASZAK et al. 2001).

Leishmania spp. possui ciclo de vida digenético, multiplicando-se como flagelado promastigota no intestino médio de flebotomíneos e como amastigotas não flageladas no interior de fagócitos dos mamíferos (SOONG et al., 2012). As formas promastigotas metacíclicas infectantes serão fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente o macrófago, e no interior dos macrófagos se transformarão em formas amastigotas.

L. amazonensis possui características que facilitam a sua sobrevivência e multiplicação no organismo, como a formação de grandes vacúolos parasitóforos no interior dos macrófagos que contêm grande quantidade de amastigotas, resistência a moléculas leishmanicidas produzidas pelos macrófagos e resistência a drogas leishmanicidas utilizadas no tratamento (WANG et al., 2011). A forma amastigota de *L. amazonensis* desenvolve mecanismos de invasão silenciosa, impedindo a ativação de células natural killer, células dendríticas e macrófagos (BHARDWAJ et al., 2010).

Os principais medicamentos usados no Brasil para o tratamento de LTA são antimoniato de meglumina, desoxicolato de anfotericina e anfotericina B lipossomal (PELLISSARI, 2011). Existem diversos problemas associados a terapêutica atual em leishmanioses, como os efeitos colaterais relatados durante o tratamento e desenvolvimento de resistência nos pacientes. Além disso, a administração injetável destes medicamentos dificulta um tratamento mais adaptado a realidade da população que vive em condições de sistema de saúde precário e é alvo da doença (RATH et al., 2003). O elevado valor de custo e o tratamento em longo prazo justificam também a necessidade de fármacos novos e mais seguros no tratamento (LIMA JUNIOR et al., 2014).

A fitoterapia está presente na Medicina desde os primórdios da humanidade e se prolonga até os dias de hoje pelas constantes descobertas de

agentes com potencial ação terapêutica (PAGE et al., 2004). A partir do conhecimento da própria população, que utiliza de forma caseira as plantas, podem ser conduzidas pesquisas que busquem confirmar seu efeito terapêutico, investigando seus possíveis efeitos adversos e tornando mais segura a utilização destas plantas pela população ou até mesmo desmitificando seu efeito. Em áreas do Nordeste brasileiro já são utilizadas plantas no tratamento de lesões na pele causadas por *Leishmania* spp. (LIMA JUNIOR et al., 2014), sendo necessárias pesquisas que consolidem esse uso para melhor qualidade de vida dessas pessoas.

Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias descritas na literatura como agentes com atividade leishmanicida (ROCHA et al., 2005). Neste contexto, vários estudos têm focado em plantas medicinais como produtos naturais para procurar novas moléculas com atividade leishmanicida (SERAKTA, et al. 2013).

Vanillosmopsis arborea Baker é nativa da Floresta Nacional do Araripe, no Nordeste do Brasil, no estado do Ceará. Existem poucos estudos sobre o uso tradicional da planta. No entanto, estudos biológicos e farmacológicos têm demonstrado que seu óleo essencial possui atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e gastroprotetoras já possuindo comprovado potencial leishmanicida *in vitro* contra *L. amazonensis* e nenhum efeito citotóxico sobre os macrófagos. Considerando, a ação leishmanicida no modelo *in vitro* observada em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa Colares et al.,(2013), justifica-se, a realização de estudos complementares no modelo murino com vista a atender aos protocolos previamente estabelecidos para o desenvolvimento de novos fármacos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. *Leishmania* spp. um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas morfológicas distintas: a promastigota, forma flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a amastigota, sem flagelo e encontrada no hospedeiro mamífero (FUMAGALLI et al., 2008).

A transmissão da leishmaniose ocorre através de vetores conhecidos como flebotomíneos, os quais realizam seu repasto sanguíneo em geral no entardecer e começo da noite, tendo assim hábitos noturnos. Durante a picada em hospedeiro infectado, sugam junto com o sangue as formas amastigotas de um animal infectado. A forma amastigota será transformada em uma forma alongada e com longo flagelo livre no intestino do flebotomíneo, forma conhecida como promastigota. No sistema digestivo desse vetor ocorre um processo de metaciclogênese, em que a forma promastigota procíclica, não infectante, se transforma na forma metacíclica, infectante (CÔRTEZ, 2008).

Os reservatórios primários de *Leishmania* spp. são principalmente roedores e canídeos. Nas Américas, mais de 40 espécies de mamíferos podem abrigar o parasito, mas poucas espécies têm mostrado desempenhar um papel importante no ciclo de transmissão natural do parasita (DANTAS-TORRES, 2007). Os reservatórios mais importantes no Brasil são os canídeos domésticos e selvagens, que mantêm o ciclo da doença. Os canídeos, por apresentarem intenso parasitismo cutâneo, facilitam a infecção do inseto e, por isso, são os mais importantes na manutenção da cadeia de transmissão e ciclo ecológico do parasito. Além disso, a alta densidade populacional dos cães (10% - 20% da população humana), aliada ao seu estreito convívio com o homem, atrai os flebotomíneos para perto do ser humano (LEÇA JÚNIOR et al., 2015).

A doença no homem pode ter quatro formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea, difusa e visceral. A forma visceral é a mais grave da doença e

pode causar febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, chegando a ser fatal, se não for tratada (MODABBER, 1993). A forma clínica mais comum da doença, a cutânea localizada, causa uma lesão na pele que pode curar espontaneamente, após algumas semanas ou meses, mas pode deixar marcas permanentes. A forma mucocutânea inicia-se com úlceras simples de pele, as quais podem produzir metástases na região oronasal, causando destruição tecidual, em alguns casos extremamente mutilantes. A forma cutânea-difusa produz lesões crônicas e disseminadas, as quais se assemelham às da lepra e são mais difíceis de curar. Estas lesões múltiplas contêm alto número de parasitos e são causadas pela *L. amazonensis*, no Brasil (LAINSON, 1983). A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada principalmente pelas espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, enquanto a leishmaniose visceral americana (LVA) é causada principalmente por *L. infantum chagasi* (LEÇA JÚNIOR et al., 2015).

A classificação atual das espécies de *Leishmania* é baseada em características clínicas e epidemiológicas apoiada por aspectos bioquímicos e moleculares em 3 complexos: complexo *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*. (WHO,1990;Lainson e Shaw,1972)

L. amazonensis é uma espécie que faz parte do complexo *L. mexicana* e o agente etiológico para um largo espectro de leishmanioses em países sul-americanos. Pode causar leishmaniose cutânea leve, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral e manifestar alterações patológicas similares às encontradas na leishmaniose visceral causada por *L. infantum* em camundongos BALB/c (ABREU-SILVA et al. 2004;SILVEIRA et al., 2004)

L. amazonensis é eficiente em utilizar respostas do sistema imune do hospedeiro para o seu próprio crescimento (SOONG et al., 2012) realizando um processo de escape frente às defesas do organismo, o qual quando vencido pelo parasito, resultará na sua fagocitose pelas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente o macrófago.

Durante a hematofagia pelas espécies de flebotomíneos, as formas promastigotas metacíclicas infectantes do parasito são inoculadas na pele e

fagocitadas por macrófagos, células-alvo na infecção. Com isso, escapam da ação do sistema complemento, eosinófilos e neutrófilos. É no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos que ocorrerá a transformação das formas promastigotas em amastigotas e a posterior multiplicação por divisão binária (SILVEIRA et al., 2004).

Os caminhos que a evolução da infecção tomará dependerão do perfil imunogenético do hospedeiro, fortemente associado à resposta imune celular, e da virulência da espécie infectante. Nesse sentido, a patogenia da doença será definida em consequência do tipo de interação entre a espécie de *Leishmania* e o perfil imunogenético do hospedeiro, da qual resultarão as diferentes formas clínicas da LTA (SILVEIRA et al., 2004).

Como eventos determinantes da infecção destacam-se a interação *Leishmania*-macrófago, a ação do sistema complemento, a adesão do parasito à membrana do macrófago, fagocitose e sobrevivência do parasito no macrófago (SILVEIRA et al., 2008).

Em comparação com outras espécies de *Leishmania*, *L. amazonensis* se destaca pela sua capacidade de reprimir as funções efetoras de ativação de macrófagos, células dendríticas e células T CD4 +, suprimindo a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (SOONG et al., 2012). A população de células TCD4+ (T helper) é heterogênea, sendo constituída de duas subpopulações: as células Th1 e Th2 (MOSMANN & COFFMAN, 1989). Essas consistem em duas vias de degradação direta de L-arginina, caracterizadas por um perfil de citocinas Th1 ou Th2 que é desencadeado por duas enzimas diferentes que se autorregulam (MARTINS, 2011).

Nos estudos referentes a patogenia das leishmanioses, as subpopulações celulares Th1 e Th2 são essenciais para os diferentes caminhos que a doença tomará, culminando em maior proliferação do parasito ou em resolução mais rápida das lesões (PINHEIRO, 2004). A realidade funcional das subpopulações Th1 e Th2 foram particularmente bem estabelecidas no modelo experimental de infecção de camundongos por *Leishmania* em função da

existência de camundongos geneticamente sensíveis (BALB/c) ou resistentes a esses parasitos (PINHEIRO, 2004). A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares (MACHADO et al.,2004).

A resposta Th1 ocorre através da ação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) sobre L- arginina, produzindo óxido nítrico (NO), importante fator microbicida (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN,2000). E também resulta na produção de níveis significativos de IFN- γ nas lesões, com ativação do macrófago e eliminação do parasito (PIRMEZ ,1993). As células Th1 estão envolvidas principalmente na eliminação de patógenos intracelulares e nas respostas imunológicas do tipo celular, sendo caracterizadas pela secreção de IL-12, IFN- γ e TNF- α (PINHEIRO, 2004).

A resposta Th2 envolve a ação da enzima arginase sobre L-arginina, regulando o crescimento do parasita através da síntese de poliaminas em macrófagos (KROPF et al., 2005). Os linfócitos ditos do tipo Th2 estão envolvidos na indução da resposta humoral e nos fenômenos de eosinofilia, com produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Essa resposta está associada a proliferação de *Leishmania* (PINHEIRO, 2004).

Esta protozoose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis doenças infecto-parasitárias de maior notabilidade, distribuída amplamente no continente americano. A leishmaniose é doença endêmica em 98 países, 72 dos quais são países em desenvolvimento (SABINA et al, 2005).

