UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DANYELLE SANTOS COSSOLOSSO

ATIVIDADES LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS ENCONTRADAS NO NORDESTE BRASILEIRO

FORTALEZA-CE

2013

DANYELLE SANTOS COSSOLOSSO

ATIVIDADES LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS ENCONTRADAS NO NORDESTE BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.
Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.
Orientador(a): Profa. Dra. Selene Maia de Morais

FORTALEZA-CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho

Bibliotecário Responsável – Francisco Welton Silva Rios – CRB-3/919

C836a Cossolosso, Danyelle Santos

Atividades leishmanicida e antioxidante dos óleos essenciais de plantas encontradas no Nordeste brasileiro / Danyelle Santos Cossolosso . – 2013.

CD'ROM. 92 f. : il. (algumas color.) ; 4 ½ cm.

"CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)".

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof.ª Dr.ª Selene Maia de Morais.

1. *Leishmania*. 2. Antioxidante. 3. *Engenia uniflora*. 4. *Plectranthus amboinicus*. 5. *Crotons*. I. Título.

CDD: 547

DANYELLE SANTOS COSSOLOSSO

ATIVIDADES LEISHMANICIDA E ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS ENCONTRADAS NO NORDESTE BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 09/12/2013

BANCA EXAMINADORA

Selene Maia de Morais
Profª. Dra. Selene Maia de Morais
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Nadja Soares Vila Nova
Drª Nadja Soares Vila Nova
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Patrícia de Araújo Rodrigues
Dra. Patrícia de Araújo Rodrigues
Universidade Federal do Ceará
Examinadora

À melhor mãe do mundo e mais amada, Ana,
todas minhas conquistas são pra você!

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Deus e Jesus, por todas as bênçãos, conforto e amor que recebo a cada dia. Minha mãe e amiga Ana J. Tárrio dos Santos, meu amor incondicional é seu. Vinícius Cossolosso Rocha, meu filhinho amado que enche minha vida de alegrias e esperança. Minha irmã e amiga, Emanuelle H. S. Cossolosso, especial companheira, amiga e uma das minhas pilastras. Meu cunhado Augusto Andrade, por toda ajuda e apoio. Bruno de O. Rocha, meu doce esposo, alma gêmea, amigo, companheiro e exemplo de pai. Meu pai Jackson W. V. Cossolosso, que sempre está nos meus pensamentos e no coração, saudades eternas. Obrigada à minha família, pelo apoio incondicional, minha vida é voltada para vocês, são a razão da minha vida!

Meus amigos Priscila Vieira, Amanda Maia, Inayara Colares, Nadja Vila Nova e Adailson Silva, pela amizade que me faz tanto bem e pelos generosos gestos de carinho, ajuda e apoio, sem vocês talvez eu não tivesse chegado até aqui, obrigada!

Minha orientadora Selene Maia de Morais, pela grande oportunidade, generosidade e paciência, obrigada!

Um agradecimento especial à Marcondes Chaves Gomes, que com sua generosidade, permitiu que eu realizasse mais esse sonho.

Meus companheiros do Laboratório Químico de Produtos Naturais, Clécio, Joana, Larissa, Maria José, Vítor, Lívia, Lúcio, Pablito, e todos que fazem parte dessa equipe, vocês são um exemplo de generosidade! Adorei trabalhar com vocês!

Obrigada aos familiares e amigos que tanto amo, longe apenas na distância física.

Agradeço a Universidade Estadual Do Ceará e aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV.

Agradeço CAPES, AO CNPq, pela grande oportunidade em meu crescimento profissional, através do apoio financeiro.

RESUMO

O uso de produtos naturais nos tratamentos e controle de doenças como as leishmanioses são recomendadas pela Organização Mundial da Saúde. Tendo em vista a grande diversidade de plantas com atividades farmacológicas no Nordeste do Brasil, o objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade leishmanida e antioxidante dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Plectranthus amboinicus* e das espécies de *Crotons* sp. comumente encontrados no nordeste brasileiro, além de elucidar seus componentes químicos e suas toxicidades frente à *Artemias* sp. e macrófagos de linhagem AMJ2-C11. Para a identificação dos componentes dos óleos essenciais (OEs) estudados foi usado o método de cromatografia gasosa aliada à espectrofotometria em massa (CG- EM). A análise da capacidade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH. Para os testes *in vitro* contra as leishmanias, os OEs e a Anfotericina B como droga controle foram incubadas com as cepas de leishmanias por 24 h a 24°C e a viabilidade das células foi testada através do método MTT. Os testes de toxicidade foram realizados por meio de *Artemias* sp. e macrófagos AMJ2-C11. O principal componente encontrado nos OEs de *P. amboinicus* e *E. uniflora* foi o Timol. Os principais componentes encontrados nos OEs dos *Crotons* foram o óxido de cariofileno e espatulenol, com exceção do OE de *C. nepetaefolius*, em que foram encontrados principalmente o metil-eugenol e o E-cariofileno. Todos os OEs estudados apresentaram atividade leishmanicida, em especial o OE de *C. nepetaefolius*, que apresentou resultado semelhante à Anfotericina B frente à espécie *L. amazonensis*. O teste com DPPH mostrou atividade antioxidante em todos os óleos estudados. No teste contra *Artemias* sp., todos os OEs apresentaram bioatividade. No teste com macrófagos, todos os OEs apresentaram citotoxicidade semelhante à Anfotericina B, com exceção dos OEs de *C. argyrophylloides* e *C. sonderianus*, que apresentaram menores toxicidades em comparação com a droga controle. Desta forma, observa-se neste estudo o potencial efeito leishmanicida e antioxidante dos óleos em estudo, podendo estes servirem como futuros fitoterápicos no combate a doenças tropicais.

Palavras-chave**:** *Leishmania*. Antioxidante. *Eugenia uniflora*. *Plectranthus amboinicus. Crotons.*

ABSTRACT

The use of natural products in the treatment and control of diseases such as leishmaniasis are recommended by the World Health Organization. Considering the great diversity of plants with pharmacological activities in the Northeast of Brazil, the aim of this study was to evaluate the antioxidant activity and leishmanida. Essential oils from *Eugenia uniflora*, *Plectranthus amboinicus* and species *Crotons* sp. commonly found in northeastern of Brazil, besides elucidating its chemical components and their toxicities front *Artemias* sp. and macrophage lineage AMJ2-C11. To identify the components of essential oils (EOs) studied was used the method of gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). To identify the components of essential oils (EOs) studied was used the method of gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS). The analysis of antioxidant capacity was measured by the DPPH method. For the *in vitro* tests against *Leishmania*, the EOs and Amphotericin B as drug control were incubated with strains of *Leishmania* for 24 h at 24 ° C and the cell viability was tested by MTT method. The toxicity tests were performed by *Artemias sp*. and macrophages AMJ2-C11. The main component found in EOs of *P. amboinicus* and *E. uniflora* was thymol. The main components found in Eos of *Crotons* were caryophyllene oxide and spathulenol, except OE of *C. nepetaefolius*, which were mainly found in the methyl-eugenol and E-caryophyllene. All EOs studied showed leishmanicidal activity, especially OE *C. nepetaefolius*, which presented similar result to Amphotericin B against *L. amazonensis* species. The DPPH test showed antioxidant activity in all studied oils. In the test against *Artemias* sp., all EOs showed bioactivity. In the test with macrophages, all EOs showed cytotoxicity similar to amphotericin B, with the exception of the EOs of *C. argyrophylloides* and *C. sonderianus*, which presented lower toxicities compared to the control drug. Therefore, it is observed in the present study the potential leishmanicidal effect and antioxidant from oils studied, and these serve as phytotherapics future in combating tropical diseases.

Keywords: *Leishmania*. Antioxidant. *Eugenia uniflora*. *Plectranthus amboinicus, Crotons*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia de fêmea de díptero da espécie *Lutzomia longipalpis*, vetor da leishmaniose, durante o repasto sanguíneo..... 13

Figura 2 – Esquema do ciclo de vida da *Leishmania sp.* envolvendo hospedeiros vetebrados e invertebrados..... 15

Figura 3 – Fotografias de amastigotas e promastigotas de *Leishmania sp.*.....16

Figura 4 – Fotografia de cão com leishmaniose visceral em estágio avançado..... 17

Figura 5 – Fotografias de lesões tegumentares caninas. (a): lesão da mucosa no cão. (b): lesão úlcero-crostosa no cão. (c): lesão ulcerosa no cão..... 18

Figura 6 – Fotografias de: Lesão ulcerada de LCL, causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, com grande infiltração na borda da úlcera (a). Secção histológica da mesma lesão, com infiltração cutânea difusa de macrófagos contendo vacúolos abundantes de amastigotas e linfócitos ao redor e células plasmáticas (b). Lesão ulcerada de LCL, causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* , com fraca infiltração na fronteira da pele com a lesão (c). Secção da mesma lesão , com infiltração difusa de linfócitos e células plasmáticas na derme com macrófagos e parasitas escassos (d)..... 20

Figura 7 - Representação da estrutura molecular do Estibogluconato de sódio.....22

Figura 8 - Representação da estrutura molecular do Antimoniato de N-metilglucamina.....22

Figura 9 - Representação da estrutura molecular da Anfotericina B.....23

Figura 10 - Representação da estrutura molecular do Isotionato de pentamidina.....23

Figura 11 - Representação da estrutura molecular da Miltefosina.....23

Figura 12 - Fotografia da espécie *Plectranthus amboinicus*.....26

Figura 13 - Fotografia da espécie *Eugenia uniflora*.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO_2 – gás carbônico

CG- EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria em massa

DMSO - dimetilsulfóxido

DO – densidade óptica

DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

ELISA - ensaio imunoenzimático

EROS – espécies reativas de oxigênio

FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

IC_{50} – Concenttração inibitória capaz de matar 50% da população

IFN-g – Interferon gama

IV_{50} - Índice de Varredura

LC – Leishmaniose Cutânea

LC_{50} – concentração letal capaz de matar 50% da população

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

mg/mL – Miligramas por mililitros

mm – milímetros

MTT - (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-brometo de 2,5-difeniltetrazólio)

ng mL – nanograma à mililitros

OE – Óleo Essencial

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - reação da polimerase em cadeia

RIFI - reação de imunofluorescência indireta

µl – Microlitros

µm – Micrômetro

µg/mL – Microgramas por mililitro

°C – Graus Celsius

% - Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
2.1 Leishmaniose Visceral..... 14
2.2 Leishmaniose Tegumentar 14
2.3 Agente Etiológico 15
2.4 Vetores..... 16
2.5 Reservatórios.....17
2**.6 Ciclo do parasita.....18**
2.7 **Quadro clínico da Leishmaniose Visceral.....19**
2.8 Quadro clínico da Leishmaniose Tegumentar 21
2.9 Diagnóstico.....22
2.10 Tratamento.....24
2.11 Controle.....27
2.12 Uso de plantas em tratamentos alternativos.....28
2.12.1 Plectranthus amboinicus.....29
2.12.2 Eugenia uniflora.....30
2.12.3 Croton.....31
2.12.3.1 Croton argyrophylloides.....32
2.12.3.2 Croton jacobinensis.....33
2.12.3.3 Croton sonderianus.....33
2.12.3.4 Croton blanchetianus..... 34
2.12.3.5 Croton nepetaefolius.....34
2.12.3.6 Croton mucronifolius.....34
2.12.3.7 Croton sincorensis.....35
2.13 Capacidade Antioxidantes.....35
3 JUSTIFICATIVA.....36
4 HIPOTESE CIENTÍFICA..... 36
5 OBJETIVOS 36
5.1 Objetivo Geral 36
5.2 Objetivos Específicos 37
6 CAPITULO 1..... 38
7 CAPÍTULO 2.....56

8 CONCLUSÕES 79
9 PERSPECTIVAS 79
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por protozoários parasitas afetam aproximadamente 25% da população mundial, a maioria de países em desenvolvimento. Sendo uma doença de causa protozoária, a leishmaniose tem sido considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis doenças tropicais mais importantes (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; WHO, 2010).

A leishmaniose é uma doença grave causada por espécies de *Leishmania* e que apresenta distribuição geográfica generalizada. Pode ser classificada como dois principais tipos: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) ou Leishmaniose Cutânea (LC). Com uma incidência cada vez maior atinge cerca de dois milhões de casos por ano, sendo 500mil casos da forma visceral. Atualmente apresenta risco para 350 milhões de pessoas de 88 países (LUKES *et al.*, 2007).

No que diz respeito às formas clínicas, variam em Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e a Leishmaniose Visceral (LV), Estas formas clínicas irão depender de fatores como: espécie de *Leishmania*, interação genética entre parasita e hospedeiro, presença de co-infecções e estado imunológico do hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2005).

No Brasil ocorre em todo o território, tanto a LV como a LT, as quais são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste (RATH *et al.*, 2003).

As transformações no ambiente, provocadas pelo intenso processo migratório, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam na expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. No Brasil, a leishmaniose inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Este fenômeno leva a uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias. Sendo o nordeste brasileiro a região que apresenta o maior número de casos notificados de leishmanioses (BRASIL, 2006 a).

Diversas doenças originadas por protozoários têm tido a participação de plantas em seus tratamentos, incluindo testes contra diferentes espécies de *Leishmania* (VILA-NOVA *et al.*, 2011).

Atualmente, o tratamento e controle da leishmaniose em humanos e cães disponíveis vêm mostrando-se aquém das expectativas, o que vêm gerando grande interesse no ramo científico na busca de alternativas viáveis no combate da doença. Dessa forma, produtos naturais como plantas estão cada vez mais sendo estudadas para esta finalidade, uma vez que são capazes de produzirem compostos contra patógenos do meio ambiente (WHO, 2010; ROCHA *et al.*, 2005).

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e

prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial da Saúde divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde, devido à fácil obtenção e a grande tradição de seu uso (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005; WHO, 2010).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Entretanto, apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (BRASIL, 2006 b;GUERRA *et al.*, 2001).

Em 1991, a OMS sugeriu que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas e reforçou a importante contribuição da medicina tradicional na prestação de assistência social, especialmente às populações que têm pouco acesso aos sistemas de saúde (WHO, 2010).Em adição, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde (SUS), contempla áreas como Plantas Medicinais e Fitoterapia e promove a institucionalização destas práticas.