No Brasil, a região Nordeste registra o maior número de casos, representando o Maranhão o segundo estado em número de registros com total de 9.734 casos entre 2009 e 2012, ficando atrás apenas da Bahia (Ministério da Saúde do Brasil, 2006). Estima-se que ocorram 2 milhões de novos casos da doença no mundo, anualmente, sendo de 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral (PINHEIRO, 2004). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) encontra-se amplamente distribuída,

sendo registrados casos autóctones em todos os estados brasileiros (DORVAL et al.,2006). A ocorrência de casos em áreas urbanas e periurbanas é cada vez mais frequente, tornando mais complexa a epidemiologia desta doença, já que antigamente as leishmanioses eram caracterizadas por sua ocorrência predominantemente rural (SOUZA et al.,2004).

A leishmaniose cutânea constitui um problema de Saúde Pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (CÔRTEZ, 2008).

Os principais medicamentos usados no Brasil para o tratamento de LTA são antimoniato de meglumina, desoxicolato de anfotericina e anfotericina B lipossomal (PELLISSARI, 2011). O medicamento de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil e em outros países de língua não inglesa, é o antimonial pentavalente N-metil-glucamina (NMG), composto obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina.(RATH et al.,2003). É uma droga de elevada toxicidade, que requer administração parenteral e pode não ser efetiva no tratamento. Nesse caso, outras drogas, como anfotericina B clássica e pentamidina, que são também nefro-cardio-hepato-pancreatotóxicas e injetáveis, são utilizadas (SAMPAIO et al.,2009).

Existem fortes evidências que o antimônio pentavalente seja reduzido *in vivo* à sua forma trivalente, o que vem a explicar a toxicidade da droga, bem como seu efeito terapêutico. Ainda, o medicamento disponível no Brasil tem apresentado problemas quanto à sua qualidade (RATH et al.,2003).

Os efeitos colaterais mais frequentes com o uso dos antimoniais são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço no local da aplicação. A cardio, nefro e hepatotoxicidade dos antimoniais constituem uma importante limitação à sua segurança. A anfotericina B, antibiótico poliênico de reconhecida ação leishmanicida é a droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade de seu uso. A anfotericina B clássica é efetiva na forma mucosa de leishmaniose, mas muito nefrotóxica e também passível de recidiva. Os

efeitos colaterais mais comuns incluem náuseas, vômitos, febre, hipocaliemia, insuficiência renal, anemia e arritmias cardíacas. A cardio e nefrotoxicidade, além do uso intravenoso, impedem seu uso fora do ambiente hospitalar (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A necessidade de novos medicamentos para o tratamento de leishmaniose é iminente justificada pela toxicidade e consequente efeitos colaterais destes medicamentos, além do desenvolvimento de resistência dos pacientes que muitas vezes só evoluem para cura após a tentativa de vários esquemas terapêuticos. Além disso, os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são injetáveis (RATH et al., 2003) o que torna difícil o tratamento de grande parte da população infectada que reside em locais com sistema de saúde precário, considerando a atenção especial que deve ser dada a qualificação do profissional médico envolvido no manejo desses pacientes, já que sem isso uma parcela considerável dos pacientes com leishmaniose continuará com a prescrição sendo realizada de forma inadequada e com consequente falha no tratamento (PELISSARI, 2011).

A maioria das drogas possui elevado valor de custo e requerem um tratamento a longo prazo. Atualmente, na ausência de uma vacina, o desenvolvimento de medicamentos novos e mais seguros no tratamento da leishmaniose é uma necessidade (LIMA JUNIOR et al., 2014).

Neste contexto, vários estudos têm-se centrado plantas medicinais como produtos naturais para procurar novas moléculas com atividade leishmanicida (SERAKTA, et al., 2013). Em áreas do Nordeste brasileiro já é comum o uso de plantas no tratamento alternativo de úlceras causadas por *Leishmania* spp. (LIMA JUNIOR et al., 2014).

2.2 Fitoterapia

Plantas medicinais representam a mais antiga fonte de farmacoterapia usada pela humanidade (FÜRST & ZÜNDORF, 2015) e podem ser definidas como espécies vegetais, cultivadas ou não, que são utilizadas com propósitos terapêuticos (ANVISA, RDC nº 10, de 09 de março de 2010). Essas plantas podem ser vistas como um medicamento em potencial, e a partir delas podemos obter um fármaco fitoterápico, de forma técnica e elaborada com a finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, visando benefício para o usuário. O fitoterápico é um fármaco obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas extraídas de vegetais e possui eficácia, riscos, reprodutibilidade e constância de sua qualidade devidamente conhecidas (BRASIL, 2004).

Esta forma de medicina tem suas origens em culturas antigas, incluindo a dos egípcios, índios americanos e chineses. O isolamento e purificação dos ingredientes ativos de plantas medicinais foram algumas das principais forças que levaram ao nascimento da indústria farmacêutica, no século 19. Depois de um longo período de negligência, existe um interesse renovado na análise de produtos naturais. Muitos estudos internacionais têm mostrado que as plantas são capazes de tratar a doença e a melhoria da saúde, muitas vezes, sem efeitos colaterais significativos (SEN et al., 2011).

A Declaração de Alma-Ata, em 1978, apurou que 80% da população mundial utilizavam as plantas medicinais ou preparações destas, o que determinou o primeiro grande estímulo ao uso de plantas medicinais dado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O Ministério da Saúde em 2006 fomentou o uso de plantas medicinais através de várias formas de terapias, dentre elas a fitoterapia, através da criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) dentro do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006).

O Ministério da Saúde brasileiro instituiu a fitoterapia como prática oficial da medicina e definiu como prioridade a sua investigação (SILVA et. al., 2006). A farmacologia das plantas e o desenvolvimento de suas características químicas vêm sendo alvo crescente de pesquisas no Brasil (YUNES, 2001). Com

a criação da Política Nacional de Medicamentos Fitoterápicos, o Brasil está iniciando a padronização da matéria prima e emergindo no mercado mundial, mas ainda é preciso incentivar as indústrias farmacêuticas brasileiras para produção destes produtos em larga escala (CRUZ, 2009).

A partir das plantas já foram obtidas ampla variedade de substâncias (ROBBERS, 1997) contendo agentes químicos com potencial atividade farmacológica (PAGE et al., 2004) o que culminou com o desenvolvimento de fármacos de grande importância na terapêutica atual (ALVES, 2001) como por exemplo a vincristina e morfina, utilizados de forma corriqueira na clínica médica (CECHINEL FILHO, 1998). Assim, 52% dos novos fármacos possuem alguma relação direta ou indireta com os produtos naturais (CRUZ, 2009).

A maioria das pessoas nos países menos desenvolvidos confia em remédios de ervas como cuidado de saúde primário. Com base no progresso científico e técnico, as opções para uma produção de alta qualidade de medicamentos à base de plantas têm sido amplamente melhoradas nas últimas décadas (FÜRST e ZÜNDOR, 2015).

O grande conhecimento popular no uso das plantas remete ao seu emprego primitivo, através de método envolvendo apenas a experimentação, tentativa e observação (ALBANO, 2004). A aceitação da fitoterapia como uma "alternativa natural e suave" para drogas sintéticas é muito alta dentro do público em geral em países desenvolvidos e, a partir de uma perspectiva global, os números de vendas de medicamentos à base de plantas estão constantemente aumentando. Em contraste com a popularidade de ervas medicinais, médicos têm frequentemente uma vista muito crítica deles. Esta perspectiva discute as razões e implicações da falta de evidência científica e também do entendimento errado dos princípios da fitoterapia racional (FÜRST & ZÜNDORF, 2015).

Atualmente o comércio de plantas medicinais ainda está em vigor, fomentado pela cultura popular e cada vez mais embasado por pesquisas que buscam uma forma de tratamento alternativo para patologias, e por intermédio da identificação bioquímica das espécies e da pesquisa da dosagem terapêutica, legitimam e dão base a fitoterapia. O menor custo e menor incidência de efeitos

colaterais (ANIBAL, 2007), boa relação custo-benefício, boa ação biológica, baixa toxicidade e efeitos colaterais são alguns dos benefícios do uso de plantas medicinais (OZAKI & DUARTE, 2006). Considerando que a forma sintética depende da produção, comercialização e desenvolvimento de tecnologia adequada, os compostos de origem natural levam menos tempo para serem obtidos (ROBBERS, 1997).

As plantas desencadeiam a produção de fitoterápicos que mobilizam um mercado mundial bilionário (YUNES, 2001). A indústria cosmética tem investido em pesquisas para o desenvolvimento de fitocosméticos com plantas medicinais visando um mercado promissor (LOPES et. al., 2006). Grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, onde preparações vegetais são comercializadas com rotulagem industrializada (VEIGA JR. et al., 2005).

O Brasil possui características naturais que favorecem o uso de plantas na medicina, dentre elas a grande diversidade e extensão da flora brasileira (YUNES, 2001), além disso, a fácil obtenção, a tradição do uso de plantas medicinais e a dificuldade de obtenção de medicamentos nos países em desenvolvimento, explica a alta prevalência no uso de plantas medicinais no Brasil (VEIGA JR. et. al., 2005). O uso de espécies medicinais pela população brasileira é grande e este conhecimento vem sendo transmitido de uma geração para outra (DOURADO, 2006). Em alguns estados brasileiros há alta prevalência no uso de plantas medicinais (SILVA et al., 2006).

Veiga Jr. et al (2005) destaca o alto consumo de plantas medicinais da flora nativa no Brasil sem a devida comprovação de suas atividades farmacológicas. Pesquisas científicas com plantas são fundamentais para o conhecimento das ações terapêuticas da planta e de seus possíveis efeitos adversos, muitas vezes subestimados. Reações alérgicas, efeitos tóxicos em órgãos e até o desenvolvimento de certos tipos de câncer estão entre os principais problemas causados pelo uso indiscriminado e prolongado de plantas medicinais (CARLINI, 2007).

Apesar do amplo uso de plantas medicinais, o Brasil ainda não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos (YUNES, 2001). As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JR. et al., 2005).

O conhecimento das atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro devem ser estudadas pelos profissionais da área da saúde em conformidade com os costumes, tradições e condição socioeconômica da população, somente assim poderá haver a inclusão eficaz desta forma de medicina no Sistema Único de Saúde (SUS) (SILVA et al, 2006).

O emprego de plantas medicinais tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizadas pelo homem moderno (LORENZI, 2002). Vários procedimentos clínicos tradicionais utilizam plantas medicinais (VEIGA JR. et al., 2005), e estas funcionam como uma forma de tratamento alternativo para diversas doenças muito usada pela população como uma opção além dos medicamentos alopáticos para proporcionar uma melhor qualidade de vida (TAUFNER et al., 2006).

As plantas medicinais vêm sendo usadas durante séculos como uma alternativa ao tratamento de diversas doenças dermatológicas (RASKIN et al., 2002). As pesquisas por novas formas farmacêuticas fitoterápicas para uso na pele vêm crescendo, a fim de viabilizar fitofármacos eficazes, seguros e de boa biodisponibilidade (LOPES et al., 2006).

Em 1984 na Guiana Francesa é registrado uma das primeiras buscas de plantas para o tratamento da leishmaniose partindo do conhecimento da população local que já utilizava estas plantas. Em análises *in vitro* e *in vivo* várias plantas apresentaram atividade leishmanicida contra as formas de amastigotas de *L. amazonensis* (SAUVAIN et al., 1994). Desta forma, o uso de plantas no tratamento da LTA é uma prática antiga entre as populações de áreas

endêmicas. Porém, esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre sua real eficácia sendo necessárias pesquisas que fundamentem esse uso (MOREIRA et al., 2002).

Foram relatadas na literatura 239 moléculas químicas naturais isoladas de plantas que já foram avaliadas quanto a sua atividade leishmanicida. Os compostos ativos, que foram isolados e identificados, pertencem as classes de alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, lactonas, quinoides, flavonoides, diterpenos, os esteróides, lípidos, iridóides, heterociclos de oxigênio, benzenóides, hidratos de carbono, linhanos, cumarinas, fenilpropanoídicos, depsídeos, composto de enxofre e monoterpene (ROCHA et al., 2005).

Várias plantas vêm sendo pesquisadas e já foi constatada em diversas delas atividade leishmanicida indicando que as plantas podem representar uma futura alternativa no tratamento das leishmanioses. Esta atividade depende em grande parte do solvente utilizado para a extração e da parte da planta utilizada, que poderá conter compostos fitoquímicos com efeito leishmanicida (ADEBAYO et al., 2013).

Os resultados obtidos a partir da pesquisa de produtos naturais com atividade leishmanicida dão novo ímpeto para a obtenção de compostos sintéticos valiosos (CARVALHO et al., 2000).

2.3 Espécie em estudo

2.3.1 *Vanillosmopsis arborea* Baker (Asteraceae)

Vanillosmopsis arborea é uma espécie vegetal nativa da região da Chapada do Araripe, localizada no sul do estado do Ceará, se apresenta como um pequeno arbusto e pode alcançar até quatro metros de altura. Também é conhecida por seu alto valor econômico, sendo considerada uma madeira de boa qualidade, bastante resistente e com alto teor de óleo essencial, característica que lhe conferiu o nome popular de “candeeiro” (MATOS et al., 1988; CAVALCANTI & NUNES, 2002).

A espécie em estudo está inserida na família Asteraceae, a qual é composta por aproximadamente 25.000 espécies, distribuídas em cerca de 1.100 gêneros. No Brasil existem por volta de 180 gêneros, entre os quais podemos citar a *Vanillosmopsis erythropappa*, *Vanillosmopsis brasiliensis*; *Vanillosmopsis capitata*, *Vanillosmopsis pohlii* e *Vanillosmopsis polycephala*. As plantas desta família possuem um enorme potencial químico e biológico, sendo algumas delas muito utilizadas como medicamentos fitoterápicos (BARROSO, 1986; MENDONÇA et al, 1998; SOUZA et al., 2003; ANDRADE et al, 2004).

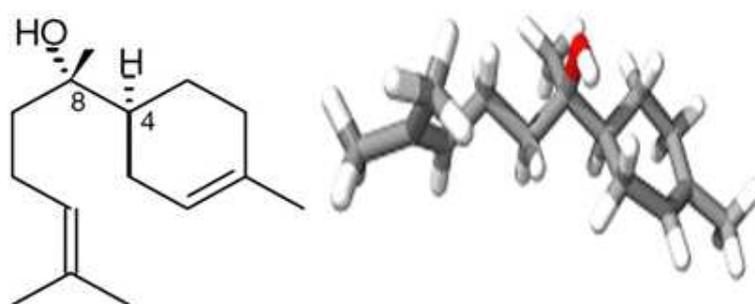
Nos últimos anos, diversas propriedades medicinais têm sido atribuídas ao óleo essencial da *Vanillosmopsis arborea* (OEVA). Entre as principais aplicações farmacológicas da planta estão o efeito gastroprotetor, antinociceptivo, antiinflamatório, larvicida, antimicrobiano e antiparasitário. Assim vários estudos foram feitos buscando analisar a composição deste óleo para poder compreender melhor os efeitos medicinais desta planta (FURTADO et al, 2005; LEITE et al., 2009; SANTOS, et al., 2009; LEITE et al., 2011; MOTA et al., 2012).

A composição química do óleo essencial desta espécie é em sua maior parte composta por α -bisabolol, aproximadamente 70% (figura 01). Os demais compostos presentes em concentrações menores são α -cadinol (8,4%), elemicina (6,21%), β -bisaboleno (4,46%), δ -guaiene (2,31%), β -cubebene (1,76%), e estragole (1,08%). Com exceção da elemicina e do estragole, que são fenilpropenos, os demais compostos são da classe dos terpenos. Estes são produtos naturais bastante encontrados em plantas superiores e que costumam ser utilizados como base para vários medicamentos fitoterápicos (COLOMA et al., 2011; LEITE et al, 2014).

Entre as classes de terpenos está o α -bisabolol, um álcool de sesquiterpeno que possui algumas atividades farmacológicas bem estabelecidas. Destas funções, podemos destacar sua ação antiparasitária e pró-apoptótica. Com relação à esta função, alguns estudos têm demonstrado que este composto é capaz de induzir a apoptose em células neoplásicas. Uma pesquisa desenvolvida por Bonifácio e colaboradores (2012) revelou que o α -

bisabolol foi capaz de promover a apoptose em células leucêmicas por provocar a perda da integridade da membrana plasmática, a abertura irreversível do poro de transição mitocondrial, alteração do potencial de membrana mitocondrial, inibição do consumo de oxigênio e aumento dos níveis intracelulares das espécies reativas de oxigênio (SEKI et al, 2011).

Figura 1. Estrutura química do α -bisabolol.



Fonte: (LEITE et al., 2012).

Sobre sua atividade antiparasitária, algumas pesquisas demonstraram que o α -bisabolol possui ação leishmanicida *in vitro* contra as formas amastigota e promastigota da *L. amazonensis*. Segundo Rottini e colaboradores (2015), as formas promastigotas e amastigotas tratadas com o α -bisabolol apresentaram uma série de alterações ultra-estruturais como a perda de organelas citoplasmáticas e a presença de inclusões lipídicas. De acordo com este estudo, aproximadamente 69% das formas promastigotas tratadas sofreu danos na membrana mitocondrial, sugerindo que o composto é capaz de inibir a atividade metabólica do parasita.

Outro experimento, realizado por Colares e colaboradores (2013), mostrou a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* e do α -bisabolol separadamente. Os resultados encontrados por estes pesquisadores mostraram que tanto o óleo essencial quanto o α -bisabolol possuem um grande potencial leishmanicida *in vitro* contra *L. amazonensis* e nenhum efeito citotóxico sobre os macrófagos tratados com as duas substâncias foi observado, indicando que o óleo essencial desta planta pode ser uma

alternativa bastante eficiente para o tratamento das leishmanioses. Entretanto, ainda existem poucos estudos relacionando o óleo essencial da *V. arbórea* com o tratamento das leishmanioses, sendo necessárias mais pesquisas para compreender melhor os efeitos dessa droga vegetal *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade leishmanicida *in vivo* do óleo essencial de *Vanillosmopsis arbórea* Baker no tratamento da leishmaniose tegumentar murina.

3.2 Específicos

- Avaliar a carga parasitária de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *Leishmania amazonensis* e tratados com óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker.
- Avaliar a bioquímica da função hepática e renal de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *L. amazonensis* e tratados com óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker.
- Avaliar efeitos tóxicos da pele, fígado, baço e rim de camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *L. amazonensis* e tratados com óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

A espécie *Vanillosmopsis arborea* foi coletada na fazenda Barreiro Grande, na Chapada do Araripe, no município de Crato, Ceará. A identificação botânica e o depósito da exsicata foram realizados no Herbário Caririense

Dárdano de Andrade Lima – HCDAL da Universidade Regional do Cariri – URCA pela Dr. Arlene Pessoa, com o número 9493.

4.2 Obtenção do óleo essencial

Os caules frescos (850g) da *V. arborea* foram triturado e a extraídos por hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger durante duas horas. O óleo foi seco utilizando sulfato de sódio anidro e armazenado protegido da luz a 8° C. Obtendo-se rendimento de óleo essencial de 0,9%.

4.3 Análise do óleo essencial

A identificação do óleo essencial foi realizada utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrofotômetro de massa Shimadzu GC/MS - série QP2010. No sistema GC/MS fez uso de coluna capilar Rtx-5MS (0,25mm de diâmetro interno, 30m de comprimento e 0,25µm espessura de filme), hélio como gás de arraste a 1,5mL/min, temperatura do injetor de 250°C, temperatura do detector 290°C, temperatura da coluna 60°C-180°C a 5°C/min, em seguida, 180°-280°C a 10°C/min (10 min). Foi utilizada a razão de *split* de 1: 200. O volume injetado foi de 1µL de 25µL de óleo essencial em 5 mL de CHCl₃. Tempo de corte de solvente de 2,5min. O espectrômetro de massa foi operado com 70eV de energia de ionização. A identificação de componentes individuais foi baseada na sua fragmentação espectral de massa de acordo com a biblioteca de espectros de massa NIST 98, índices de retenção e comparação com os dados de espectros de massas publicados.

4.4 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com 4-6 semanas de idade, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ, e mantidos em biotério experimental sob temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libidum*. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório da UEMA (CEUA-FIOCRUZ) obtendo a licença LW72/12.