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (BRASIL, 2006 b).

Conseqüentemente, pesquisas científicas sobre plantas medicinais ainda são necessárias e justificam a necessidade de novas moléculas alvos para embasar futuras estratégias de tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é uma doença de grande relevância, não somente pela sua alta incidência e ampla distribuição, mas também pela possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes. Sendo esta forma clínica de leishmaniose considerada a mais grave (GONTIJO & MELO, 2004).

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica, que se caracteriza pelo seu efeito sobre os órgãos internos, em especial o fígado, os baço e medula óssea. É considerada fatal se não for tratada e é causada pelo complexo *Leishmania donovani*: *L. donovani* no leste da África, Índia e partes do Oriente Médio e *L. infantum chagasi* na Europa, Norte da África e Américas do Sul e Central, sendo este o agente etiológico da LV o mais difundido no mundo. É também conhecida por: calazar, barriga d'água, entre outras denominações menos conhecidas (CHAPPUIS *et al.,* 2007; LUKES *et al.,* 2007; BRASIL, 2006 a).

2.2. Leishmaniose Tegumentar

A forma Tegumentar é endêmica em mais de 70 países, com 90% dos casos ocorrendo no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (DESJEUX, 1999).

A doença é também conhecida como leishmaniose cutânea, onde 2 subgêneros estão envolvidos: *Leishmania* e *Viannia*. Dentro desses 2 subgêneros, estão reconhecidas 14 espécies atualmente (LAINSON & SHAW, 1998). Entretanto, as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* têm maior importância e o maioria dos casos são causados por *L. (V.) braziliensis*, produzindo o principal forma clínica da LT: leishmaniose cutânea localizada (LCL) (SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2004).

Nas Américas, a LT é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais 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 *Leishmanias* (BRASIL, 2007).

2.3. Agente etiológico

Estes parasitas possuem a seguinte posição sistemática (LEVINE *et al.*, 1980):

Reino	Protista
Sub-reino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Sub-filo	Mastigophora
Classe	Zoomastigophorea
Ordem	Kinetoplastida
Sub-ordem	Trypanosomatina
Família	Trypanosomatidae
Gênero	*Leishmania*

A maioria das espécies de *Leishmania* é patogênica para o homem e vertebrados inferiores (CHANG, CHAUDHURI & FONG, 1990).

Os agentes causadores de LV são membros do complexo *Leishmania donovani*. Essas espécies se distinguem por seus vetores, hospedeiros reservatórios e pela patologia. Seu genótipo está fortemente correlacionado com origem geográfica (LAINSON & SHAW, 1997; LUKES *et al.*, 2007).

Apesar das espécies de *Leishmania* serem morfologicamente indistinguíveis, têm sido identificadas por métodos moleculares. Estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram espécies como a *L. (Leishmania) chagasi* e a *L.(Leishmania) infantum* uma única espécie (LUKES *et al.*, 2007).

Outra teoria seria de que a *L. chagasi* teria sido colocada como sinônimo de *L. infantum*, provavelmente devido a uma recente introdução de *L. infantum* no Novo Mundo (MAURICIO, STOTHARD & MILES, 2000).

No Brasil, a LT pode ser causada por 6 espécies do parasita, entre elas a *L. (L.) amazonensis e a L. (V.) braziliensis* (SILVEIRA *et al.*, 1997).

No homem, a *L. (Leishmania) amazonensis é* responsável pela forma cutânea, mucocutânea e pela forma cutânea disseminada. Já a *L. (Viannia) braziliensis* é responsável pela forma cutânea e a mucocutânea (BASANO & CAMARGO, 2004).

A *L. (Leishmania) amazonensis* apresenta-se em países da América o Sul como Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa. No Brasil, sua distribuição acontece principalmente na bacia amazônica, em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará,

Rondônia e sudoeste do Maranhão), e também na Bahia, em Minas Gerais e em Goiás (BASANO & CAMARGO, 2004).

A *L. (Viannia) braziliensis* apresenta distribuição em todo o território nacional, além de vários países da América Central e do Sul, sendo provável que nem todas correspondam exatamente ao mesmo parasita, mas que exista um complexo de subespécies (BASANO & CAMARGO, 2004).

2.4. Vetores

Os vetores da LV são fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos, gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (SANTOS *et al.*, 1998).

De acordo com o país, Estado ou região, esses vetores podem apresentar vários nomes populares: mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado (REBÊLO, 1999).

Recentemente, as espécies *Lutzomyia longipalpis* (Fig. 1) e *L. cruzi* estão relacionadas com a transmissão da doença no Brasil, sendo a primeira espécie, considerada principal espécie transmissora da *L. i. chagasi* no Brasil . Apenas no Estado de Mato Grosso do Sul é que a espécie *L. cruzi* é considerada como vetora da doença(BRASIL, 2006 a).

Fig. 1. Fêmea de díptero da espécie *Lutzomyia longipalpis*,vetor da leishmaniose, durante o repasto sanguíneo. Fonte: http://www.mundoeducacao.com/biologia/doencas-causadas-por-protozoarios- 1.htm

Além disso, a transfusão de sangue, agulhas contaminadas e transplantes de órgãos também são considerados como veículos ocasionais de transmissão da doença (MURRAY *et al.*, 2005).

A *L. (L.) amazonensis t*em como principal vetor o *Lu. flaviscutellata*, um flebotomíneo de hábito noturno e pouco antropofílico, e *Lu.olmeca nociva* como vetor secundário no Amazonas e em Rondônia (BASANO & CAMARGO, 2004).

Existem poucas informações a respeito dos vetores da *L. (V.) braziliensis* no Brasil. Na Serra dos Carajás, no Pará, sabe-se que o flebótomo envolvido na transmissão da doença é o *Psychodopygus wellcomei* (antropofílico, com picadas diuturnas e de maior atividade nas estações de chuva), além de outras espécies que vêm se adaptando em áreas peridomésticas, e ainda, as de florestas primárias, *Lu. whitmani, Lu. migonei, Lu.pessoai, Lu. intermedia, Lu. Carrerai*, *Lu. wellcomei* (LAINSON, 1997).

2.5. Reservatórios

Tanto animais domésticos como selvagens já foram identificados como os principais reservatórios de parasitas *Leishmania* (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

As leishmanioses constituem zoonoses que envolvem animais silvestres, incluindo marsupiais, carnívoros e mesmo primatas e domésticos. O homem representa hospedeiro acidental e parece não ter um papel importante na manutenção dos parasitas na natureza (FURTADO, 1994).

Na leishmaniose, os cães são considerados os principais reservatórios domésticos do parasita, sendo considerados como fonte de infecção para os vetores (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; GONTIJO & MELO, 2004).

Até o momento, não foram verificadas predisposições racial, sexual ou etária relacionada com a infecção do animal (BRASIL, 2006 a).Entretanto, de acordo com estudos clínicos reportados em vários países na Europa e nas Américas há aparente predominância de raças de cães de grande porte, utilizadas com certa freqüência em atividades realizadas no ambiente externo, como caça ou guarda, estando esses animais naturalmente mais expostos aos vetores da infecção. (FRANÇA-SILVA *et al.*, 2003; RONDON et al., 2008).

O principal hospedeiro silvestre da *L. (L.) amazonensis* é o roedor *Proechimys sp.* (rato-soiá), além de outros roedores: *Oryzomys sp.*, *Neacomys sp.*, *Nectomys sp* e *Dasyprocta sp.;* os marsupiais *Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp*. e *Marmosa sp.*; e a raposa *Cerdocyon thous* (BASANO & CAMARGO, 2004).

Os hospedeiros domésticos conhecidos da ***L. (V.) braziliensis*** são os cavalos, cães, jumentos, homens e até gatos (BASANO & CAMARGO, 2004).

2.6. Ciclo do parasita

Os protozoários parasitas que compreendem o gênero *Leishmania*, possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Durante seu ciclo biológico (Fig. 2), parasitas do gênero *Leishmania* existem em duas formas distintas: um flagelado extracelular conhecido como promastigota (Fig. 3) e um intracelular denominado como amastigota (Fig. 3) (CHAPPUIS *et al.*, 2007). As formas promastigotas possuem um flagelo na região frontal, medem de 15 a 20 µm de comprimento são encontradas no intestino dos artrópodes vetores, e as formas amastigotas, possuem um flagelo rudimentar, medem cerca de 2,3 µm, são imóveis e se desenvolvem obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro mamífero (ARGÜELLO, 1995; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Estas formas de *Leishmania* também são diferenciadas bioquimicamente entre si (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Fig. 2. Ciclo de vida da *Leishmania* sp.envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados. Fonte: WHO (2010).

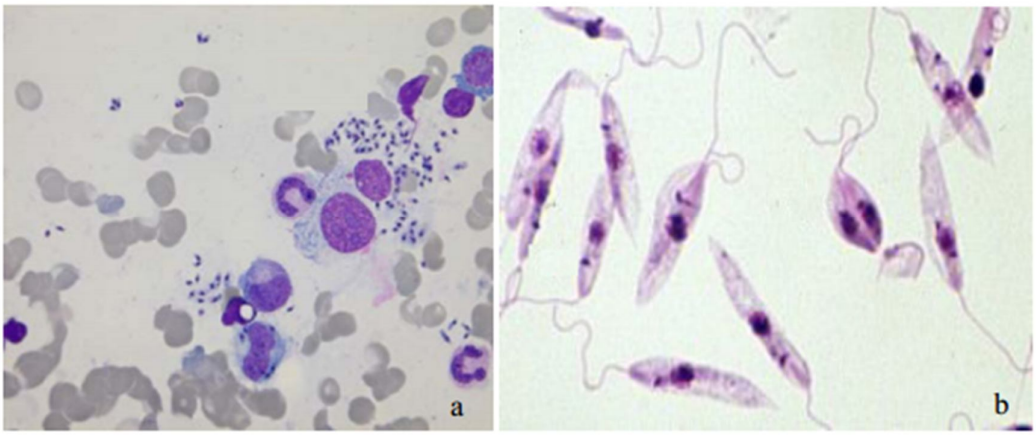

Fig. 3. (a) amastigotas e (b) promastigotas de *Leishmania sp*.
Fonte: Fonte: http://picsicio.us e https://www.msu.edu/course/zol

Somente as fêmeas de flebotomíneos possuem o aparelho bucal adaptado para picar a pele de vertebrados, transmitindo a doença que, através do repasto sanguíneo sugam junto com o sangue as formas amastigotas de um animal infectado, essas se alojam em partes de seu intestino levando-as a se transformar em promastigotas. No sistema digestivo de seus vetores, vivem no meio extracelular, se diferenciam em promastigotas e multiplicam-se por aparente divisão simples e assexuada e migram para a probóscide do inseto após aproximadamente 4 a 5 dias. Nesse período, bloqueiam o proventrículo, de onde podem ser inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado, junto com a saliva (MARZOCHI, 1992).

Em hospedeiros mamíferos, representados na natureza por várias ordens e espécies, os parasitas assumem a forma amastigota (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Os parasitas são internalizados pelas células dendríticas e macrófagos na derme e se transformam em amastigotas pela perda de seus flagelos. Eles sobrevivem por meio de uma complexa interação parasita-hospedeiro e se multiplicam por divisão assexuada até romperem a célula, disseminando-se pela via hematogênica e linfática, iniciando uma reação inflamatória e proporcionando a atração de outros monócitos e macrófagos no sistema retículo-endotelial, gerando um ciclo vicioso (CHAPPUIS *et al.*, 2007; LAINSON &SHAW, 1992; RASO, 1994).

A disseminação do parasita em cães susceptíveis ocorre após a infecção da pele, podendo ocasionar, em seguida, o desenvolvimento dos sintomas (BRASIL, 2006 a).

2.7. Quadro clínico da Leishmaniose Visceral

As características clínicas de cães infectados podem apresentar largas variações, desde um aparente estado sadio a um severo estágio final. Inicialmente, os parasitos estão presentes no local

da picada infectiva. Posteriormente, ocorre a infecção de vísceras e por vezes distribuem-se através da derme. A infecção ocasiona grandes áreas alopécicas extensamente parasitadas (BRASIL, 2006 a).

Em cães, a forma visceral apresenta afecções cutâneas, principalmente descamação e eczema, em particular no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras rasas, localizadas mais freqüentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações e pêlo opaco. Nas fases mais adiantadas da doença (Fig. 4), é comum o desenvolvimento de onicogrifose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarréia, hemorragia intestinal, epistaxe, insuficiência renal, edema de patas e vômito, além da hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorre em geral a paresia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem não apresentar sinais clínicos por um longo período de tempo (SOLANO-GALENO *et al.*, 2001).

Fig. 4. Cão com leishmaniose visceral em estágio avançado. Fonte: http://www.crmvrs.gov.br/Info338.htm.

O desenvolvimento da doença pode se apresentar de duas formas: aguda ou crônica, à depender de propriedades tanto do parasita como do hospedeiro. Em cães, a doença é comumente sistêmica e crônica. Entretanto, alguns cães chegam à apresentar cura espontânea ou estado de latência da doença. Dessa forma, a imunocompetência do animal vai determinar o aparecimento dos sintomas e o curso da doença (BARSIL, 2006 a).

De acordo com os sinais clínicos, a doença pode ser classificada como(BRASIL, 2006 a):

• Cães assintomáticos: ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por Leishmania.

• Cães oligossintomáticos: presença de poucos sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania* como adenopatia linfóide, pequena perda de peso e pêlo opaco.

• Cães sintomáticos: todos ou alguns sinais mais comuns da doença como as alterações cutâneas, onicogrifose, emagrecimento, ceratoconjuntivite e paresia dos membros posteriores.

A resposta imunológica do hospedeiro é provavelmente mediada pelos macrófagos ativados por citocinas de células T derivadas, tais como IFN-g, e é ela que determinará as manifestações clínicas apresentadas (MURRAY, 1988).

2.8. Quadro clínico da Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença polimórfica da pele e membranas mucosas com lesões ulcerativas únicas ou múltiplas ou lesões nodulares. Apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, variando de auto-cura na LCL para formas mais graves, como LMC e LCD (BALESTIERI *et al.*, 2002).