4.5 Manutenção de parasito e infecção dos animais

A espécie *L. amazonensis* foi mantida no laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do Instituto Oswaldo Cruz, IOC-FIOCRUZ/RJ, por passagens seriadas em camundongos BALB/c. Os parasitos foram obtidos de uma lesão nodular não ulcerada de fragmentos de pele da pata destes animais após ruptura do tecido infectado em um homogeneizador Potter-Elvehjeng em tampão PBS com pH 7,2. A suspensão foi filtrada em gaze e a viabilidade dos parasitas feita usando o corante eritrosina B. As amastigotas foram ressuspendidas em PBS, sendo inoculados 50µL contendo 10⁴ amastigotas por via subcutânea na região dorsal caudal, próximo à cauda dos camundongos.

4.6 Formulação dos cremes utilizados no tratamento

O óleo essencial de *V. arborea* foi utilizado de forma tópica em três concentrações diferentes, 5%, 2,5% e 1%. O veículo utilizado foi o creme Lanette, um creme aniônico emulsificante amplamente utilizado em produtos farmacêuticos manipulados. O creme foi preparado uma vez por semana e armazenado protegido da luz a 2-8°C.

4.7 Ensaios terapêutico e de toxicidade

Foram realizados dois ensaios de tratamento: um terapêutico, com animais infectados com *L. amazonensis* no dorso, e outro de toxicidade, com animais não infectados.

No ensaio terapêutico, após 45 dias de infecção, quando as lesões começavam a apresentar pequenas áreas de ulceração, os animais foram submetidos ao tratamento experimental. Os animais foram tratados diariamente, uma vez por dia, durante 21 dias com as formulações tópicas. O tratamento com Glucantime, droga de referência, ocorreu por via intramuscular, com 2 aplicações por semana no intervalo de 3 a 4 dias. Os animais foram divididos em grupos conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Divisão em grupos do ensaio terapêutico com camundongos BALB/c infectados com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* na região caudal do dorso e tratados com formulação tópica à base de óleo essencial de *Vanillosmopsis arbórea*

N	Infecção	Tratamento
5	<i>L. amazonensis</i>	Creme com 5% de óleo de <i>V. arbórea</i>
5	<i>L. amazonensis</i>	Creme com 2,5% de óleo de <i>V. arbórea</i>
5	<i>L. amazonensis</i>	Creme com 1% de óleo de <i>V. arbórea</i>
5	<i>L. amazonensis</i>	Glucantime 20mg/kg
5	<i>L. amazonensis</i>	Creme Lanette
5	PBS	PBS

No ensaio de toxicidade os animais foram tratados de forma semelhante ao ensaio de infecção e tratamento. Camundongos não infectados foram tratados diariamente, uma vez por dia, durante 21 dias com as formulações tópicas. O tratamento com Glucantime ocorreu por via intramuscular, com 2 aplicações por semana no intervalo de 3 a 4 dias. Os animais foram divididos e grupos conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Divisão em grupos do ensaio de toxicidade com camundongos BALB/c tratados com formulação tópica à base de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea*

N	Tratamento
5	Creme com 5% de óleo de <i>V. arbórea</i>
5	Creme com 2,5% de óleo de <i>V. arbórea</i>
5	Creme com 1% de óleo de <i>V. arbórea</i>
5	Glucantime 20mg/kg
5	Creme Lanette

Após o período de tratamento de ambos os ensaios, foi induzida a morte dos animais por asfixia em uma câmara com atmosfera rica em CO₂. Para o ensaio terapêutico, durante a necropsia foram retirados fragmentos de lesão para a quantificação de carga parasitária, fragmentos de lesão primária, linfonodo drenante, fígado, baço e rim para análise histopatológica, e sangue para obtenção de soro e dosagem de parâmetros bioquímicos de função hepática e renal. Para o ensaio de toxicidade, fragmentos de pele da região do dorso submetida ao tratamento, linfonodo drenante, fígado, baço e rim foram coletados para análise histopatológica, e o soro foi obtido a partir do sangue dos animais para a dosagem de parâmetros bioquímicos de função hepática e renal.

4.8 Quantificação de carga parasitária

Para verificar a presença e quantificar DNA de *Leishmania*, fragmentos de tecido da pele do local onde foi realizada a inoculação de parasito foram obtidos de três animais de cada grupo no momento da necropsia e armazenados em freezer -70°C até o processamento para a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). O DNA foi extraído de acordo com protocolo de extração fenol/clorofórmio. O método consistiu-se resumidamente em uma etapa inicial de lise celular utilizando-se 500µL de tampão de lise (Tris 50mM pH 8,0; NaCl 10mM; EDTA 5mM pH 8,0; SDS 0,5%) e 5µL de proteinase K (20mg/mL) a temperatura de 55°C em banho-maria sob agitação, overnight. Após o tecido dissolver completamente no líquido, o processo de extração continua com o acréscimo de 500µL de fenol saturado tamponado (pH 8,0), agitação por 1 minuto e centrifugação a 15000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo eppendorf onde foi acrescentado clorofórmio-álcool isoamílico (1:1) com agitação por 1 minuto e centrifugação a 14000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo de 1,5 mL. Para precipitação do DNA genômico foi adicionado 1mL de etanol absoluto com posterior centrifugação a 14000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e após evaporação completa do álcool remanescente o precipitado foi diluído em 100µL de água de injeção e mantido

a 4°C até quantificação. O rendimento da extração foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific).

A PCR foi realizada com 20ng de amostra de DNA, utilizando-se os primers para kDNA1 de *L. amazonensis* com sequência sense 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGC-3' e anti-sense 5'-TACACCAACCCCCAGTTTGC-3', e primers do gene constitutivo para β -actina de camundongo com sequência sense 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' e anti-sense 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'. A reação ocorreu no equipamento Applied Biosystems Step One Plus™ com Fast SYBR® Green Master Mix, volume final de reação de 20 μ L, e os seguintes parâmetros de reação: 95°C por 20 segundos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 3 segundos e anelamento a 60°C por 30 segundos. A curva de dissociação teve um ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto com incremento de 0,3°C e 95°C por 15 segundos. A quantificação foi realizada a partir de curva padrão de DNA de *Leishmania* com concentração conhecida.

4.9 Histopatologia

Fragmentos de pele, linfonodo drenante, baço, fígado e rim de dois animais de cada grupo foram colocados em cassetes histológicos devidamente identificados e fixados por 48h em formalina tamponada a 10% (formol a 37%, 4% de fosfato de sódio monobásico, 6,5% de fosfato de sódio bibásico, água destilada). Os tecidos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de 5 μ m foram realizados em micrótomo e colocados em lâminas para coloração em hematoxilina e eosina (HE) e montagem em Entellan. As lâminas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz.

4.10 Análises bioquímicas de função hepática e renal

Dosagens de alanina transaminase, aspartato transaminase, ureia e creatinina foram realizadas em amostras de soro obtidas após a eutanásia dos camundongos tanto nos experimentos de toxicidade, quanto nos ensaios

terapêuticos. Estas análises foram realizadas para avaliar as funções hepática e renal, utilizando equipamento de sistema de Quimica Seca (Johnson & Johnson) da Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da FIOCRUZ.

4.11 Análise estatística

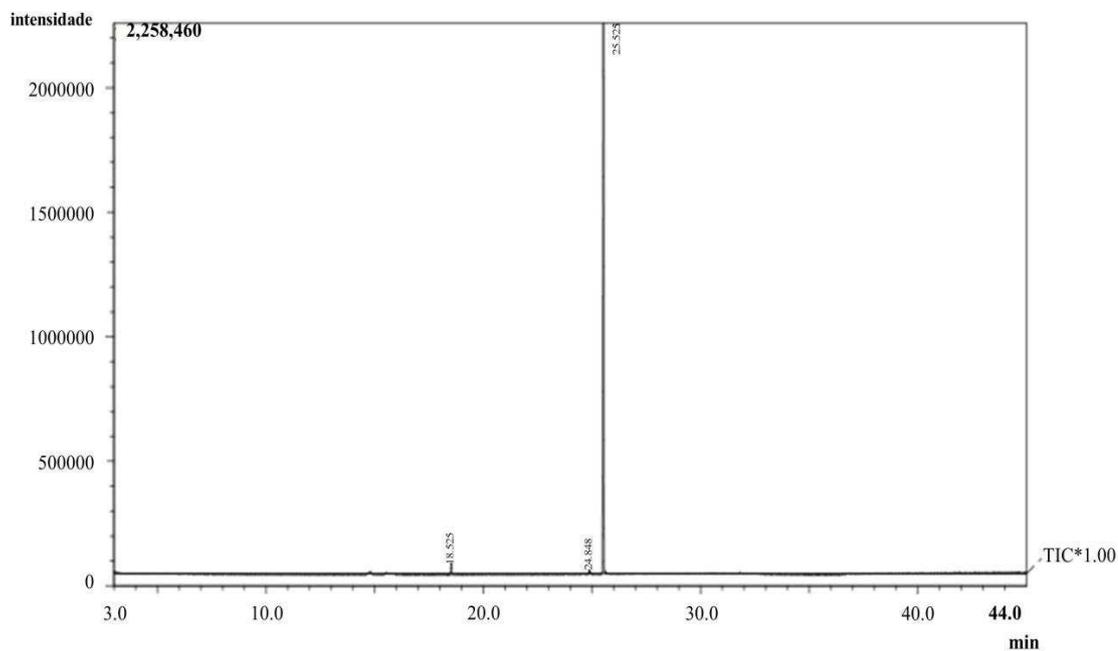
Os dados serão analisados empregando-se o software GraphPad Prism 5. Para dados apresentando uma distribuição paramétrica será utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. Para dados com distribuição não paramétrica será realizado pelo o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunns. Em todas as análises, as diferenças serão consideradas significativas quando $p \leq 0,05$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da composição química do OEVA

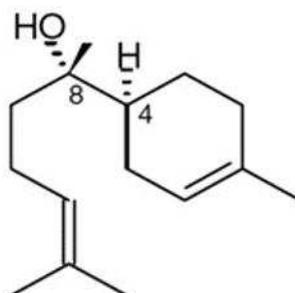
Foi realizado o método de Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-EM) para a análise do OEVA processo que combina as características da cromatografia gasosa e da espectrometria de massa para identificar diferentes substâncias em uma amostra (Figura 1).

Figura 2 – Cromatograma do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker.



O detector de espectrometria de massas tem sido bastante utilizados na análise de compostos que além de apresentar baixos limites de detecção, oferece informação estrutural dos compostos (CRISTALE et al, 2008).