Entretanto, a depender da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imune mediada por células do hospedeiro infectado, após a infecção, estes podem mostrar-se assintomáticos (naturalmente resistentes) ou como sintomáticos (Fig. 5), apresentando-se com diferentes graus de susceptibilidade à infecção (LAINSON & SHAW , 1998).

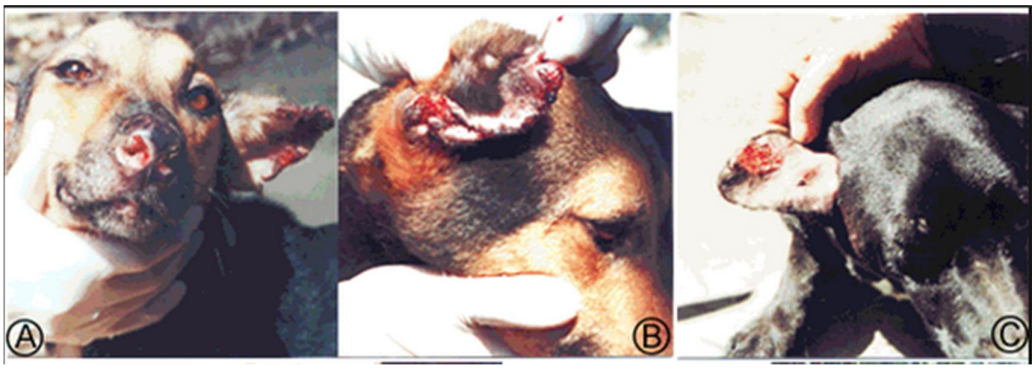

Fig. 5. Lesões tegumentares caninas. (a): lesão da mucosa no cão. (b): lesão ulcero-crostosa no cão. (c): lesão ulcerosa no cão.Fonte: MADEIRA *et al.* (2003).

Na forma localizada, após a infecção acontece um período de incubação variável de 10 dias a três meses. A orla da lesão nessa forma da doença, do ponto de vista histológico, pode ser bastante diferenciada, sugerindo o subgênero causador da doença. Em lesões por *L. (L.) amazonensis*, há uma infiltração densa de macrófagos vacuolados na orla da lesão, que estão cheios de amastigotas e dão aparência de um granuloma macrofágico (MORAES & SILVEIRA, 1994). Entretanto, na histopatologia dos casos da doença causados por *L. (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *viannia*, a infiltração na orla da lesão é mais modesta, e a presença de macrófagos e parasitas é geralmente escassa: ao contrário, linfócitos e células de plasma são mais freqüentes na infiltração, possuindo a aparência de um granuloma epitelióide (MAGALHÃES *et al.*, 1986).

A forma disseminada é uma rara manifestação clínica, caracterizada pelo aparecimento de várias lesões cutâneas nodulares não ulcerativas, de proliferação parasitária descontrolada, resistente às estratégias terapêuticas e apresenta ausência ou a redução da resposta imune celular contra o antígeno do parasita (BALESTIERI *et al.*, 2002). Além disso, é caracterizada clinicamente por uma infiltração difusa da pele, na qual aparece um grande número de nódulos, pápulas, tubérculos, e placas infiltradas que raramente se tornam ulceradas. Em casos mais antigos da doença, lesões disseminadas podem cobrir a maior parte do corpo, mas estão predominantemente nas extremidades (BARRAL *et al.*, 1995).

Em doentes com LMC, também denominada espúndia, a *L. (V.) braziliensis* pode ser encontrado no tecido da mucosa de e não apresentar nenhuma lesão cutânea aparente, enquanto que a *L. (L.) amazonensis* na mucosa está sempre associada a lesões cutâneas. Isto sugere que ao contrário de *L. (V.) braziliensis*, que difunde através do sangue, *L. (L.) amazonensis* utiliza um mecanismo de difusão contígua a partir da pele para o tecido da mucosa (SILVEIRA, LAINSON & CORBET, 2004). Esta forma de LT é condição de difícil tratamento e prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura e sua principal seqüela é a necrose do tecido da mucosa da região nasofaríngea e das estruturas cartilaginosas e está associada com uma forte resposta imune das células T (MAGALHÃES *et al.*, 1986; MARSDEN *et al.*, 1986).

2.9. Diagnóstico

A dificuldade do diagnóstico clínico da LV em cães dá-se devido a existência de grande porcentagem de animais assintomáticos ou oligossintomáticos (QUINNELL & COURTENAY, 2009).

O diagnóstico laboratorial da LVC pode ser baseado em exames parasitológicos ou sorológicos e a triagem dos exames a serem realizados devem se basear na provável área de transmissão, no método utilizado, suas limitações e sua interpretação clínica. Entretanto, fatores como: alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível, têm provocado grande dificuldade ao serviço público de saúde nessa questão (BARSIL, 2006 a).

Dos métodos laboratoriais para LV utilizados para diagnóstico da doença, o exame parasitológico é um dos mais seguros, pois se fundamenta na demonstração do parasita na forma de amastigota em material biológico de punções hepática, linfonodos, esplênica, de medula óssea e biópsia ou escarificação de pele. Apresenta especificidade de aproximadamente 100% e a sensibilidade irá depender do grau de parasitemia do hospedeiro, tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda

para cães assintomáticos. Entretanto, alguns desses procedimentos são métodos invasivos, acarretando riscos para o animal e tornando-se impraticáveis em programas de saúde pública, quando grande número de animais devam ser avaliados em curto espaço de tempo (COPPOLA, ERCOLINI & POSTIGLIONE, 1994).

Quanto aos métodos laboratoriais sorológicos para LV existentes como: fixação do complemento, aglutinação direta, ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), apenas os dois últimos, que expressam os níveis de anticorpos circulantes, estão disponíveis para inquérito em saúde pública. Em geral, parece não serem bons indicadores, devido à elevada incidência animais infectados, especialmente os assintomáticos, muitas vezes permanecem soronegativos ou limítrofe positivos (LACHAUD *et al.*, 2002).

O diagnóstico laboratorial da LT é fundamentado principalmente na pesquisa de parasitas em esfregaço das lesões após a coloração de Giemsa. Utilizando-se a escarificação do bordo da lesão como material de coleta, biópsia do bordo com impressão por aposição em lâmina de vidro e/ou punção aspirativa da lesão (Fig. 6) (SINGH & SIVAKUMAR, 2003).

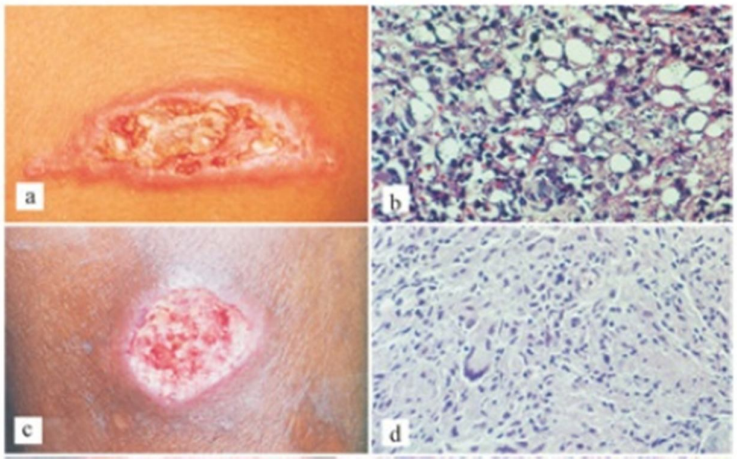

Fig. 6. (a)Lesão ulcerada de LCL, causada por *Leishmania (L.) amazonensis*, com grande infiltração na borda da úlcera.(b) Secção histológica da mesma lesão, com infiltração cutânea difusa de macrófagos contendo vacúolos abundantes de amastigotas e linfócitos ao redor e células plasmáticas.(c) Lesão ulcerada de LCL, causada por *Leishmania (V.) braziliensis* , com fraca infiltração na fronteira da pele com a lesão. (d) Secção da mesma lesão, com infiltração difusa de linfócitos e células plasmáticas na derme com macrófagos e parasitas escassos. Fonte: SILVEIRA, LAINSON & CORBETT (2004).

A mensuração da resposta imune celular, em humanos, no diagnóstico de forma indireta, pode ser realizada através da intradermorreação de Montenegro (injeção intradérmica de antígenos do parasita), devendo ser medida em 48 a 72 horas, onde as reações consideradas positivas mantém área de enduração maior que 5mm (SINGH & SIVAKUMAR, 2003). Entretanto, na LCD, esse teste apresenta resultado falso negativo, indicando que, nestes pacientes, os mecanismos de imunidade mediada por células são incapazes de controlar especificamente a *Leishmania* (SILVEIRA, LAINSON E CORBETT, 2004).

Na prática, a conduta mais utilizada é a pesquisa direta de parasitas e a intradermorreação, aliadas ao aspecto clínico da lesão e ao antecedente epidemiológico (BASANO & CAMARGO, 2004).

Também podem ser realizados para o diagnóstico de LT, os exames: histopatológico (coloração pela hematoxilina-eosina e uso de anticorpos marcados com imunoperoxidase para detecção do parasita), cultivo *in vitro* (meio NNN bifásico), *in vivo* (hamster dourado) (SINGH & SIVAKUMAR, 2003; BASANO & CAMARGO, 2004).

Quanto aos métodos laboratoriais sorológicos para LT existentes, a imunofluorescência, ELISA, aglutinação direta e PCR (reação da polimerase em cadeia) apresentam resultados em geral satisfatórios, entretanto na prática diagnóstica de áreas endêmicas, tornam-se inviáveis (SINGH & SIVAKUMAR, 2003).

2.10. Tratamento

O tratamento das leishmanioses ainda constitui um desafio para a ciência, estimulando diversos grupos de pesquisa nesta área de estudo (VOULDOUKIS *et al.*, 2006).

As drogas tradicionalmente empregadas como antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol vêm apresentando várias desvantagens, não têm apresentado boa eficácia e os mecanismos de ação das drogas leishmanicidas ainda são pouco compreendidos. Além disso, sabe-se que o uso rotineiro em cães acabam reprimindo temporariamente os sinais clínicos, há riscos de recidivas, oferecem efeitos limitados na infectividade de flebotomíneos e podem provocar grande resistência dos parasitos às drogas utilizadas para o tratamento humano (BARSIL, 2006 a).

Como outras doenças negligenciadas, recursos escassos estão disponíveis para combater esta doença, bem como o número e a eficácia de fármacos atualmente utilizados para o seu tratamento são limitadas (CROFT, SEIFERT & YARDLEY, 2006).

O tratamento das leishmanioses de primeira escolha é realizado à base de antimoniais pentavalentes, como estibogluconato de sódio (Pentostam ®) (Fig. 7) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Fig. 8). Entretanto, as desvantagens para o paciente são muitas: toxicidade, custo elevado, difícil administração, eficácia parcial e podem causar resistência ao parasito (RATH *et al.*, 2003; VOULDOUKIS *et al.*, 2006).

Um dos possíveis mecanismos de ação do Glucantime poderia ser a inativação de uma metal protease dependente de zinco, enzima presente apenas sob a forma de amastigota, essencial para o desenvolvimento de Leishmania (RATH *et al.*, 2003).

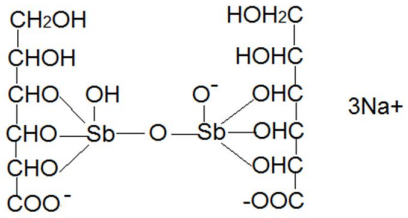

Fig. 7.Representação da estrutura molecular do Estibogluconato de sódio

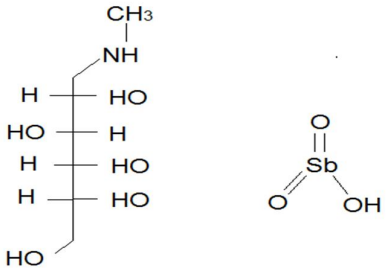

Fig. 8. Representação da estrutura molecular do Antimoniato de N-metilglucamina

Outras drogas como anfotericina B (Fig. 9) e pentamidina (Fig. 10) estão disponíveis para tratamentos de leishmaniose, porém, estas também apresentam as mesmas desvantagens e diversos efeitos secundários adversos, tais como a toxicidade renal, a supressão da medula óssea além de distúrbios no metabolismo da glicose (CROFT *et al.*, 2003; CHAN BACAB *et al.*, 2007).

A Miltefosina (Fig. 11), inicialmente desenvolvida como um droga usada no tratamento do câncer, é a última droga leishmanicida para entrar no mercado e a primeira que permite um tratamento oral de VL (CROFT & COOMBS, 2003), porém cepas resistentes de *Leishmania donovani* já foram isoladas, além de grande preocupação sobre seu potencial teratogênico e o tempo de meia-vida da droga, que pode estimular o surgimento de resistência (BRYCESON, 2001).

Sabe-se que o mecanismo de ação desta droga, em células tumorais, induz a apoptose de sinalização celular que altera as vias mediadas por lipídeos (ARTHUR & BITTIMAN, 1998).

A terapia dos pacientes com LMC pode apresentar resultados satisfatórios, principalmente em caso de curta evolução, quando o tecido mucoso ainda não foi comprometido em extensão. Entretanto, pesquisas demonstram que mesmo com o tratamento adequado, a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento mucoso na LT é freqüente, sendo de 2% nos casos tratados e ao redor de 10% nos casos não tratados (MARSDEN, 1986).

A LCD apresenta uma falha freqüente em responder ao convencional tratamento antimonial (LAINSON & SHAW, 1998)

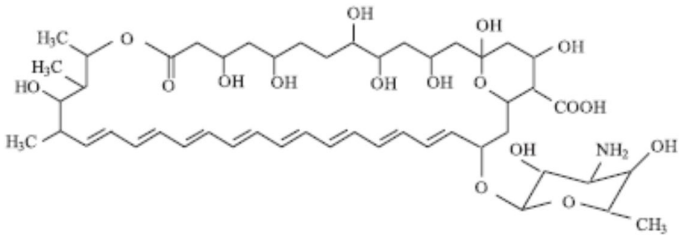

Fig. 9. Representação da estrutura molecular da Anfotericina B

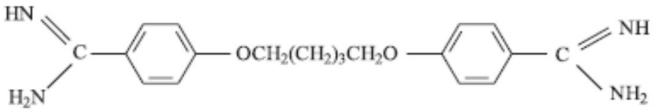

Fig. 10. Representação da estrutura molecular do Isotionato de pentamidina

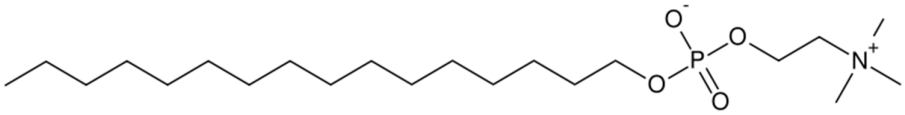

Fig. 11. Representação da estrutura molecular da Miltefosina.

Uma vacina desenvolvida a partir de culturas de formas promastigotas de leishmanias foi desenvolvida visando à profilaxia e tratamento da LT. Em alguns países é usada só ou associada aos antimoniais. A partir daí, alguns estudos envolvendo o tratamento de pessoas com a doença sugerem que a administração da vacina associada ao medicamento padrão não obteve melhores resultados de cura que tratamentos realizados apenas com o medicamento padrão, porém, o tempo de cura foi reduzido em média em 28,73% (MAYRINK *et al.,* 2006).

Um estudo foi realizado objetivando avaliar a eficácia de um tratamento termoterápico, em que eram realizadas aplicações de calor de 50°, durante 30 segundos, no centro e bordas das lesões assim com na região periférica e o número de aplicações dependiam do tamanho da lesão. Foi

demonstrado que este tratamento teve eficácia de 78%, menor que o do grupo controle (tratamento convencional com antimoniais), porém, como efeitos colaterais, apenas dor no local até quatro dias depois da aplicação do calor (LÓPEZ *et al.,* 2012).

Muitas são as pesquisas de substâncias que sejam capazes de oferecer uma alternativa viável para o tratamento contra leishmanioses. Entretanto, nos últimos anos, raras são as substâncias que apresentaram viabilidade no tratamento da leishmaniose visceral.

O emprego de medidas terapêuticas teria como finalidade a recuperação dos cães infectados e isto acarretaria o controle profilático da infecção humana. Entretanto, apesar de todas as tentativas de tratamentos com drogas comercialmente utilizadas com eficácia em humanos, a terapêutica em cães não têm obtido êxito (ALENCAR, 1959; BRASIL, 2006 a). O insucesso da antimonioterapia em cães poderia ser explicado em parte por uma alta excreção renal do antimônio, por um diferente metabolismo desta droga no fígado ou também por uma resposta imune não usual nos animais infectados (MARZOCHI *et al.,* 1985). O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e leva ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (ALVES & BEVILACQUA, 2004).

Considerando as dificuldades de tratamento, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos (BEZERRA *et al.,* 2006).

2.11. Controle

Os cães têm sido considerados como importantes reservatórios no ciclo doméstico da leishmaniose desde 1908, quando relataram pela primeira vez na Tunísia a presença de formas amastigotas em canídeos domésticos e no Brasil quando observaram intenso parasitismo cutâneo em cães e raposas do Ceará (SILVA *et al.,* 2005).

O Programa Saúde da Família, através do apoio no controle das leishmanioses, sugere a redução do contato vetorial através de inseticidas de uso residual (onde houver a notificação de casos em menores de 10 anos), do uso de medidas de proteção individual como mosquiteiros, telas finas nas janelas e portas, repelentes e roupas que protejam as áreas expostas, e de distanciamento mínimo de 200 a 300 metros das moradias em relação à mata. Outra estratégia de controle seria a abordagem dos focos de transmissão peridomiciliar, implementando as condições de saneamento para evitar o acúmulo de lixo e de detritos que possam atrair roedores e pequenos mamíferos, somadas as melhorias das condições habitacionais (BRASIL, 2007).

A Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) adota a eliminação de animais quando são soropositivos como medida de controle em áreas endêmicas. Entretanto, essa estratégia de controle tem apresentado resultados controversos (PAULA *et al*., 2003).

Um aspecto importante, que provavelmente está associado com o insucesso do controle da LVA, refere-se aos critérios usados para a seleção dos cães a serem eliminados, que se baseia no diagnóstico por técnicas sorológicas (RIFI e ELISA) que apresentam baixas sensibilidade e especificidade, acarretando taxas de infecções subestimadas e conseqüentemente permitindo a manutenção de animais infectados nas áreas endêmicas (PAULA *et al.*, 2003).

No Brasil, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral recomenda o diagnóstico precoce e o tratamento de casos humanos, controle do vetor e na detecção e eutanásia de cães soropositivos (Brasil, 2006). Entretanto, as medidas de controle da doença até agora implementadas foram incapazes de eliminar a transmissão e impedir a ocorrência de novas epidemias (GONTIJO & MELO, 2004).

Alguns autores têm demonstrado que a remoção de cães soropositivos é um método insuficiente para erradicar leishmaniose canina (SOLANO-GALLEGO *et al*., 2001).

2.12. Uso de plantas em tratamentos alternativos

Muitas sociedades tradicionais e autóctones possuem uma vasta farmacopéia natural, em boa parte proveniente dos recursos vegetais encontrados nos ambientes naturais ocupados por estas populações, ou cultivados em ambientes antropicamente alterados. Muitas vezes, o uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades tem sido o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (AMOROZO, 2002; MACIEL, PINTO & VEIGA JR., 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a humanidade tem nas espécies vegetais a melhor e maior fonte de fármacos disponíveis. No mercado farmacêutico, 25% dos medicamentos possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido usados como matéria-prima de drogas semi-sintéticas (BERGMANN *et al.*, 1997).

Em óleos essenciais, misturas de substâncias naturais voláteis provenientes do metabolismo secundário das plantas, compostos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos) (BAKKALI *et al.*, 2008), propriedades antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, antiespasmódica e relaxante já foram descritas em animais e homens (ALVIANO & ALVIANO, 2009) e suas preparações têm sido usadas em farmacologia, microbiologia médica, fitopatologia e conservação de alimentos (BAKKALI *et al.*, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o uso de plantas no tratamento de leishmanioses tem sido considerado como essencial e de alta prioridade pelo Programa de Doenças Tropicais. Sua utilização popular, tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas tem sido ratificada por diversos estudos etnobotânicos. Em contrapartida, embora esta área seja bastante explorada por pesquisadores, ainda existem muitas espécies vegetais com potencial atividade leishmanicida a serem avaliadas (BEZERRA *et al.*, 2006).

2.12.1. Plectranthus amboinicus

Fig. 12. Fotografia da espécie *Plectranthus amboinicus.* Fonte: arquivo pessoal.

A espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Syn. *Coleus amboinicus*, *Coleus aromaticus*, *Plectranthus aromaticus*) (Fig. 12) pertence à família Lamiaceae e gênero *Plectranthus*, que contém cerca de 300 espécies, sendo encontrados na África tropical, Ásia e Austrália (LUKHOBA *et al.*, 2006). Também é conhecida como alfavaca-grossa, orégano, hortelã da folha grossa e malvarisco (FRANÇA, LAGO & MARSDEN, 1996; LUKHOBA *et al.*, 2006).

Popularmente, esta planta tem sido utilizada na preparação de xaropes caseiros para tratamento de diversas afecções como: tosse, dor de garganta e bronquite. Além disso, é utilizada no tratamento de feridas causadas por leishmaniose tegumentar. O sumo das folhas é usado no tratamento de problemas ovarianos e uterinos, inclusive nos casos de cervicite (FRAXE, PEREIRA & WITKOSKI, 2007).

No ramo científico, já foi demonstrado a efetividade do extrato de *Plectranthus amboinicus* sobre os microrganismos patogênicos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, que ocasionam a síntese de micotoxinas em grãos de amendoim e café (CRUZ *et al.*, 2009). Sua atividade antifúngica também já foi demonstrada em outro estudo por Murthy *et al*. (2009).

O óleo essencial de *P. amboinicus* apresentou forte atividade larvicida contra um mosquito vetor da malária, *Anopheles stephensi* (SENTHILKUMAR & VENKATESALU, 2010).

Além disso, estudos farmacológicos já sugeriram efeitos antimicrobiano (ALVES, 2000), antiepiléptico (SALMAN *et al.*, 1996), antiinflamatória, antitumoral (GURGEL *et al.*, 2009) e leishmanicida (FRANÇA, LAGO & MARSDEN, 1996).

2.12.2. Eugenia uniflora

Fig. 13. Fotografia da espécie *Eugenia uniflora*. Fonte: arquivo pessoal.

A *Eugenia uniflora L.* (Fig. 13) pertence a família Myrtaceae, composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies de arbustos e arvores verdes durante todo o ano e cujas folhas opostas, com nervuras marginais são freqüentes nesta família (AURICCHIO & BACCHI, 2003). É uma árvore frutífera e está amplamente distribuída nos países sul-americanos, principalmente no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (CONSOLINI & SARUBBIO, 2002).

A *Eugenia uniflora* L. é conhecida popularmente como pitangueira ou cerejeira brasileira. Na medicina popular brasileira, é bastante utilizada em infusões ou decocção para tratamentos de inflamações, dores reumáticas e febre, também é utilizada como hipoglicemiante, diurético, antidiabético, antidiarréico, antihelmíntica e preventivo de problemas de estômago (AURICCHIO & BACCHI, 2003; LORENZI & MATOS, 2002).

Extratos de folha de pitanga tem sido a base para verificação de ação antiinflamatória (SCHAPOVAL *et al.*, 1994). Alguns compostos do extrato de folha de pitanga têm sido mencionados como eficiente na ação inibitória para o vírus Epstein-Barr que se sabe estar intimamente associado a carcinoma nasofaríngeo (LEE *et al.*, 2000),além de atividade antimicrobiana (ABADEJO *et al.*, 1989).

O óleo essencial demonstrou ter atividade bactericida (OGUMWANDE *et al.*, 2005).

Um estudo fitoquímico sobre amostra de *Eugenia uniflora* observou a presença de flavonóides e taninos (AURICCHIO *et al.*, 2007). A atividade antimicrobiana do óleo essencial das

folhas e frutos de *E. uniflora***,** colhidos em diferentes estágios de maturação foi avaliada para *Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes* e verificou-se que a ação antimicrobiana foi variada para amostras colhidas em diferentes períodos do dia e em épocas distintas do ano, indicando uma variação na composição do óleo das diferentes amostras (ABADEJO *et al.,* 1989).

2.12.3. Croton

Muitas espécies da família *Euphorbiaceae* são bem conhecidas em diferentes partes do mundo, como substâncias tóxicas e/ou medicinais. *Croton* é um grande gênero de *Euphorbiaceae*, que inclui cerca de 1.300 espécies de árvores, arbustos e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (MONTE *et al.*,1984).

Espécies de *Croton* são popularmente conhecido como "marmeleiro" ou "velame" e muitos são utilizados como medicamentos para o tratamento de hipertensão, úlceras e como antiinflamatórios (PONTES *et al.,* 2011).

Entre as espécies nativas com potencial inseticida reconhecido, as do gênero *Croton* são excelentes. Espécies deste gênero são comuns em diversos biomas do estado do Ceará e no Nordeste do Brasil (PONTES *et al.,* 2011; SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007).

Este gênero é bastante utilizado na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades como: câncer, prisão de ventre, diabetes, problemas digestivos, disenteria, feridas externas, febre, hipercolesterolemia, hipertensão, inflamação, vermes intestinais, malária, dor, úlceras e perda de peso (SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007).

Estudos mostram que algumas espécies de *Croton* também apresentam potencial para serem utilizados no controle de ácaros (PONTES *et al.,* 2011). Além disso, a elevada atividade antifúngica e baixa toxicidade de óleos essenciais de espécies de *Croton* constituem fontes promissoras para novos agentes fitoterápicos no tratamento de dermatofitose (FONTENELLE *et al.,* 2008).

O óleo volátil rico em linalol das folhas de *C. cajucara* mostrou ser um potente agente contra a *Leishmania amazonensis.* A DL_{50} para promastigotas é de 8,3 ng/mL e amastigotas, 8,7 ng/ mL e não apresentou nenhuma citotoxicidade contra células de mamíferos (ROSA *et al.,* 2003).

Um estudo realizado com o óleo essencial de *C. zehntneri* verificou que este era capaz de influenciar na capacidade antibiótica da norfloxacina, sugerindo, que o óleo pode ser utilizado como adjuvante na terapia antibiótica de agentes patogênicos resistentes a múltiplas drogas (COUTINHO *et al.,* 2010). Outro estudo evidenciou uma alta atividade antihelmíntica desse óleo essencial contra nematódeos gastrointestinais de ratos (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.,* 2007).

Foi demonstrada atividade biológica significativa de terpenóides de uma espécie de *Croton* (*C. cajucara*) apresentando capacidade antiinflamatória, antinociceptiva, hipoglicêmica, antiulceral, antiespasmódica, antitumoral e antiestrogênica (MACIEL *et al.*, 2000).

A alta diversidade dos efeitos descritos é um reflexo da diversidade química elevada deste grupo de plantas (MONTE *et al.*, 1984) e o uso popular diversificado desse gênero pode ser explicado pela presença de diversos componentes com atividades biológicas (BLOCK *et al.*, 2004).

Os constituintes de metabólitos secundários predominantes do gênero são os terpenóides, principalmente diterpenos, que podem pertencer à cembranóides, clerodano, neoclerodane, halimane, isopimarane, kaurane, secokaurane, labdano, forbol e traquilobânico. Frequentemente são relatados triterpenóides em espécies de *Croton*, seja pentacíclico ou esteróides. Também já foram encontrados óleos voláteis contendo mono e sesquiterpenoides, e às vezes, compostos derivados de shiquimato. Substâncias fenólicas têm sido relatadas, predominantemente flavonóides, proantocianidinas e lignóides. Além disso, do ponto de vista medicinal, várias espécies de Crotons detém grande importância por ser consideradas fontes das diferentes classes de alcalóides (SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007).

.