Figura 2 – Estrutura química do α -bisabolol.



Fonte: (LEITE et al., 2012)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrofotômetro de massa Shimadzu GC/MS - série QP2010. Pode-se observar que os picos puderam identificar os seguintes compostos do OEVA de acordo com a figura 1. Coincidindo com o que já foi analisado por Colares et al, 2013 que demonstrou o α -bisabolol como composto majoritário do referido óleo, com mais de 90% em sua composição química.

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker

Componentes	Tempo de retenção (min)	(%)
<i>o</i> -metil eugenol	18.5	1.6
Óxido de bisabolol	24.9	0.5
α -bisabolol	25.5	97.9

5.2 Avaliação da carga parasitária

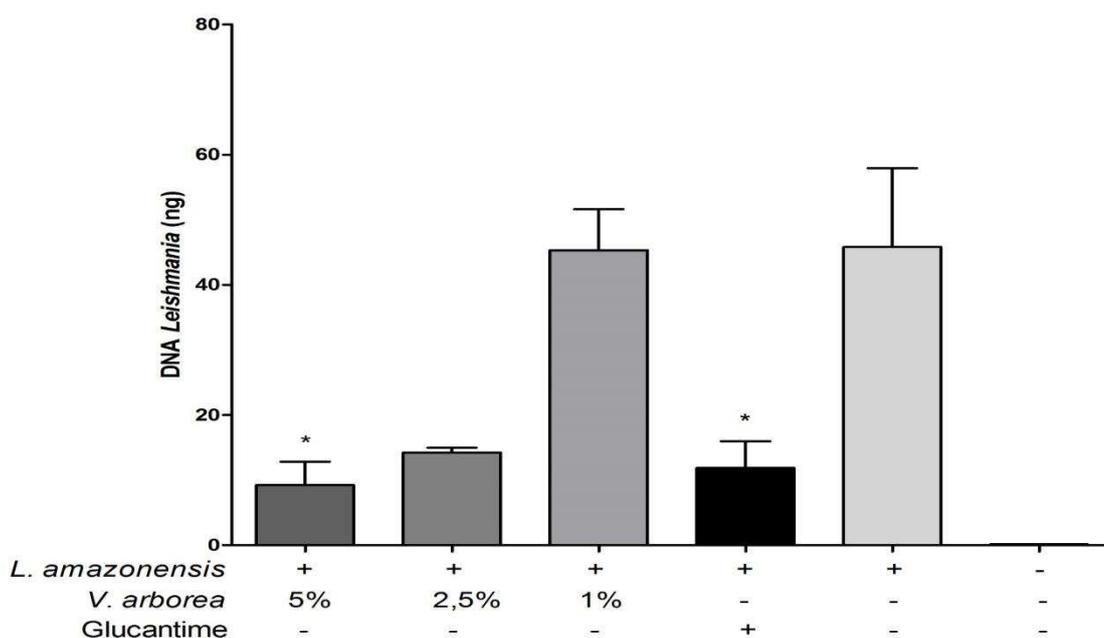


Figura 3. Quantificação de DNA de *Leishmania amazonensis* em lesão de camundongos BALB/c infectados e tratados por 21 dias com creme à base de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* ou com glucantime, 20mg/kg por via intramuscular. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo infectado e não tratado, após análise pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

A avaliação da carga parasitária foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)-PCR que permitiu amplificar em escala exponencial as seqüências de DNA de leishmânia. A carga parasitária observada no grupo de animais infectados e tratados com o OEVA apresentou diferença de resultado entre nas seguintes concentrações (5%, 2,5% e 1%) foi observado melhor ação leishmanicida na concentração de 5%, ocorrendo uma menor atividade leishmanicida em 2,5% e 1%. A maior carga parasitária foi observada na concentração de 1% do OEVA. De acordo com o tratamento na concentração de 5% do OEVA em comparação com o tratamento com o Glutamine não houve diferença estatística significativa da ação leishmanicida(Figura 3)

A resposta imunológica à leishmaniose depende da ativação dos macrófagos infectados para que estes eliminem os parasitos intracelulares. Desta forma os macrófagos produzem compostos oxigenados que incluem peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, ânion superóxido e radicais nitrogenados como o óxido nítrico (NO), por exemplo (MURRAY et al., 1985; MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000; COLARES et al, 2013; OLEKHNOVITCH et al., 2014).

A *Vanillosmopsis arborea* é uma planta que apresenta mais de 90% de α -bisabolol (Colares et al, 2013). Atualmente a aplicação do α -bisabolol está presente na indústria farmacêutica, nas formulações para área dos olhos, emulsões para peles sensíveis e géis pós-sol, cremes infantis, emulsões corporais, emulsões para peles secas, cremes para as mãos, sabonetes faciais, filtros solares, cremes noturnos, formulações pós-barba, cremes e géis pós-

depilação e loções tônicas em baixas concentrações de α -bisabolol (Villegas et al., 2001; Hernandez-Ceruelos et al, 2002; Santos et al, 2011).

No presente trabalho, a redução da carga parasitária da *L. amazonenses* mais significativa foi na concentração de 5% de OEVA com animais infectados e tratados com o parasito, além disso comparando-se com o tratamento com a droga padrão Glucantime não houve diferença estatística significativa da atividade leishmanicida, (Figura 4) demonstrando boa eficácia do OEVA no tratamento da *L. amazonensis*.

Vanillosmopsis arborea Baker (Asteracea) apresenta grande valor econômico devido suas propriedades anti-inflamatórias (Leite et al, 2011), atividades antimicrobianas, gastroprotectores comprovado potencial leishmanicida in vitro contra *L. amazonensis* e nenhum efeito citotóxico sobre os macrófagos (Colares et al, 2013), provenientes do alto teor de α -bisabolol, no óleo essencial de sua madeira. Considerando-se que no presente trabalho a concentração de 5% de OEVA no tratamento da leishmaniose cutânea foi a mais eficaz, apesar da indústria farmacêutica utilizar valores bem menores de α -bisabolol nas formulações de cosméticos geralmente de 0,1% a 0,5% do referido composto, mesmo assim não apresentou citotoxicidade enquanto que o medicamento padrão usualmente utilizado no tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar Glucantime desenvolve depois da continuidade do uso reações adversas como: dores nas juntas, dores musculares, náusea e vômito, dor de cabeça, febre, anorexia, alterações nos testes de função do fígado, níveis de lipase e amilase, leucopenia, anormalidades no eletrocardiograma (Costa, Tatiane Luiza da, 2011)

No que se refere a via de administração eleita do experimento foi a via tópica com formulações em diferentes concentrações (5%, 2,5% e 1%). A via de administração da droga de referência Glucantime foi via parenteral (intramuscular) sendo que na concentração de 5% de OEVA apresentou atividade leishmanicida sem diferença estatística a do Glucantime, ou seja, a via

de administração não interferiu na atividade leishmanicida no tratamento contra *L. amazonensis*.

Estudos in vitro confirmam o potencial leishmanicida de α -bisabolol . Rottini et al. (2015) realizou estudo em que α -bisabolol demonstrou promissora ação leishmanicida contra promastigotas *L. amazonensis* além de ser capaz de penetrar em macrófago e destruir a forma amastigota. O composto α -bisabolol mostrou atividade leishmanicida significativa contra 50% das promastigotas na concentração de 8,07 ug / ml (24 h) e 4,26 ug / ml (48 h). Contra amastigotas intracelulares a IC50 (concentração inibitória) de α -bisabolol (24 h) foi de 4,15 ug / ml.

Várias ações terapêuticas são atribuídas a α -bisabolol, como sua ação na redução da massa de tumor mamário em ratos , promotor da ação de células assassinas naturais (NK) (COSTARELLI et al., 2010), potente molécula pró-apoptótica, ação contra células de leucemia aguda primárias (CAVALIERI et al, 2011), bloqueador do sistema nervoso periférico (ALVES et al., 2010), gastroprotetor (BEZERRA et al., 2009), antioxidante (BRAGA et al., 2009), mutagênico e antimutagenico (GOMES-CARNEIRO et al.,2005) e potencial ação na cicatrização de feridas (VILLEGAS et al.,2001).

Apesar do efeito antitumoral do composto, o seu tropismo por células do sistema imunológico pode ter efeitos fundamentais no microambiente imunológico do tumor, causando evasão de inflamação e geração de tolerância imunológica (VINAY et al., 2015).

O composto α -bisabolol já demonstrou atividade contra outras espécies de *Leishmania*. Esse mesmo composto isolado de *Chamomilla recutita* demonstrou ação contra promastigotas de *L. infantum* (MORALES-YUSTE et al., 2009).

A resposta imunológica à leishmaniose depende da ativação dos macrófagos infectados para que estes eliminem os parasitos intracelulares. Desta forma os macrófagos produzem compostos oxigenados que incluem peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, ânion superóxido e radicais

nitrogenados como o óxido nítrico (NO) (MURRAY et al., 1985; MURRAY & DELPH-ETIENNE, 2000; COLARES et al, 2013; OLEKHNOVITCH et al., 2014). A *V. arborea* é uma planta que apresenta mais de 90% de α -bisabolol (COLARES et al, 2013). Atualmente a aplicação do α -bisabolol está presente na indústria farmacêutica, nas formulações para área dos olhos, emulsões para peles sensíveis e géis pós-sol, cremes infantis, emulsões corporais, emulsões para peles secas, cremes para as mãos, sabonetes faciais, filtros solares, cremes noturnos, formulações pós-barba, cremes e géis pós-depilação e loções tônicas em baixas concentrações (Villegas et al., 2001; Hernandez-Ceruelos et al, 2002; Santos et al, 2011).

Vanillosmopsis arborea Baker (Asteracea) apresenta grande valor econômico devido suas propriedades anti-inflamatórias (LEITE et al, 2011), atividades antimicrobiana, gastroprotetora, comprovado potencial leishmanicida *in vitro* contra *L. amazonensis* e nenhum efeito citotóxico sobre os macrófagos (COLARES et al, 2013), provenientes do alto teor de α -bisabolol, no óleo essencial de sua madeira. Considerando-se que no presente trabalho a concentração de 5% de OEVA no tratamento da leishmaniose cutânea foi a mais eficaz, apesar da indústria farmacêutica utilizar valores bem menores de α -bisabolol nas formulações de cosméticos geralmente de 0,1% a 0,5% do referido composto, mesmo assim não apresentou citotoxicidade enquanto que o medicamento padrão usualmente utilizado no tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar Glucantime desenvolve depois da continuidade do uso reações adversas como dores nas juntas, dores musculares, náusea e vômito, dor de cabeça, febre, anorexia, alterações nos testes de função do fígado, níveis de lipase e amilase, leucopenia, anormalidades no eletrocardiograma (COSTA, TATIANE LUIZA, 2011).