2.12.3.1 Croton argyrophylloides

Croton argyrophylloides Muell. Arg. é um pequeno arbusto muito comum no interior das regiões semi-áridas (MONTE *et al.*, 1984). Apresenta distribuição na porção norte da América do Sul (Bolívia, Colômbia, Paraguai e Venezuela) e no Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Roraima, Rondônia e Sergipe) (SILVA *et al.*, 2010).

Esta planta tem sido usada na medicina popular para tratamento de diabetes, inflamação, doenças venéreas, dor nas costas, intoxicação e dores de cabeça (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

Em uma pesquisa, a atividade antifúngica de óleos essenciais foi avaliada contra espécies de fungos e demonstrou que o *C. argyrophylloides* possui elevada capacidade fungicida contra *Microsporum canis*, além de apresentar baixa toxicidade, revelando serem fontes promissoras de novos agentes fitoterápicos no tratamento contra dermatofitoses (FONTENELE *et al.*, 2008).

Várias atividades farmacológicas para o óleo essencial de *C. argyrophylloides* já foram relatadas, incluindo sua capacidade antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006).

Estudo realizado com *C. argyrophylloides*, demonstrou que seu óleo essencial apresenta atividade larvicida (RAHUMAN *et al.*, 2007). Outro estudo, demonstrou um efeito anti-espasmódico de diterpeno do tipo kaurene isolado da planta (AGUIAR *et al.*, 2012).

2.12.3.2. Croton jacobinensis

Esta espécie de *Croton* está restrita ao semi-árido brasileiro, ocorrendo na Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte habitando áreas de caatinga, mata estacional e cerrado. É conhecida popularmente como velame roxo e velame preto (SILVA *et al.*, 2010).

O *C. jacobinensis*, foi estudado na forma de extrato etanólico sobre o ácaro rajado, importante praga agrícola e verificou-se uma atividade repelente, sugerindo a existência de substâncias bioativas (PONTES *et al.,* 2011). Além disso, outros estudos realizados com componentes voláteis de óleos essenciais de caules e folhas de espécies de *Croton*, demonstraram uma importante atividade acaricida do *C. jacobinensis* contra *Tetranychus urticae*. Estes componentes voláteis do óleo da folha e caule foram (Z)-alfa-atlantone (24,3 + / - 0,4%) e trans-isolongifolanone (22,8 + / - 0,5%), respectivamente (NEVES & CAMARA, 2011).

2.12.3.3. Croton sonderianus

As folhas de *Croton sonderianus*, vulgarmente conhecido como marmeleiro preto, são amplamente utilizados na medicina popular Ceará para o tratamento de uma ampla gama de condições clínicas (MATOS, 1999). Esta planta é rica em diterpenos do tipo clerodânicos e cleistantânicos com diversificada atividade biológica (McCHESNEY *et al.,* 1991).

Os óleos essenciais de *C. sonderianus, C. argyrophylloides* e *Lippia sidoides* demonstraram possuir capacidade inseticida contra o mosquito *Aedes aegypti*. Esses óleos mostraram resultados positivos na inibição de eclosão de ovos, atividade larvicida e ação pupicidal. Os resultados indicam que estes óleos são fontes promissoras de compostos bioativos, mostrando pouca ou nenhuma toxicidade para mamíferos (DE LIMA *et al.,* 2013).

Em estudo realizado com óleo de *C. sonderianus*, foi verificado que seu componente óxido de etileno apresentou atividade miorrelaxante em tiras de músculo liso traqueal de ratos, sugerindo sua potencial utilização terapêutica no tratamento de broncoespasmo (PINHO-DA-SILVA *et al.*, 2010).

Foi demonstrado atividade antinoceptiva do óleo essencial de *C. sonderianus* contra nocicepção química induzida em ratos por via intraperitoneal de ácido acético, sub-plantar de capsaicina e de formalina (SANTOS *et al.,* 2005).

2.12.3.4. *Croton blanchetianus*

Esta espécie de *Croton* é restrita ao semi-árido brasileiro, ocorrendo tanto em vegetação de caatinga quanto de carrasco, distribuindo-se nas regiões Nordeste e Sudeste (SILVA *et al.,* 2010).

Esta planta é bastante utilizada como agente antiinflamatório nas afecções de útero e de pele na medicina popular brasileira, especialmente na comunidade de Carão (Altinho-PE-Brasil) (FERREIRA JÚNIOR, LADIO & ALBUQUERQUE, 2011).

2.12.3.5. Croton nepetaefolius

O *Croton nepetaefolius* aff. Bail é um pequeno arbusto da família Euphorbiaceae, que mede entre 4 a 6 metros e é comumente encontrada no Nordeste brasileiro, ocorrendo em ambientes abertos e secos da caatinga e cerrados. É popularmente conhecida como marmeleiro sabiá, malva-preta ou canelinha-de-areia (CRAVEIRO *et al.,* 1980; SILVA *et al.,* 2010) ou marmeleiro vermelho (SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007).

No Brasil, é usado como digestivo, para o tratamento de cólicas intestinais (MOURA *et al.,* 1990) como antiespasmódico e para aliviar a flatulência e aumentar apetite (LAHLOU *et al.,* 2000).

A atividade inseticida do óleo essencial de *C. nepetaefolius*, contra o mosquito *Aedes aegypti* foi avaliada em estudo onde se verificou que o mesmo foi capaz de inibir a eclosão de ovos, apresentou efeito larvicida e pupicida, e inibiu a postura de mosquito fêmea grávida, além de ter mostrado pouca toxicidade oral aguda em ratos (LIMA *et al.,* 2013).

2.12.3.6. Croton mucronifolius

Esta espécie de *Croton* cresce em ambiente sombreado e úmido. Assim como outras várias espécies do gênero, pode é conhecida como velaminho ou velame de cheiro, tendo como propriedade comum seu forte odor aromático (MORAES, MATOS & BRAZ-FILHO, 1988).

Componentes ativos como cineol, p-cimeno e ascaridol foram relatados em estudos anteriores com partes aéreas desta planta (CRAVEIRO *et al.,* 1981), assim como flavonóides polihidroxilados (MORAES, MATOS & BRAZ-FILHO, 1988) que está associado à atividade antitumoral (FARKAS, 1980).

Em um estudo com 57 exemplares de plantas medicinais do nordeste brasileiro, o *C. mucronifolius,* através do seu extrato hidroalcoólico foi o que apresentou maior atividade

anticancerígena, com inibição do crescimento em torno de 73%, além de reduzir a freqüência de metástase (MORAES, CARVALHO & FONTENELE, 1982).

2.12.3.7. Croton sincorensis

Distribui-se nas florestas estacionais semideciduais da Cadeia do Espinhaço (BA, MG) e na Mata Atlântica da Bahia, Espírito Santo e Pernambuco, sobre solo arenoso e argiloso, entre 300 e 1.000 metros de altitude (SILVA *et al.,* 2010). Popularmente é conhecido como quebra-faca (CHARLES, 1989).

2.13. Capacidade Antioxidante

A propriedade de doar eletros, característica dos antioxidantes, permite a modulação do processo oxidativo no organismo, pois proporciona um ambiente celular redutor, de forma a inibir o efeito dos radicais livres e, conseqüentemente impedir o aparecimento de danos nas estruturas celulares (SOUSA *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2011).

Atualmente, tem aumentado consideravelmente interesse em encontrar antioxidantes de fontes naturais para uso em alimentos ou medicamentos, para substituir antioxidantes sintéticos, em que seu uso está cada vez mais restrito devido seu potencial efeito cancerígeno (LANIGAN & YAMARIK, 2002).

Os antioxidantes naturais representam uma alternativa viável; são dotados de efeitos indesejáveis limitados e possuem a flexibilidade necessária para serem usados na indústria alimentar e cosmética Nas últimas três décadas, a medicina preventiva através de formulações/ medicamentos têm dado grande importância à estes compostos (KRISHNAIAH, SARBATLY & NITHYANANDAM, 2011; PHAPALE & MISRA - THAKUR, 2010).

O poder antioxidante das plantas está intrinsecamente ligado à quantidade de polifenóis nelas presentes (BARREIRA *et al.,* 2008). Diante disso, estes compostos desempenham um papel de defesa contra danos e infecções a que são sujeitas, pelo que se encontram distribuídos por toda a sua estrutura, especialmente nas folhas, tecidos florais, cascas do tronco ou nos estames (KÄHKÖNEN *et al.*, 1999).

As moléculas polifenólicas são resultado do metabolismo secundário (BALASUNDRAM, SUNDRAM & SAMMAN, 2006; PROENÇA DA CUNHA *et al.,* 2007), e na sua estrutura base encontra- se, pelo menos, um anel fenólico que comporta vários substituintes hidroxila ou metoxila, proporcionando- lhes variadas conformações, desde o fenol mais simples até moléculas altamente polimerizadas (PROENÇA DA CUNHA *et al.*, 2007).

Diante disso, estes compostos são dotados da capacidade de atuar através de diversos mecanismos, dos quais se destaca a supressão da formação de ERO's por inibição enzimática ou por formação de quelatos com elementos envolvidos na produção de radicais livres, por captação de espécies reativas e por regulação ou proteção das defesas antioxidantes (MONTORO *et al.*, 2005).

A forte vertente antioxidante das plantas confere – lhes a propriedade de restringir os danos provocados pelo stress oxidativo nos sistemas celulares (LIGOR E BUSZEWSKI, 2007). Além disso, são atribuídos à esses mecanismos, uma gama de atividades farmacológicas como cardiotônica, antiulcerosa, antialérgica, antitumoral, hepatoprotetora, antibacteriana, antivírica, anti-inflamatória, antineoplásica, antisquêmica, antiplaquetária, antitumoral e antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1996; VÁZQUEZ *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009). Diante disso, neste trabalho, a atividade antioxidante de OEs é testada, assim como a atividade leishmanicida dos mesmos.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, as leishmanioses representam um grande entrave para políticas de saúde no que diz respeito à prevenção e controle de doenças de pessoas e animais domésticos. Sendo estas doenças graves consideradas das mais importantes no mundo, onde seus métodos de controle e tratamento ainda são difíceis e/ou ineficientes, torna-se fundamental a descoberta de novos agentes terapêuticos que venham facilitar os tratamentos em pessoas e torná-las possíveis em animais domésticos, como o cão. Dessa forma, a utilização de produtos naturais como os óleos essenciais de plantas do Nordeste constituem potenciais fontes alternativas nos tratamentos das leishmanioses.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Óleos essenciais das espécies de *Eugenia uniflora*, *Plectranthus amboinicus*e de espécies do gênero *Croton* sp.apresentam atividade frente à *L. chagasi, L. amazonensis e L. braziliensis.*

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade leishmanicida de óleos essenciais das espécies *Eugenia uniflora,Plectranthus amboinicus*e de espécies do gênero *Croton* sp. contra promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*.

5.2. Objetivos Específicos

- Extrair óleos essenciais das folhas das plantas a serem testadas.
- Analisar os óleos essenciais por cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas.
- Determinar a IC_{50} dos óleos essenciais testados através do ensaio de toxicidade em artemias.
- Avaliar a citotoxicidade em macrófagos AMJ2-C11.
- Avaliar a capacidade antioxidante dos óleos essenciais por meio do DPPH/ espectrofotômetro.
- Avaliar a atividade leishmanicida dos óleos essenciais contra promastigotas de *L. infantum chagasi, L. amazonensis* e *L.braziliensis.*

6. CAPÍTULO 1

Atividade leishmanicida e antioxidante de óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng

Danyelle S. Cossolosso[1], Selene M. Morais[12*], Clécio Galvão Martins[2], Antonio A.S Silva[2], Maria J. Teixeira[3], Manoel Odorico de Moraes Filho[4], Francisco Stefânio Barreto[4], Igor de Sá Carneiro[5], Claudio Cabral Campello[6] e Nadja S. Vila-Nova [2]

ABSTRACT - CossolossoD.S., Morais S.M., Vila-Nova N.S., Silva A.A., Teixeira M.J., Moraes Filho M.O., Barreto F.S., Carneiro I.S., Campello C.C. & Galvão C. 2013 [**Leishmanicidal and antioxidant activity of essential oils of *Eugenia uniflora*L. and *Plectranthus amboinicus*(Lour) Spreng].**Atividade leishmanicida e antioxidante de óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Plectranthus umboinicus. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00.* Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE 60740-000, Brazil. E-mail: selenemaiademorais@gmail.com

INDEX TERMS: leishmanicidal activity, antioxidant activity, *Eugenia uniflora*, *Plectranthus amboinicus*, óleos essenciais

---

Recebido em 11/11/2013
Aceito para publicação em .....
[1]Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil
[2]Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil
[3]Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, CEP 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil
[4]Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, CEP, 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brazil
[5]Departamento do Centro de Ciências da Saúde – Universidade de Fortaleza. Av. Washington Soares, 1321, Bairro Edson Queiroz, CEP 60811-905, Fortaleza, Ceará, Brasil.

RESUMO.- A Organização Mundial da saúde (OMS) considera as pesquisas utilizando metabólitos secundários extraídos de plantas medicinais uma prioridade na busca de novos tratamentos contra leishmaniose. O estudo de óleos essenciais de plantas, na busca de compostos com atividade leishmanicida, podem corroborar com essas práticas e dentre estes foram selecionados os da *Eugenia uniflora* e de *Plectranthus amboinicus.* Para a identificação dos componentes dos óleos essenciais (OEs) estudados foi usado o método de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria em massa (CG- EM). A análise da capacidade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH. Para os testes *in vitro* contra as diferentes cepas de *Leishmania*, os OEs e a Anfotericina B como droga controle foram incubadas por 24 h a 24°C e a viabilidade das células foi testada através do método MTT.Os testes de toxicidade foram realizados por meio de *Artemia* sp. e macrófagos AMJ2-C11. O principal componente encontrado nos dois OEs foi o timol, com 86,17% no *P. amboinicus* e 43,41% na *E. uniflora*. Nos tratamentos com *P. amboinicus*, os resultados para *L. braziliensis* e *L. i. chagasi* foram estatisticamente semelhante e melhores comparados com *L. amazonensis*. Nos tratamentos com *E. uniflora*, todos os tratamentos foram estatisticamente diferente, sendo a cepa mais susceptível *L. braziliensis* (IC_{50}: 11,03 µg/mL), seguido da *L. amazonensis* (IC_{50}: 24,39 µg/mL) e por último da *L. chagasi* (IC_{50}: 40,52 µg/mL). O teste com DPPH mostrou atividade antioxidante nos dois óleos estudados. No teste contra *Artemia* sp., os OEs apresentaram bioatividade. No teste com macrófagos, os OEs e a droga controle apresentaram citotoxicidade semelhante. Desta forma, observa-se neste estudo o potencial efeito leishmanicida e antioxidantes dos óleos em estudo, podendo estes servir como futuros fitoterápicos no combate a doenças tropicais.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Constituição química, atividade leishmanicida, atividade antioxidante, *Eugenia uniflora, Plectranthus amboinicus,* toxicidade.