A via de administração eleita do experimento foi a via tópica com formulações em diferentes concentrações (5%, 2,5% e 1%). A via de administração da droga de referência Glucantime foi via parenteral (intramuscular).

5.3 Avaliação histopatológica

Os camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania amazonensis* apresentavam intensa reação inflamatória rico em vacúolos parasitóforos repletos de parasitos, No entanto, no grupo tratado observou-se que a reação inflamatória era circunscrita (Figura 4 A/B), sendo um processo inflamatório crônico inespecífico. Esses achados histopatológicos estão de acordo com estudos realizados por BOTELHO et al, 1998 e Fontes Alves, Cibele. 2011. Dias, Beatriz Rocha Simões, 2014 constatou a presença de vacúolos parasitófos induzidos por *L. amazonensis* em macrófagos de camundongos CBA que levou a diminuição da infecção que se deu por fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major* pois os parasitos continuam a interagir com a membrana da célula, mas não são internalizadas. O que vem evidenciar a eficácia do OEVA a 5% no tratamento das leishmanioses.

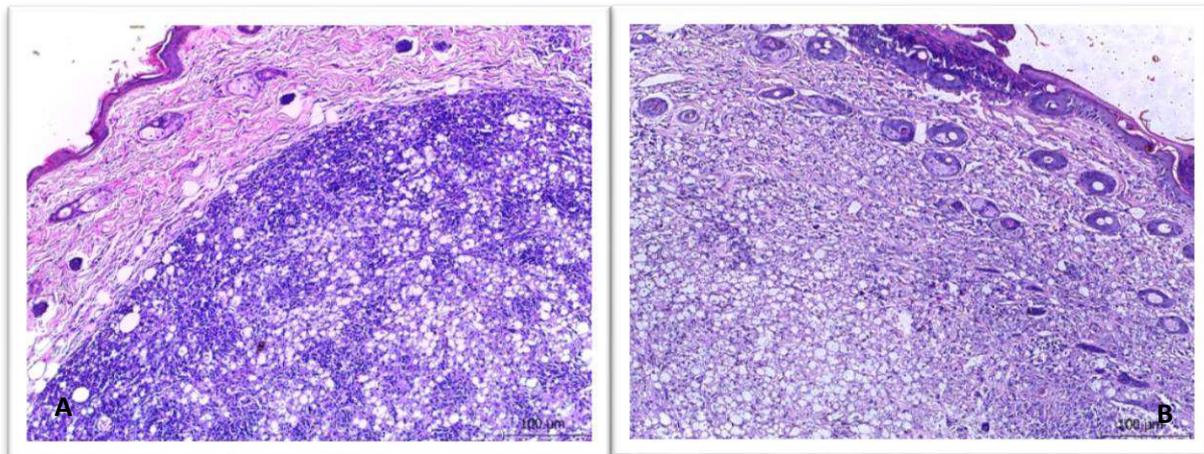


Figura 4 A/B: Pele. A. Camundongo infectado com 10^4 amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratado com 5% de OEVA. Observa-se reação inflamatória circunscrita rica em vacúolos parasitóforos (seta). B. Camundongo infectado com 10^4 amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratado glucantime. Lesão ulcerativa não circunscrita rica em parasitos. Coloração HE barra 100 µm.

Uma das principais características histológica da lesão observada na infecção por *Leishmania* foi ocorrência de extensas áreas de necroses. Esses mesmo achados também são descritos por pesquisadores (RIDLEY *et al.*, 1980; MAGALHÃES *et al.*, 1986b; MOURA *et al.*, 2009).

5.4 Avaliação da função hepática e renal

A análise da função hepática e renal comprovou a partir das dosagens de ALT, AST, ureia e creatina de soro de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania amazonensis* e tratados por 21 dias com a formulação tópica de OEVA ou Glucantime demonstrou que a função hepática e renal não foram comprometida, não apresentando diferença estatística significativa no metabolismo hepático e renal (Figura 5 A/B/C/D/E/F/G/H).

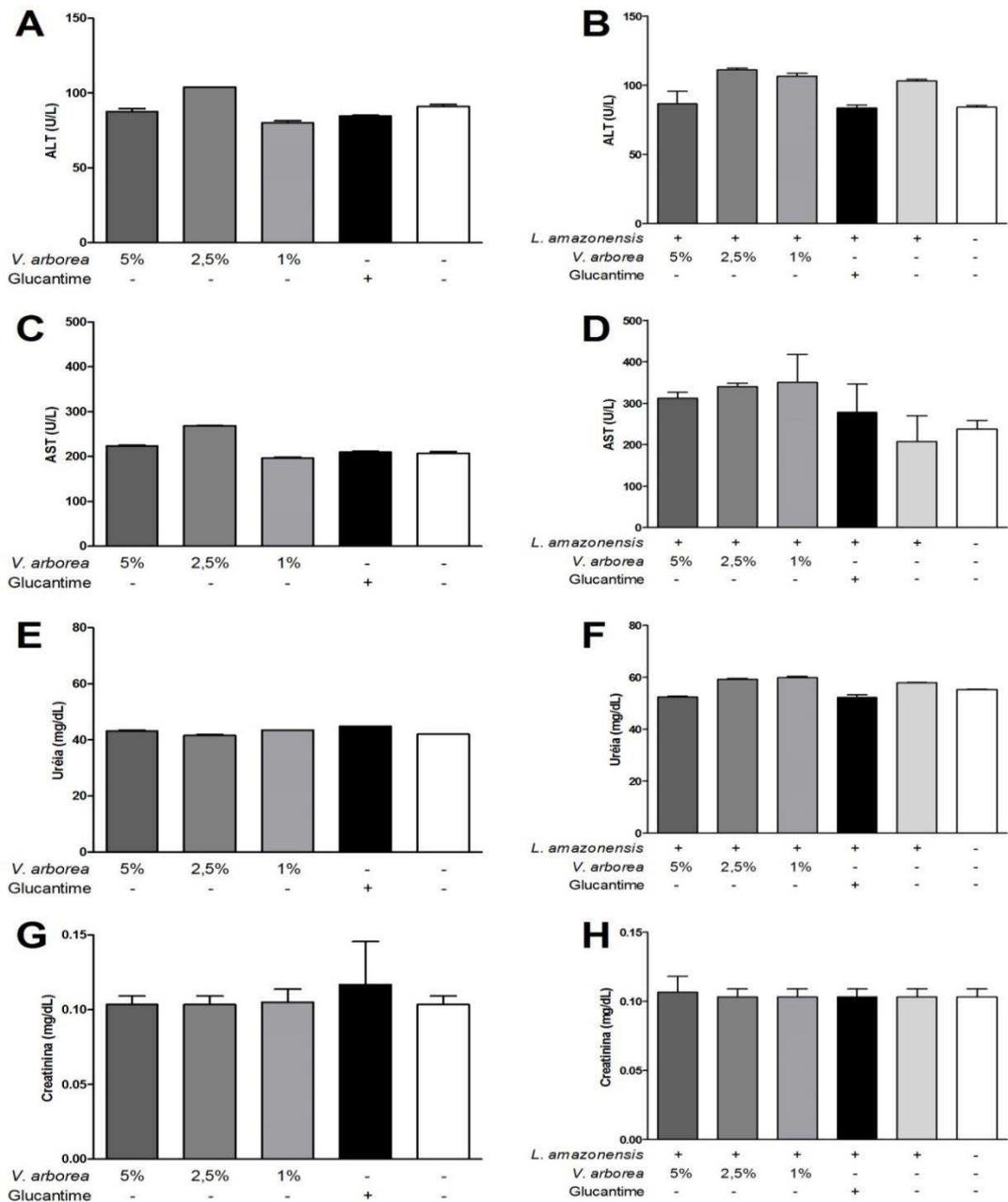


Figura 5 A/B/C/D/E/F/G/H – Dosagem de ALT, AST, ureia e creatinina de soro de camundongos BALB/c infectados ou não com *Leishmania amazonensis* e tratados por 21 dias com formulações tópicas de óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* ou glucantime, 20mg/kg por via intramuscular. Dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado em quintuplicata. ALT: alanina transaminase; AST: aspartato transaminase.

Rodrigues, Raquel Ferreira 2007 em estudos toxicológicos envolvendo avaliação de enzimas hepáticas (TGO e TGP) e concentração de creatina obteve dados semelhantes em sua pesquisa não observando no do uso do Glucantime toxicidade hepática ou renal. Sampaio et al, 1997 observou que o uso de antimoniais pentavalentes, apesar de ter rápida excreção renal, quando utilizados em doses convencionais ou mais elevadas por um período de tempo elevado provocam alteração na função renal. Em concordância com Darra et al, 2008 e Colares et al, 2013 o óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* rico em α -bisabolol observaram a baixa citotoxicidade o que confirma o resultado obtido.

Comparando-se o uso do OEVA a 5% no presente trabalho observamos um menor toxicidade em relação ao tratamento convencional, visto que o α -bisabolol composto majoritário possui baixa toxicidade, sendo este um bom indicativo comercial do uso do OEVA a 5% na terapêutica das leishmanioses.

Os nossos estudos comprovam a que α -bisabolol tem propriedades leishmanicidas promissoras podendo atuar contra as formas promastigotas, capaz de penetrar na célula, e também atuar contra as formas amastigotas, sendo menos tóxico para os macrófagos, do que para os parasitos (semelhança ao observado por Rottini 2015) e referendam o estudo *in vitro* desenvolvido por Colares et al, 2013, que observaram a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* e α -bisabolol contra promastigotas (IC₅₀ 7,35 e 4,95 ng / mL resp.) e amastigotas intracelulares (IC 50 12,58 e 10,70 ug / ml, respectivamente). Esses mesmos autores observaram também baixa citotoxicidade, o que o coloca na categoria de candidato de novos agentes terapêuticos a serem testados contra a leishmaniose em humanos. Dessa forma, abrem-se novas perspectivas para a pesquisa que pode contribuir para o desenvolvimento de produtos à base de OEVA ou α -bisabolol isolado a partir de *Vanillosmopsis arborea* Baker para o tratamento da leishmaniose cutânea.

CONCLUSÕES

O α -bisabolol é o composto majoritário de *Vanillosmopsis arborea* totalizando 97 % da sua constituição;

A dose intermediária (5%) óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker mostrou ação eficiente no tratamento da leishmaniose tegumentar murina;

A concentração de 5% do referido óleo apresentou reduziu a carga parasitária dos camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *Leishmania amazonensis*;

O óleo essencial mostrou baixa toxicidade hepática e renal;

A atividade leishmanicida no modelo murino indica que o óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker é um candidato promissor para o medicamento na terapêutica das leishmanioses.

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA A.L., CALABRESE K.S., MORTARA R.A., TEDESCO R.C., CARDOSO F.O., CARVALHO L.O.P. & GONÇALVES DA COSTA S.C. 2004. Extra-cellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Vet. Parasitol.** 128:385-390

ADEBAYO, O., DANG, T., BELANGER, A., KHANIZADEH, S. . Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*. **J. Food Res.**, 2(1), 217–226. 2013.

ALBANO, O. Estudos ressaltam propriedade anti-inflamatória tópica da camomila. **Jornal Phytomédica**, São Paulo, p. 6-7. 2004.

ALMEIDA, G. F.; FARIAS, M. R. Leishmanioses Visceral e Tegumentar Canina: **Revisão Da Literatura Trabalho monográfico do curso de pós-graduação “Latu Sensu” em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais** Campo Grande, nov. 2006.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.

ALVES C.Q., DAVID J.M., DAVID J.P., BAHIA M.V., AGUIAR R.M.. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova**. 2010;33(10):263-9

ALVES F. C. Padronização de um método imuno-histoquímico para confirmação da Leishmaniose tegumentar. **Dissertação da Faculdade de Medicina da UFMG**. 2011 ; 25T17:54:13Z

ALVES, H.M. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova Na Escola**, Rio de Janeiro, n. 3, p.10-15, maio, 2001

ANDRADE, F.M.E; DA SILVA, S.C; SBRISSIA, A.F; MOLAN, L.K; SARMENTO, D.O.L; LUPPINACCI, A.V; GONÇALVES, A.C; ZEFERINO, C.V. Produção de forragem e valor alimentício do capim-Marandu submetido a regimes de lotação contínua por bovinos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41. 2004, Campo Grande. **Anais**. 1 CD-ROM.

ANIBAL, P.C. Potencial de ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas na inibição de *Candida spp*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **[Dissertação de Mestrado]**. Piracicaba: Faculdade de odontologia de Piracicaba, 2007. 71p

AZEREDO-COUTINHO R.B.G.; CONCEIÇÃO-SILVA F.; SCHUBACH A.; CUPOLILLO E.; QUINTELLA L.P.; MADEIRA M.F.; PACHECO R.S.; VALETE-ROSALINO C.M. AND MENDONÇA S.C.F. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil Oxford Journals, **Medicine & Health**. Transactions RSTMH. Volume 101, Issue Pp. 735-737. 2007.

BARROSO G.M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa, UFV, p. 88-94,1986.

BASANO A.S., CAMARGO A.LM. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev Bras Epidemiol**. 2004; 7(3): 328-337.

BERMAN, JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last ten years. **Clin. Infect. Disease**, v.24, p.684-703, 1997.

BEZERRA, S. B.; LEAL, L. K. A. M.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAMPOS, A.R.. Bisabolol-Induced Gastroprotection Against Acute Gastric Lesions: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide, and K⁺ATP Channels. **Journal of Medicinal Food**, v.12, p.1403-1406, 2009

BHARDWAJ N., KIM P.M., GERSTEIN M.B. Rewiring of transcriptional regulatory networks: hierarchy, rather than connectivity, better reflects the importance of regulators. 2010. **Sci Signal**. 3:ra79.

BOTELHO, S. M.; VIÉGAS, I. de J. M.; CHU, E. Y. Doses de N, P e K na nutrição e no crescimento de mudas de dendzeiro. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 1998. 15 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa, 193).

BRAGA P. C. et al. Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. **Pharmacology** v.83, n. 2, p.110-115, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. 2006. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/geral/pnpic.pdf>, acessado em 30 de maio de 2015.

CAVALIERI, K.M.V.; CARVALHO, L.A. de; SILVA, A.P. da; LIBARDI, P.L.; TORMENA, C.A. Qualidade física de três solos sob colheita mecanizada de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1541-1549, 2011. DOI: 10.1590/S0100-06832011000500008

CAVALCANTI, F. S.; NUNES, E. P. Reflorestamento de clareiras na Floresta Nacional do Araripe com *Vanillosmopsis arborea* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 12 spl.: p. 94-96, 2002.

CARLINI, E. Entre conhecimento popular e científico. Disponível em: <<http://www.comciencia.br>>. Acesso em: agosto/ 2007

CARVALHO, P.B., ARRIBAS, M.A.G., FERREIRA, E.I., 2000. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? **Rev. Bras. Ci. Farm** 36 (Supl. 1), 69–96.

CECHINEL FILHO, V.; Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, 1998, 21 (1), 99 – 105.

COLARES, AV; ALMEIDA-SOUZA, F; TANIWAKI, NN; SOUZA CDA, S; DA COSTA, JG; CALABRESE KDA, S AND ABREU-SILVA, AL. *In vitro* antileishmanial activity of essential oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) baker. Evid. Based. Complement. **Alternat. Med.**, 2013: 727042. doi: 10.1155/2013/727042.

COLOMA A. G., DELGADO F., RODILLA J. M., SILVA L., SANZ J., BURILLO J. (2011). Chemical and biological profiles of *Lavandula luisieri* essential oils from western Iberia Peninsula populations. **Biochemical Systematics and Ecology** 39, 1–8.

CORTES S.J.C. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. 2008. 163p. Tese (Doutorado)–Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. MODABBER, F. Leishmaniasis. *In: Tropical Diseases Research Progress* 1991-1992. World Health Organization. Geneve, 77-87. 1993.

COSTARELLI, L., MALAVOLTA, M., GIACCONI, R., CIPRIANO, C., GASPARINI, N., TESEI, S., ET AL.. In vivo effect of alpha-bisabolol, a nontoxic sesquiterpene alcohol, on the induction of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. **Oncol. Res.** 18, 409–418. doi: 10.3727/096504010X12671222663557, 2010.

COUTINHO, SG et al. Pathogenesis and Immunopathology of leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.82, p.214-228, 1987.

CRUZ E. M.. Inibição da Arginase de *Leishmania* por Frações do Extrato Etanólico de *Cecropia pachystachya*. **[Dissertação de Mestrado]** , Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz. Salvador - Bahia – Brasil 2009.

DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Parasitol** 2007; 149:139-146.

DASZAK P, CUNNINGHAM AA. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife, 2001. **Acta Trop** 78: 103-116.

DIAS, B. R. S..Vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* interagem de forma distinta com a via autofágica. 115 f. il. **Dissertação (Mestrado)** – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014

DORVAL, M. E. M., et al. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 39(1):43-46. jan./fev., 2006.

DOURADO, R. S.; Robson N. Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) (Clusiaceae). **(Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente)** - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 2006. 104 f.

FERNANDES A.P., CANAVACI A.M., MCCALL L.I., MATLASHEWSKI G. A2 and Other Visceralizing Proteins of Leishmania: Role in Pathogenesis and Application for Vaccine Development. **Subcell Biochem**. 74:77-101, 2014. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9_3.

FLORA FILHO, R. & ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v.46, n.3, p.265-71, 2000.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M. de F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.B de, Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4 p. 627-641, 2008.

Fürst R, Zündorf I. Evidence-based phytotherapy in Europe: where do we stand? **Planta Med**. 2015; in press.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Díptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36(1):71-80. jan./fev., 2003. In: **1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. Anais.** 2006. p.26- 30.

HERNANDEZ-CERUELOS, E. MADRIGAL-BUJAJIDAR, AND C. DE LA CRUZ, "Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow," **Toxicology Letters**, vol. 135, no. 1-2, pp. 103–110, 2002.

HOFFMANN A, NATOLI G, GHOSH G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. **Oncogene** 2006; 25:67-76.

KROPF P., FUENTES J. M., FAHRNICH E., ARPA L., HERATH S., WEBER V., SOLER G., CELADA A., MODOLELL M., MULLER I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. **FASEB J.** 19, 1000–1002 10.1096/fj.04-3416fje 2005.

LAINSON R, SHAW JJ. Taxonomy of the New World *Leishmania* species. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1972; 66(6):943-4.

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

LEÇA JÚNIOR N.F., GUEDES P.E., SANTANA L.N., ALMEIDA V.D., CARVALHO F.S., ALBUQUERQUE G.R., WENCESLAU A.A., MUNHOZ A.D., SILVA F.L. Epidemiology of canine leishmaniasis in southern Bahia, Brazil. **Acta Trop.** 2015 Apr 25;148:115-119

LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; SILVA, M. A.; LIMA, G. P. P. Invertases enzymes activity and sucrose accumulation in sugarcane (*Saccharumofficinarum* L.) under effect the potassium nitrate, ethephon andethyl-trinexapac. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 4, p. 649-656, 2011.

LIMA JUNIOR, J. A.; COSTA, G. ; REIS, A. ; BEZERRA, J. ; PATRÍCIO, F. J. ; SILVA, L. ; AMARAL, F. M. ; NASCIMENTO, F. R. F. Rev. Inibição da Infecção *in Vitro* de Macrófagos por *Leishmania amazonensis* por Extrato e Frações de *Chenopodium ambrosioides* **Ciênc. Saúde** v.16, n. 1, p. 46-53, jan-jun, 2014

LORENZI H., MATOS F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda**, 2002. 512p

LOPES, A.R.A., VARGAS M.L.S., CAVALCANTI A.S.S. & SILVA A.G. Plantas e seus extratos – administração e biodisponibilidade de fitoterápicos aplicados na pele. **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia do Centro**. 2006.

LYNN SOONG. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonenses* *Frontiers in Immunology* | **Microbial Immunology** . Universitário Vila Velha. *Natureza on line* 4(2): 62-66 .2006

MACHADO, P. R. L. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An bras. Dermatologia**. Rio de Janeiro. 79(6):647-664. nov./dez., 2004.