ABSTRACT.-The World Health Organization (WHO) considers research using secondary metabolites extracted from medicinal plants a priority in the search for new treatments against Leishmaniasis. In the search for compounds with leishmanicidal activity, the essential oils of *Eugenia uniflora* and *Plectranthus amboinicus* were evaluated against three different *Leishmania* strains and the anti-radical activity was also determined.The components of essential oils (EOs) were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant analysis was performed by the method of DPPH. For the *in vitro* tests against *Leishmania* spp., the EOs and Amphotericin B were incubated with strains of *Leishmania* for 24 h at 24 °C and the cell viability was tested by the MTT method. Toxicity tests were carried out by *Artemia* sp. and AMJ2 - C11 macrophages. The main component in the two EOs was thymol, with 86.17 % in *P. amboinicus* and 43.41 % in *E. uniflora*. The treatments with *P. amboinicus, L. braziliensis* and *L. i.*

chagasi were statistically similar and more effectiveagainst*L. amazonensis.* All treatments with *E. uniflora* were statistically different;the strain more susceptible was*L. braziliensis* (IC_{50}: 11.03 µg/mL), followed by *L. amazonensis* (IC_{50}: 24.39 µg/mL) and finally *L. chagasi* (IC_{50}: 40.52 µg/mL). The DPPH test showed relevant anti-radical activity in both oils studied. In the test against *Artemia* sp., the EOs showed significant cytotoxicity. In the test with macrophages, EOs and drug control showed similar cytotoxicity. Thus, this study revealed the leishmanicidal and antioxidant effectsof studiedoils, and these may serve as future herbaldrugs in combating tropical diseases.

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças zoonóticas, multisistêmicas com vários sinais clínicos, característica de regiões tropicais e subtropicais do mundo causada por um protozoário bifásico do gênero *Leishmania sp*. Acomete além do homem, canídeos, felídeos, roedores e marsupiais, sendo transmitida por flebótomos do gênero *Lutzomyia* sp. (Novo mundo)ou *Phlebotomus* (Velho mundo) (SANTOS *et al.*, 1998). As doenças negligenciadas, a exemplo das Leishmanioses, embora afetem milhares de pessoas ao redor do mundo, ainda não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. As tentativas de tratamentos com drogas comercialmente utilizadas com eficácia em humanos, não têm obtido êxito na terapêutica em cães (ALENCAR, 1959). Segundo Marzochi(1985), o insucesso da antimonioterapia em cães poderia ser explicado em parte por uma alta excreção renal do antimônio, por um diferente metabolismo desta droga no fígado ou também por uma resposta imune não usual nos animais infectados. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infecção de flebotomíneos e leva ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Sendo assim, o tratamento da leishmaniose no cão ainda constitui um desafio para a ciência, estimulando diversos grupos de pesquisa nesta área de estudo (VOULDOUKIS *et al.*, 2006).

A World Health Organization (WHO) considera as pesquisas utilizando metabólitos secundários extraídos de plantas medicinais uma prioridade na busca de novos tratamentos contra leishmaniose (WHO, 2010).

Além disso, produtos naturais têm recebido grande atenção do ramo científico e industrial devido uma gama de substâncias que já demonstraram potenciais atividades farmacológicas. As plantas e seus derivados constituem um grande acervo de possíveis compostos bioativos (BRASIL, 2006). Por meio da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde (SUS), que contempla áreas como Plantas Medicinais e Fitoterapia e promove a institucionalização destas práticas, o Ministério da Saúde vem aderindo a recomendação da WHO

de integrar tais práticas nos sistemas oficiais de saúde. Sendo a Leishmaniose uma doença emergente e que afeta principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde métodos de tratamento e controle estão aquém das necessidades, o estudo de óleos essenciais (OEs) de plantas, na busca de compostos com atividade leishmanicida, podem corroborar com essas práticas e dentre estes foram selecionados os da *Eugenia uniflora* e de *Plectranthus amboinicus*.

Eugenia uniflora L., conhecida popularmente como pitangueira ou cerejeira brasileira, é frequentemente utilizada para tratamento de afecções inflamatórias, dores reumáticas, febre, hipoglicemia, diurese, diabetes, diarréia, afecções parasitárias e estomacais (AURICCHIO & BACCHI, 2003; LORENZI & MATOS, 2002). Em estudos anteriores com essa espécie, já foram demonstradas atividades antiinflamatória (SCHAPOVAL *et al.*, 1994), antivírica (LEE *et al.*, 2000), bactericida (OGUMWANDE et al, 2005) e antifúngica (ABADEJO *et al*., 1989).

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng,conhecida popularmente como malvarisco, alfavaca-grossa, orégano e hortelã da folha grossa (FRANÇA, LAGO & MARSDEN, 1996; LUKHOBA *et al.*, 2006), é amplamente utilizado na medicina popular no Brasil no tratamento de doenças da pele, constipação, cefaléia, tosse, rouquidão, febre, doenças do aparelho digestivo (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e leishmanioses (FRANÇA, LAGO & MARSDEN, 1996). Em estudos anteriores com essa espécie, já foram demonstradas atividades antifúngica (MURTHY, RAMALAKSHMI & SRINIVAS, 2009), larvicida (SENTHILKUMAR & VENKATESALU, 2010), antimicrobiana (ALVES, 2000), antiepiléptica (SÁLMAN *et al.*, 1996), antiinflamatória, antitumoral (GURGEL *et al.*, 2009), repelente contra um flebótomo vetor da leishmaniose (NIEVES *et al.*, 2010) .

Neste estudo, as espécies *Eugenia uniflora* e *Plectranthus amboinicus* foram estudadas quanto suas composições químicas, suas atividades frente a promastigotas de *Leishmania infantum chagasi, L. braziliensis* e *L. amazonensis*, além de suas toxicidades em *Artemia* sp. e macrófagos AMJ2-C11 e sua capacidade anti-radicalar.

MATERIAL E MÉTODOS

As exsicatas das espécies *Eugenia uniflora* e *Plecthrantus amboinicus* foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

As extrações dos OEs foram realizadas através de hidrodestilação, com o uso de aparelho tipo Clevenger,com duração de aproximadamente 4 horas. Ao final das extrações foram feitas as medições dos volumes dos OEs, para em seguida serem recolhidos e armazenados em vidros com tampa e estocados sob refrigeração para posteriores análises.

A caracterização química foi realizada por análises de cromatografia em fase gasosa com o uso de detector de espectrometria de massas (CG-EM), modelo GCMS qs 5050 da marca SHAIMADZU. Foi utilizado o gás Hélio como gás carreador em uma velocidade linear de 2 mL min^{-1}. A temperatura inicial de 50°C até 280°C à 4°C por minuto. Injetor de 250°C, interface 250°C e detector de 280°C. Em todas as análises foi utilizada coluna capilar de sílica de 30 m de comprimento, 0,25 mm de i.d. e película de 0,25 mm. As identificações foram realizadas por comparação dos dados de cromatografia (índices de retenção) e espectrometria de massas obtidos de padrões, da literatura e de espectrotecas (Willey 275).

A determinação da atividade antioxidante com o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com a metodologia de YEPEZ *et al.* (2002).

Em um tubo de ensaio, foi colocado 3,9 mL de uma solução metanólica de radical livre DPPH $6{,}5.10^{-5}$M, em seguida é adicionado ao tubo 0,1mL de solução metanólica da amostra de óleo essencial testado. É realizada uma medição após 60 minutos da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm nas concentrações de 10000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 10 e 5 das amostras.

A atividade antioxidante dos OEs testados foram determinadas através da sua capacidade de seqüestrar o radical DPPH onde calculou-se o potencial de inibição do DPPH de cada amostra em percentual, usando-se a fórmula: IV%: $\frac{A_{branco} - A_{amostra}}{A_{branco}} x100$

Onde: A_{branco}: absorbância da reação controle

$A_{amostra}$: absorbância da amostra

O volume da solução de DPPH foi calculado pelo n° de concentração 3 x n° de amostras x 3,9 mL. A solução de DPPH estando entre 0,6 e 0,7nm. A leitura foi realizada três vezes com o branco (MeOH) e na cubeta 2 a solução DPPH.

Par obtenção dos parasitas, promastigotas de: *Leishmania (L.) chagasi* (cepa LVHSI17); *Leishmania (L.) amazonensis* (cepa BA336) e *Leishmania (V.) braziliensis* (cepa LTCP393) foram cultivadas em meio Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% urina humana masculina e mantida à 26°C. Em seguida, analisadas sob um microscópio de luz para confirmar a viabilidade dos parasitas.

Para a realização dos testes *in vitro* contra as promastigotas, em placas de 96 poços foram adicionadas promastigotas na concentração de 10^6 cel/poço determinadas após contagem na câmara de Neubauer. As drogas foram colocadas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/ml, a Anfotericina B foi eleita a droga controle. As placas foram encubadas por 24 horas a 24°C. Os ensaios foram feitos em duplicatas, e realizada uma réplica de cada ensaio. A viabilidade das células foi testada usando o método colorimétrico MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-brometo de 2,5-

difeniltetrazólio (Sigma®). Anteriormente o MTT (5mg/mL) foi dissolvido em PBS e esterelizado por membranas de 0,22µm e adicionado 20µl/poço, por 4 horas a 24°C. Para lise das céulas e solubilização dos cristais de formazan foi adicionado uma solução de 50% SDS à 10% e de 50% álcool isso - propílico por 15 minutos (100 µl/poço). A densidade óptica (DO) foi determinada utilizando Multiskan MS (UNISCIENCE) a 595nm.

O ensaio de letalidade contra *Artemia* sp. foi realizado de acordo com o método proposto por Meyer *et al.* (1982) adaptado: Ovos de *Artemia* sp. foram incubados em água salina, à temperatura ambiente, por um período de 48 horas em um aquário adaptado com um compartimento escuro e outro claro. Com o auxílio de uma fonte de luz, as larvas eclodidas eram atraídas para a luz, recolhidas com uma pipeta de Pasteur e transferidas para um Becker com água salina. Foram preparadas soluções de extração com solventes: metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e água salina, em concentrações que vão de 10.000 a 1 ug/ml. Adicionaram-se em tubos de ensaio 10 larvas contendo 5 mL de cada uma das soluções testadas e o controle, contendo apenas o solvente (DMSO e solução salina). Os ensaios foram realizados em triplicata, o número de larvas mortas medido após 24 horas.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado a partir da metodologia adaptada de Tempone *et al.* (2005). Em que macrófagos de linhagem AMJ2-C11 semeados a uma concentração de $4x10^4$ cel/poço em microplacas de 96 poços e em seguida, incubadas a 37 ° C por período de 24 horas em incubadora umidificada em CO_2 a 5%. Os OEs foram testados à uma concentração de 100 µg/mL e para o controle foi utilizado Anfotericina B. A viabilidade dos macrófagos foi determinada através do ensaio de MTT, tal como já descrito.

Uma curva de regressão não linear foi utilizada para calcular os valores de IC_{50} da ação leishmanicida dos OEs e os percentuais obtidos após os tratamentos, apresentados por média ± desvio padrão e analisados pelo teste Qui-quadrado no intervalo de confiança de 95%. Os dados da atividade leishmanicida foram testados quanto ao atendimento das exigências para a realização da análise de variância e confirmados pelo teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade de variâncias entre os tratamentos foi confirmada pelo teste de Bartlett. A ANOVA foi então realizada com auxílio do procedimento GLM do Programa SAS (2002) e o teste de Tukey foi aplicado para a comparação das médias. Para o cálculo da CL_{50} em *Artemia* sp., foi usado o Probit análise do software SPSS Statistics 17.0 .

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a composição química dos OEs analisados por CG/EM. No OE de folhas de *E. uniflora*, foram identificados 13 compostos, correspondendo à 97,56 % do total do óleo. O timol, o cariofileno (E), o carvacrol, o óxido de cariofileno e o 1,8-cineole (Fig. 1) foram os

compostos encontrados em maior quantidade, correspondendo à 43,41%, 23,38%, 12,22%, 4,81% e 2,93%, respectivamente. Esses compostos são prováveis responsáveis por diversas atividades farmacológicas de várias espécies vegetais conhecidas, de acordo com estudos anteriores (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007).

A Figura 1. mostra a representação das estruturas moleculares dos principais componentes encontrados nos OEs das folhas das espécies estudadas.

No OE de folhas de *P. amboinicus*, 5 compostos foram identificados, correspondendo à 100% do total de óleo. O componente em maior quantidade encontrado, assim como no OE de folhas da *E. uniflora*, também foi o timol, correspondendo à 86,17% do total do óleo, seguido do óxido de cariofileno com 5,43% e do cariofileno (E) com 3,75% do total do OE (Tab. 1).

A tabela 2 apresenta os resultados dos IC_{50} dos OEs de *P. amboinicus*, *E. uniflora* e da droga controle utilizada sobre as cepas de *Leishmania*, além da comparação estatística entre os tratamentos. Os valores da ação dos OEs sobre as cepas de *Leishmania* apresentaram distribuição normal (confirmada por teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias entre os tratamentos (confirmada poro teste de Bartlett). Todos os OEs estudados neste trabalho apresentaram atividade contra as 3 espécies de *Leishmania.* O OE de *P. amboinicus*, não apresentou diferença significativa entre as cepas de *L. braziliensis* (IC_{50}: 12,40 µg/mL)e *L. i. chagasi* (IC_{50}: 12,98 µg/mL),sendo menos efetivo na ação contra *L. amazonensis* (IC_{50}: 23,80 µg/mL).

Nos tratamentos com OE de *E. uniflora* houve diferença significativa entre todas as cepas de *Leishmania* estudadas. O tratamento mais efetivo foi contra a *L. braziliensis* (IC_{50}: 11,03 µg/mL), seguido da *L. amazonensis* (IC_{50}: 24,39 µg/mL) e por último da *L. i. chagasi* (IC_{50}: 40,52 µg/mL). Analisando os tratamentos entre as drogas (comparação de linhas) observamos que a Anfotericina B demonstrou uma atividade superior quando comparada com as drogas em estudo. Em relação a *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, os óleos em estudo demonstraram semelhança estatística. No estudo utilizando *L. i. chagasi*, o OE de *P. amboinicus* com IC_{50}12,98 µg/mL apresentou uma atividade melhor e significativamente diferente da *E. uniflora* (IC_{50}: 40,52 µ/mL).

Para avaliar a atividade antioxidante foi usado o DPPH, este apresenta coloração violeta e na presença de doadores de hidrogênio (antioxidantes seqüestrantes de radicais livres) se reduz tornando-se amarelo (GAMA, 2008). Os valores de Índice de Varredura (IV_{50}) encontrados dos OEs estudados mostram na Tabela 3. que tanto a espécie *E. uniflora* quanto a *P. amboinicus* apresentaram atividade antioxidante com IV_{50} 49,36 µg/mL e IV_{50} 2,62 µg/mL, respectivamente.

Os OEs de *E. uniflora* e *P. amboinicus* foram submetidas a bioensaio de suas toxicidades em relação à *Artemia* sp., utilizado para avaliar o potencial de bioatividade de um composto. A Tabela 3. mostra as letalidades dos OEs de acordo com as concentrações que variam de 1000 à 1

µg/mL e onde suas LC_{50} foram 20,41 µg/mL e 15,05µg/mL, respectivamente (Tab. 1). Diante disso, pode-se verificar que ambas as espécies vegetais apresentaram excelente bioatividade.

Os OEs das espécies *E. uniflora* e *P. amboinicus* testados quanto suas toxicidades em células monocíticas da linhagem AMJ2-C11Na demonstraram que na concentração de 100 µL/mL, tanto o OE de *E. uniflora* quanto de *P. amboinicus* apresentaram toxicidade semelhante à droga Anfotericina B (droga padrão) em macrófagos AMJ2-C11 (Fig. 2).

DISCUSSÃO

A caracterização química das plantas cultivadas nas diversas regiões torna-se imprescindível, uma vez que a produção dos metabólitos secundários nas plantas é susceptível aos fatores genéticos, morfológicos, variação geográfica, estágio do ciclo vegetativo da planta, técnicas de cultivo, método de extração, umidade relativa, duração de exposição ao sol, regime de ventos, grau de hidratação do terreno e variações sazonais (SILVA, 2007; SIMÕES *et al.,* 1999). Além de contribuir para o conhecimento da flora local e assegurar à população, o uso adequado e seguro destas plantas propiciam o desenvolvimento de novos fármacos.

Outro estudo, também identificou o timol como componente majoritário do OE de *P. amboinicus* (75,39% na primavera e 70,28% no inverno) (OLIVEIRA *et al.,* 2011), corroborando com os dados encontrados neste estudo que também apresenta o timol como componete majoritário. Entretanto, estudos anteriores sobre a composição química do óleo essencial de *P. amboinicus* mencionaram o carvacrol como o componente em maior quantidade (70,0%) (MURTHY, RAMALAKSHMI & SRINIVAS, 2009) e 68% (PEREIRA *et al.,* 2008).De acordo com Murthy, Ramalakshmi & Srinvas (2009), existem dois quimiotipos de OE de *P. amboinicus*: um rico em timol e outro em carvacrol.

Na análise do OE de *E. uniflora*, verificou-se que o timol também foi o principal componente encontrado (43,41%). Entretando, Rodrigues *et al.* (2013) encontrou no OE das folhas deste mesmo vegetal o principal constituinte Curzerene (47,3%), esta diferença se deve ao fato que os vegetais podem possuir constituintes diferentes devido a fatores ambienteis e externos já citados.

O timol encontrado em maior quantidade em ambos os óleos, tem sido alvo de várias pesquisas devido às demonstrações de suas diversas atividades farmacológicas como fungicida (AHMAD *et al.,* 2010), anti-inflamatória e cicatrizante (RIELLA *et al.,* 2012), ação antimicrobiana (GUARDA *et al.,* 2011) e antioxidante (UNDERGER *et al.,* 2009). Os efeitos leishmanicidas *in vitro* dos óleos essenciais ricos em carvacrol e em timol de folhas de *Lippia sidoides* Cham. mostraram atividade significativa contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

O OE de *P. amboinicus* apresentou eficácia semelhante ao OE de *E. uniflora* em relação às cepas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Entretanto, o OE de *P. amboinicus* mostrou-se mais

efetivo contra *L. i. chagasi* que o OE de *E. uniflora*, podendo ser explicado pela maior concentração de timol em sua composição que a segunda citada.

Em estudo realizado por Medeiros *et al.* (2011), observou-se uma ação inibitória do óleo de *Lippia sidoides*, e de seu principal componente timol, contra promastigotas de *L. amazonensis*, com IC_{50}/48h de 44,38 e 19,47 mg/mL, respectivamente. Estudo realizado com a espécie *L. (Viannia) panamensis* demonstrou que a atividade do timol sintético contra formas promastigotas foi de IC_{50} 194.3 µg/mL ±3.9. Além disso, no experimento *in vivo*, o timol apresentou redução de 46% da carga parasitária e não demonstrou toxicidade, sugerindo ser um composto promissor na busca no tratamento da leishmaniose (ROBLEDO *et al.*, 2005). Outro estudo com o óleo essencial de *Lippia sidoides*, rico em timol, sobre a inibição do crescimento de promastigotas de *L. i. chagasi* apresentou IC_{50}/24h de 19,76 µg/mL (RONDON *et al.*, 2012) e IC_{50}/72h de 89 µg/mL, além de ter provocado alterações morfológicas drásticas neste parasita (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O extrato bruto de *P. amboinicus* foi efetivo contra promastigotas de *L. infantum chagasi* com um valor de IC_{50} de 45,14 µg/mL e na concentração testada mais elevada (500µg/mL) a efetividade contra os parasitas foi de 100% (TEMPONE *et al.*, 2008). Esta espécie tem sido utilizada no tratamento de ulcerações de pele causadas por *Leishmania* sp. entre a população rural dos produtores de cacau área costeira do estado da Bahia, Brasil (FRANÇA, LAGO & MARSDEN *et al*., 1,996).

De acordo com Melo *et al.* (2013), as espécies *Trichophyton rubrum* e *L. i. chagasi* foram altamente suscetíveis ao timol e carvacrol, componentes principais do OE de *L. gracilis.* Estes dados justificam mais estudos sobre o efeito potencial de OEs que contenham o timol como principal componente contra outras espécies de *Leishmania*.

Um dos possíveis mecanismos de ação do timol sobre *Leishmania*, é que, assim como em bactérias, essa substância atue diretamente sobre a síntese e atividade da ATPase e da concentração de íons de potássio e fosfato no parasita e provoque danos estruturais e funcionais a membrana celular (LAMBERT *et al.*, 2001; OSORIO *et al.*, 2006).

A análise dos OEs estudados mostra que os mesmos são ricos em compostos fenólicos como timol e/ou carvacrol, que por serem considerados bons antioxidantes (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007), podem ser responsáveis pela referida atividade nestas espécies. Estudo realizado anteriormente com o método de oxidação lipídica, também demonstrou que o OE de *E. uniflora* apresentou alta atividade antioxidante (VICTORIA *et al*., 2013).

O OE da espécie *P. amboinicus* apresentou melhor ação antioxidante comparado ao da *E. uniflora.* Tal ação possivelmente está relacionada à alta concentração de timol em sua composição, apresentando o dobro da concentração quando relacionada ao da *E. uniflora*. De acordo com Muñoz-Acevedo, Kouznetsov & Stashenko (2009), o timol apresentou maior atividade antioxidante

em relação aos OEs testados no referido estudo, que apresentavam o timol como uma das substâncias presentes em maior quantidade, ratificando seu efeito antioxidante.

O estresse oxidativo e a geração de radicais livres têm sido relacionados com um grande níumero de doenças, como câncer, envelhecimento, aterosclerose, isquemia, inflamações e doenças neuro-degenerativas. Diante disso, terapias antioxidantes parecem prevenir ou pelo menos atenuar a deterioração orgânica por um excessivo estresse oxidativo (GUERRA, 2001). Segundo Demicheli & Frézard (2005), a Glutationa, enzima antioxidante presente no organismo que contém o grupo sulfidrila e é o tiol predominante no meio intracelular, participa de um dos possíveis mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes, empregados como medicamentos padrões no tratamento de leishmanioses, atuando na redução das referidas substâncias em suas formas de antimoniais trivalentes, consideradas as formas ativas contra o parasita. Diante disso, substâncias naturais com propriedades antioxidantes, como os OEs de *E. uniflora* e *P. amboinicus* podemapresentar elevado potencial terapêutico contra leishmanioses.

Os testes de toxicidade em *Artemia* sp. são comumente utilizados em pesquisas que visam avaliar o potencial farmacológico de uma substância (BARBOSA *et al.* , 2009). Neste teste, para ser considerado efetivo, o valor da LC_{50} de uma substância contra *Artemia* sp. precisa estar abaixo de 1000 µg/mL e então a substância é reconhecida com potencial bioatividade (MEYER *et al.* , 1982). Em estudo realizado com o extrato etanólico de *E. uniflora*, verificou-se que o mesmo apresentou bioatividade frente à *Artemia* sp. com LC_{50} 288,45 µg/mL (ARCANJO *et al.*, 2012).. Entretanto, no que diz respeito à eficácia frente à *Artemia* sp, o OE de *E. uniflora* apresentou melhor eficiência com LC_{50} 20,41 µg/mL, revelando que outros compostos presentes em menor proporçãoestejam atuando sinergisticamente com o timol. Estudo realizado com *P. amboinicus* nas formas de extrato etanólico e extrato aquoso frente à *A. salina*, verificou que os mesmos apresentaram bioatividade com LC_{50} 52, 29 µg/mL e LC_{50} 82,27 µg/mL, respectivamente (PARRA *et al.*, 2001). Entretanto, no que diz respeito à eficácia frente à *A. salina*, o OE de *P. amboinicus* apresentou melhor eficiência com LC_{50} 20,41 µg/mL.

A semelhança de resultados dos OEs de *E. uniflora* e *P. amboinicus* com a droga padrão Anfotericina B quanto à citotoxicidade em macrófagos, sugere um bom potencial farmacológico dos OEs, uma vez que, diferentemente da Anfotericina B, também apresentaram atividade antioxidante, possibilitando, dessa forma, a redução de danos celulares causados pelo estresse oxidativo em uma infecção. Além disso, estudo anterior de toxicidade com esta espécie de planta, no qual foram utilizadas células hemocíticas de carneiro, o extrato bruto na concentração de 100 µL/mL não apresentou toxicidade (LUIZE *et al.*, 2005) e a infusão de folhas desta planta, por via oral, demonstrou uma baixa toxicidade em camundongos Swiss (SCHAPOVAL *et al.*, 1994). Em estudo anterior, a atividade citotóxica do timol em macrófagos humanos foi de IC_{50}> 400.00±00

(ROBLEDO *et al.*, 2005). O timol mostrou toxicidade (CC_{50}µg/mL: 37.41 ± 2.72) contra macrófagos peritoniais (MEDEIROS *et al.*, 2011).

Com os resultados demonstrados neste estudo, pode-se observar que os óleos essenciais ricos em timol extraídos da *P. amboinicus* e *E. uniflora* possuem potencial atividade leishmanicida e antioxidantes, com citotoxicidade semelhante a droga padrão Anfotericina B. Sendo estes vegetais promissores no tratamento da Leishmaniose, e de fácil acesso e barato para a população.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS

ABADEJO, A.C., OLOKE, K.J., ALADESANMI, A.J., 1989. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of Eugenia uniflora.Fitoterapia, 5, 451-455.

AHMAD, A., KHAN, A., YOUSUF, S., KHAN, L.A., MANZOOR, N., 2010. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. Fitoterapia,81, 1157-1162.

ALENCAR, J.E., 1959. Calazar Canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil, Fortaleza: {s. n.}.

ALVES, T.M.A., 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants.Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95, 367–373.

ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D., 2004.Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. Caderno de Saúde Pública, 20, 1, 259-265.

ARCANJO, D.D.R., ALBUQUERQUE, A.C.M., MELO-NETO, B., SANTANA, L.C.L.R., MEDEIROS, M.G.F., CITÓ, A.M.G.L., 2012. Avaliação da bioatividade frente à *Artemia salina* Leach de plantas medicinais utilizadas na medicina popular na Região Nordeste do Brasil. Brazilian Journal Biology, v. 72, n. 3, 505 – 509.

AURICCHIO, M.T., BACCHI, E.M., 2003. *Eugenia uniflora* L. "brazilian cherry" leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. Adolfo Lutz Institute Journal, 62, 55 – 61.

BARBOSA, T.P., JUNIOR, C.G.L., SILVA, F.P.L., LOPES, H.M., FIGUEIREDO, L.R.F., SOUSA, S.C.O., BATISTA, G.N., SILVA, T.G., SILVA, T.M.S., OLIVEIRA, M.R., VASCONCELOS, M.L.A.A., 2009. Improved synthesis of seven aromatic Baylise Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salinaLeach*. and*Leishmania chagasi*. European Journal Of Medicinal Chemistry, 44, 1726–1730.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2006. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F., 2005. Novas embalagens para medicamentos à base de Antimônio usados no tratamento de Leishmaniose e Esquistossomose. Cadernos temáticos de química nova na escola, julho, 6.

FRANÇA, F., LAGO, E.L., MARSDEN, P.D., 1996. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 29, 229-232.

GAMA, J.J.T., 2008. Efeito do processo de obtenção do catchup sobre seus compostos antioxidantes, capacidade sequestrante do radical DPPH e cor. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo.

GUARDA, A., RUBILAR, J.F., MILTZ, J., GALOTTO, M.J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol.Internetional Journal of Food Microbiology, 146, 144-150.