MAGALHÃES, A.S. et al. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1372-1377, 2009.

Margatto, M.R.; Amaral, A. C. F. ; Ferreira, J. L. P. ; Andrade-Silva, J. R. ; Taniwaki, N.N. ; Souza, C. S. F. ; d'Escoffier L. N. ; Almeida-Souza F.; Hardoim, D. J. ; Costa S. C. G. ; Kátia da Silva Calabrese. In vitro evaluation of (-)α-

bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**. Volume 148, January 2015, Pages 66–72.

MARTINS. E. A. C. Caracterização fisiológica e genética do transporte de arginina em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2011. **Tese de Doutorado** - Universidade de São Paulo (USP). Instituto de Biociências São Paulo

MATOS, M. E. O.; SOUSA, M. P.; MATOS, F. J. A.; AND CRAVEIRO, A. A. Sesquiterpenes from *Vanillosmopsis arborea*. **Journal of Natural Products** v. 51, p.780-782, 1988.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.& NOGUEIRA, P.E. Flora vascular do cerrado. Pp. 287- 556. In: M.S.& S.P. Almeida (Eds.) **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa- CPAC. Planaltina, DF. 1998.

MODABBER, F. Leishmaniasis. In: **Tropical Diseases** Research Progress 1991-1992. World Health Organization. Geneve, 77-87. 1993.

MORALES-YUSTE, MMORILLAS-MA´RQUEZ, .FMART´IN-SA´NCHEZ, . J. VALERO-LO´PEZ A., AND NAVARRO-MOLL, M. C. "Activity of (-) α - bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes," , vol. 17, no. 3-4, pp. 279–281, 2010.

MOREIRA, R.C.R.; REBÊLO, J.M.M.; GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L. Nível de conhecimento sobre *Leishmaniose Tegumentar Americana* (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pub.**, 18: 187-195, 2002.

MOSMANN T.R., COFFMAN R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**;7:145-73,1989.

MOTA, K.C.N.; ATHAYDE, A.A.R.; PAULA, A.C.C.F.F.; MEDEIROS, S.L.S. et al. Utilização das folhas do ora-pro-nóbis (*Pereskiaaculeata* Mil) na dieta de leitões de 7 a 28 dias de idade. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA. 2012, Cuiabá Mato Grosso. **Anais...** Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, 2012.

MURRAY, H. W., RUBIN, B. Y., CARRIERO, S. M., HARRIS, A. M., JAFFE, E. A. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanism: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 134, p. 1982-1988, 1985.

MURRAY, H. W., DELPH-ETIENNE, S. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanism in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 288-293, 2000.

OLEKHNOVITCH R.; RYFFEL B.; MÜLLER A. J.; BOUSSO P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 214, p. 1711-1722, 2014.

OSENI L. A. DAWDA S. ABAGALE A. S. NATURAL PRODUCTS IN ANTILEISHMANIAL DRUG DISCOVERY: A REVIEW. **Journal of Asian Scientific Research**, 3(2):157-173 157, 2013.

OZAKI, A. T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos Utilizados Na Medicina Veterinária em Cães e Gatos. **Infarma**, v. 18, nº 11/ 12, p. 17-25, 2006.

PAGE C, CURTIS M, SUTTER M, WALKER M, HOFFMAN B. **Farmacologia integrada. 2ª ed.** Barueri: Manole, 2004.

PAULO R. L. MACHADO M., ILMA. A. S., ARAÚJO L., EDGAR M. C. Mecanismos de resposta imune às infecções* Immune response mechanisms to infections* **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004.

PELISSARI, D. M. et al. Treatment of Visceral Leishmaniasis and American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n. 1, mar. 2011.

PINHEIRO R.O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v.16, nº 7-8. 2004.

PIRMEZ C, YAMAMURA M, UYEMURA K, PAES-OLIVEIRA M, CONCEIÇÃO-SILVA F, MODLIN RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest**; 91: 1390-1395,1993.

RASKIN, L. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v.20, n.12, p.522-31, 2002.

RATH S., TRIVELIN L. A., IMBRUNITO T. R., TOMAZELA D.M., JESÚS M. N., MARZAL P.C. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 4, 550-555, 2003

REGIA J., INERMIS L., OFFICINALIS S. Antileishmanial activity of some plants growing in Algeria: **Afr J Tradit Complement Altern Med**. 2013 Apr 12;10(3):427-30. eCollection 2013

RIDLEY,D.S.,1980.A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression.Trans.R. Soc. **Trop. Med.** Hyg., 74: 515-521.

ROBBERS, J.E.; SPEETIE, V.E. T. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. São Paulo: Ed. Premier. 371p, 1997.

Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa Filho JM 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 12: 514-535.

Sabina H, Tasneem S, Samreen Y, Kausar MI, Choudhary, Aliya R. Antileishmanial activity in the crude extract of various seaweed from the coast of Karachi, **Pakistan Pak. J Bot.** 2005;37(1):163–168.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55:453-483.

SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I.; COSTA FILHO, A. V. O uso da associação azitromicina e N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, p. 125-128, Apr. 2009 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962009000200004&lng=en&nrm=iso>. access on 29 May 2015.

SANTOS, N. K. A. Verificação das Propriedades Antibacteriana e Farmacológica do Óleo Essencial de *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker. **Dissertação (Mestrado em Bioprospeção)** - Programa de Pós-Graduação em Bioprospeção Molecular, Universidade Regional do Cariri, URCA. 2009.

SANTOS, H. R.; MARCO, C. A.; FEITOSA, A. G. S.; RODRIGUES, F. F. G.; ALCANTARA, F. D. de O.; TAVARES, R. C. N. Rendimento e qualidade do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker influenciado pelo diâmetro dos ramos. **Cadernos de Agroecologia**, v.6, p.1-5, 2011.

SAUVAIN, M., DEDET, J.P., KUNESCH, N., POISSON, J., 1994. Isolation of flavans from the amazonian shrub *Faramea guianensis*. **J. Nat. Prod.** 57, 403–406.

SEKI, L. M, PEREIRA, P. S. DE SOUZA, M. P. A. 1-1., CONCEIÇÃO, M. S.; MARQUES, E. A, PORTO, C. O COLNAGO, E M. L; ALVES, C. F. M.; GOMES, D, CARVALHO ASSEF, A. P. D. A: OTHERS AUTHORS. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil the predominance Of sequence type 437 _ **Diagnostic Microbiology and Infecioust Disease**, v.70, n. 2, p. 274-277, 2011.

SEN R., CHATTERJEE M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**. ;18:1056–169. [PubMed], 2011.

SERAKTA M, DJERROU Z, MANSOUR-DJAALAB H, KAHLOUCHE-RIACHI F, HAMIMED S, TRIFA W, BELKHIRI A, EDIKRA N, HAMDI PACHA Y.SEN R, CHATTERJEE M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis.**Phytomedicine**. 2011;18:1056–169.

SERAKTA M, DJERROU Z, MANSOUR-DJAALAB H, KAHLOUCHE-RIACHI F, HAMIMED S, TRIFA W, BELKHIRI A, EDIKRA N, HAMDI PACHA Y. Antileishmanial activity of some plants growing in Algeria: *Juglans regia*, *Lawsonia inermis* and *Salvia officinalis*. **Afr J Tradit Complement Altern Med**. 2013 Apr 12;10(3):427-30. eCollection 2013.

SILVA M.I.G, GONDIM A.P.S, NUNES I.F.S, SOUSA F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev Bras Farmacogn** 16: 455-462 Akerele, O.; Herbal Gram 1993, 28, 13. 2006

SILVEIRA F.T. Patogenia da leishmaniose tegumentar americana: caracterização clínica, histopatológica e imunopatológica de leishmaniose cutânea disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

SILVEIRA F.T., LAINSON R., CORBETT C.E.P.. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 99: 239-251, 2004.

SILVEIRA F. T., MÜLLER S. R., SOUZA A.A, LAINSON R., GOMES M.C., LAURENTI M. D., CORBETT C. E.P. Revisão Sobre a Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, Com Ênfase À Doença Causada Por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina V.22** 1 janeiro a março, 2008.

SINAN-Sistema de Informação de Agravos Notificáveis. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Consultado em 29/05/2015

SOONG L., HENARD C. A., MELBY P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin. Immunopathol.** (2012). 34, 735–751.10.1007/s00281-012-0350-8

SOUZA, B. M. P. S. et al. Comparação entre diferentes preparados protéicos de *Leishmania chagasi* como antígenos para ELISA indireto. **Rev. Bras. Saúde Prod.** An. V.5, n.1, p.31-40, 2004

SOUZA, N. C. de et al. Absence of Genotoxicity of a Phytotherapeutic Extract From *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in Somatic and Germ Cells of *Drosophila melanogaster*. **Wiley-Liss**, p. 293-299, aug./jan. 2003.

TAUFNER C.F., FERRAÇO E.B.; RIBEIRO L.F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. **Natureza online** 4(1): 30-39. 2006.

VAN DER AUWERA G., DUJARDIN J.C. Species Typing in Dermal Leishmaniasis. **Clin Microbiol. Rev.** (2): 265-94. Apr; 28, 2015 doi: 10.1128/CMR.00104-14.

VEIGA J.R. V.F, MACIEL M.A.M., PINTO A.C. 2005. Plantas medicinais: cura segura? **Quim Nova** 28: 519-528.

VILLEGAS, L. F., MARC, A. ,ALO, MARTIN, J. ET AL., "(+)-epi- α -bisbolol is the wound-healing principle of *Peperomia galioides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids," **Journal of Natural Products**, vol. 64, no. 10, pp. 1357–1359, 2001.

VINAY D. S., RYAN E. P., PAWELEC G., TALIB W. H., STAGG J., ELKORD E., et al. . (2015). Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. **Semin. Cancer Biol.** [Epub ahead of print]. 10.1016/j.semcancer.2015.03.004

WANG Y., CHEN Y., XIN L., BEVERLEY S. M., CARLSEN E. D., POPOV V., CHANG K. P., WANG M., SOONG L. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. 2011. **Infect. Immun.** 79, 1124–1133 10.1128/IAI.00658-10

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990. Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organization Tech. Rep. Ser.** 793, 1–158.

YUNES, R; PEDROSA, R.C; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.147-152, São Paulo, Fev. 2001.