GUERRA, M.P., Nodari, R.O., 2001. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre: UFRGS, 3, 15.

GURGEL, A.P.A.D., DA SILVA, J.G., GRANGEIRO, A.R.S., OLIVEIRA, D.C., LIMA, C.M.P., DA SILVA, A.C.P., OLIVEIRA, R.A.G., SOUZA, I.A., 2009.In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae).Journal of ethnopharmacology, 125, 361 -363.

LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J., NYCHAS, G.J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal Applied Microbiology, 91, (3), 453 - 462. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x

LEE, M., CHIOU, J., YEN, K., YANG, L., 2000. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora.*Cancer Letters, 154, 131–136.

LORENZI, H., MATOS, J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cutivadas.

Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 512.

LUIZE, P.S., TIUMAN, T.S., MORELLO, L.G., MAZA, P.K., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., CORTEZ, D.A.G., MELLO, J.C.P., NAKAMURA, C.V., 2005. Effects of

medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis*and *Trypanosoma cruzi*.Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 41, 85-94.

LUKHOBA, C.W., SIMMONDS, M. S. J., PATON, A. J., 2006. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. Journal of Ethnopharmacology, 103, 1–24.

MARZOCHI, M.C.A., 1985. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. Cadernos de Saúde Pública,1, 432-446.

MEDEIROS, M.G. F., SILVA, A.C., CITÓ, A.M.G.L., BORGES, A.R., LIMA, S. G., LOPES, J.A.D., FIGUEIREDO, R.C.B.Q., 2011. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoidesCham.*Parasitology International, 60, 237-241.

MELO, J.O., BITENCOURT, T.A., FACHIN, A.L., CRUZ, E.M.O., JESUS, H.C.R., ALVES, P.B., ARRIGONI-BLANK, M.F., FRANCA, S.C., BELEBONI, R.O., FERNANDES, R.P.M., BLANK, A., SCHER, R., 2013. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes.Acta Tropica, 128, 110–115.

MEYER, B.N., FERRIGINI, N.R., PUTNAN, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Médica, 45, 31-34.

MORAIS, S.M., BRAZ-FILHO, R., 2007. Produtos Naturais. Estudos químicos e biológicos. Fortaleza, Ed. UECE, 240pp.

MUÑOZ-ACEVEDO, A., KOUZNETSOV, V.V., STASHENKO, E.E., 2009. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, *trans*-Anetol o Estragol. Revista de la Universidad Industrial de Santander, 41, 287.

MURTHY, P.S., RAMALAKSHMI, K., SRINIVAS, P., 2009. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. Food Chemistry, 114, 1014–1018.

NIEVES, E., MÉNDEZ, J.F., LIAS, J., RONDÓN, M., BRICEÑO, B., 2010. Actividad repelente de aceites esenciales contra las picaduras de Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae). Revista de Biología Tropical, 58, 1549.

OLIVEIRA, R.A.G., LIMA, E.O., SOUZA, E.L., VIEIRA, W.L., FREIRE, K.R.L., TRAJANO, V.N., LIMA, I.O., SILVA-FILHO, R.N., 2007. Interferência do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng sobre a atividade anti-*Candida*de alguns antifúngicos utilizados clinicamente. Revista Brasileira de Farmacognosia,17, 186-190.

OLIVEIRA, V.C.S., MOURA, D.M.S., LOPES, J.A.D., ANDRADE, P.P., SILVA, N.H., FIGUEIREDO, R.C.B.Q., 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.,*Lippia sidoides* Cham. and*Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotas. Parasitology Research , 104, 1053–1059.

OLIVEIRA, R.A., SÁ, I.C.G., DUARTE, L.P., OLIVEIRA, F.F., 2011. Volatile constituents of *Mentha pulegium* L. and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 13, 165-169.

OGUNWANDE, L.A., OLAWORA, N.O., EKUNDAYO, O., WALKER, T.M., SCHIDT, J.M., SETZER, W.N., 2005. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora L.*International journal of aromatherapy.15, 147-152.

OSORIO. E., ARANGO, G., ROBLEDO, S., MUÑOZ, D., JARAMILLO, L., VÉLEZ, I., 2006. Antileishmanial and cytotoxic activity of synthetic aromatic monoterpenos.Acta Farmacêutica Bonaerense, 25, (3), 405-413.

PARRA, A.L., YHEBRA, R.S., SARDIÑAS, I.G., BUELA, L.I., 2001. Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD_{50} value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts.Phytomedicine, 8, (5), 395–400.

PEREIRA, C.K.B., SANTOS, P.F., RODRIGUES, F.F.G., SANTOS, N.K.A., COSTA, J.G.M., LIMA, S.G., 2008. Composição química e toxicidade do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. In: III REUNIÃO REGIONAL FeSBE, Fortaleza, Ceará. Disponível em: <http://www.fesbe.org.br/regional2008/?resumos/36.003>. Acesso em: 15 out. 2013.

RIELLA, K.R., MARINHO, R.R., SANTOS, J.S., PEREIRA-FILHO, R.N., CARDOSO, J.C., ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C., THOMAZZI, S.M., 2012. Anti-inflammatory and 145 cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents.Journal of Ethnopharmacology, 143, 656-663.

ROBLEDO, S., OSORIO, E., MUÑOZ, D., JARAMILLO, L.M., RESTREPO, A., ARANGO, G., VÉLEZ, I., 2005. *In Vitro* and *In Vivo* Cytotoxicities and Antileishmanial Activities of Thymol and Hemisynthetic Derivatives.Antimicrobial Agents Chemotheraphy, 49, 1652.

RODRIGUES, K.A.F., AMORIM, F.V., OLIVEIRA, J.M.G., DIAS, C.N., MORAES, D.F.C., ANDRADE, E.H.A., MAIA, J.G.S., CARNEIRO, S.M.P., CARBALHO F.A.A., 2013. *Eugenia uniflora* L. Essential oil as a potential anti-leishmania angent: Effect on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, Article ID 279726, 10.

RONDON, F.C.M., BEVILAQUA, C.M.L., ACCIOLY, M.P., MORAIS, S.M., ANDRADE-JÚNIOR, H.F., CARVALHO, C.A., LIMA, J.C., MAGALHÃES, H.C.R., 2012. Eficácia *in vitro* de *Coriandrum sativum, Lippia sidoides* e *Copaifera reticulata* sobre *Leishmania chagasi.* Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 21, (3), 185-191.

SÁLMAN, J.G.D., JIMENEZ, T.E.G., CASTILHO, R.M., 1996. Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus*(Lour.) Spreng. (Orégano Francés). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2, 27–30.

SANTOS, S.O., FARIAS, J., RIBEIRO, A.A., HOFFMANN, M.P., FREITAS, R.A., MALACCO, M.A., 1998.Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. Medical and Veterinary Entomology**,** 12, 315-7.

SCHAPOVAL, E.E.S., SILVEIRA, S.M., MIRANDA, M.L., ALICE, C.B., HENRIQUES, A.T., 1994. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugeniu unijlora L.*Journal of Ethnopharmacology, 44, 137-142.

SENTHILKUMAR, A., VENKATESALU, V., 2010. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. Parasitology Research, 107, 1275–1278.

SILVA, M.G.V. In: MORAIS, S.M., BRAZ-FILHO, R., 2007. Produtos Naturais. Estudos químicos e biológicos. Fortaleza, Ed. UECE, 91-101.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., 1999. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 2. Ed, Florianópolis, Porto Alegre. Ed. Da UFRGS, 821pp.

TEMPONE, A.G., BORBOREMA, S.E.T., ANDRADE, H.F., GUALDA, N.C.A., YOGI, A., CARVALHO, C.S., BACHIEGA, D., LUPO, F.N., BONOTTO, S.V., FISCHER, D.C.H., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. Phytomedicine, 12, 382-390.

TEMPONE, A.G., SARTORELLI,P., TEIXEIRA, D., PRADO, F.O., CALIXTO, I.A.R.L., LORENZI, H., MELHEM, M.S.C., 2008. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103, 443 - 449.

UNDERGER, U., BASARAN, A., DEGEN, G.H., BASARAN, N., 2009. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (ocidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells ar low levels of carvacrol and thymol. Food and Chemical Toxicology, 47, 2037-2043.

VICTORIA, F.N., BRAHM, A.S., SAVEGNAGO, L., LENARDÃO, E.J., 2013. Involvement of serotoninergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora L.* leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. Neuroscience Letters, 544, 105 -109.

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LOPEZ, S.; BOLANOS, G. 2002. Producing antioxidant fractions from herbaceuos matrices by supercriticalfluid extraction. Fluid Phase Equilibra, 254, 879-884.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Division of control of tropical diseases, Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden magnitude/ en/index.html. (Acesso: June, 2013).

LEGENDA DAS FIGURAS

Fig. 1.Representação das estruturas moleculares dos principais componentes encontrados nos OEs de *Eugenia uniflora* e *Plectranthusamboinicus.*

Fig. 2. Citotoxicidade dos compostos à 100 µg/mL em células AMJ2-C11 com os OEs *E. uniflora*,*P. amboinicus* e Anfotericina B como controle.

Tabelas

Tabela 1. Componentes encontrados nos OEs de *Eugenia uniflora* e *Plectranthusamboinicus* pelo método de Cromatografia gasosa e Espectrofotometria de massas, com seus respectivos Índice Kovat e teores em cada óleo.

Componentes	Índice Kovat (KI)	*Eugenia uniflora*	*Plectranthus amboinicus*
		%	%
p-cimeno	1024	1,35	—
1,8- cineole	1031	2,93	—
α- terpinene	1059	0,75	—
terpinen-4-ol	1177	1,07	1,67
timol, metil eter	1235	2,54	—
timol	1290	43,41	86,17
carvacrol	1299	12,22	—
α- copaene	1376	0,86	—
cariofileno (E)	1419	23,38	3,75
aromadendrene	1441	2,23	—
α-humulene	1454	1,26	—
cadinene (δ)	1523	0,75	—
óxido de cariofileno	1583	4,81	5,43
β-trans-bergamoteno	1434	—	2,98

Tabela 2. Atividade leishmanicida dos OEs de *Eugenia uniflora* e *Plectranthus amboinicus* sobre as espécies *Leishmania (L.) chagasi, Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis.*

OEs/ espécies	IC_{50}(%)			Toxicidade *A. salina*
	L.amazonensis	***L.braziliensis***	***L.i.chagasi***	
Anfotericina B	7,38 ± 1,26 A*b**	2,50 ± 0,54 Bb	5,39 ± 1,14 Ac	-
P. amboinicus	23,80 ± 3,14 Aa	12,40 ± 3,75 Ba	12,98 ± 3,28 Bb	15,05[a](9,46– 24,39)
E. uniflora	24,39 ± 4,80 Ba	11,03 ± 2,00 Ca	40,52 ± 6,60 Aa	20,41[a](11,20– 37,23)

*Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas.
**Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas.

Tabela 3. Atividade antioxidante de OEs de *Eugenia uniflora* e *Plectranthus amboinicus* através do método de DPPH.

Óleo essencial/ Espécie vegetal	IV* 50 µg/mL	desvio padrão
Plectranthus amboinicus	2,62	± 0,09
Eugenia uniflora	49,36	± 6,18

*Ìndice de varredura que neutraliza o radical DPPH

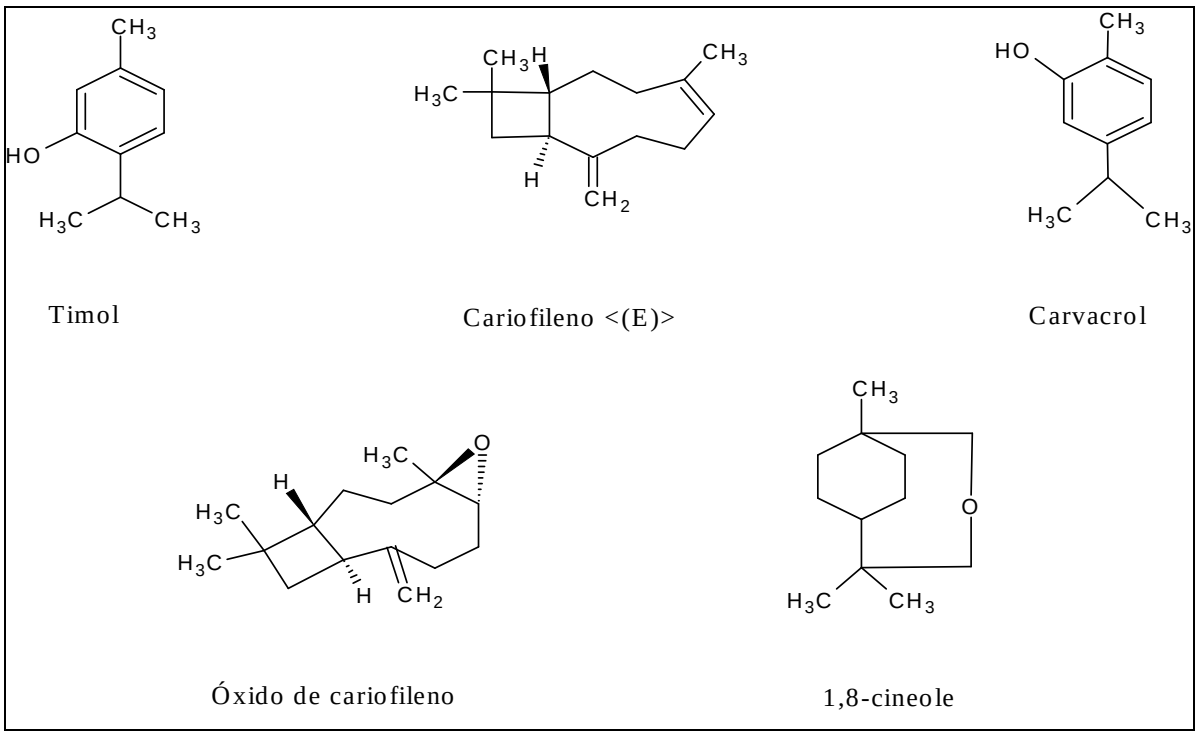
Timol
Cariofileno <(E)>
Carvacrol
Óxido de cariofileno
1,8-cineole

Fig. 1.

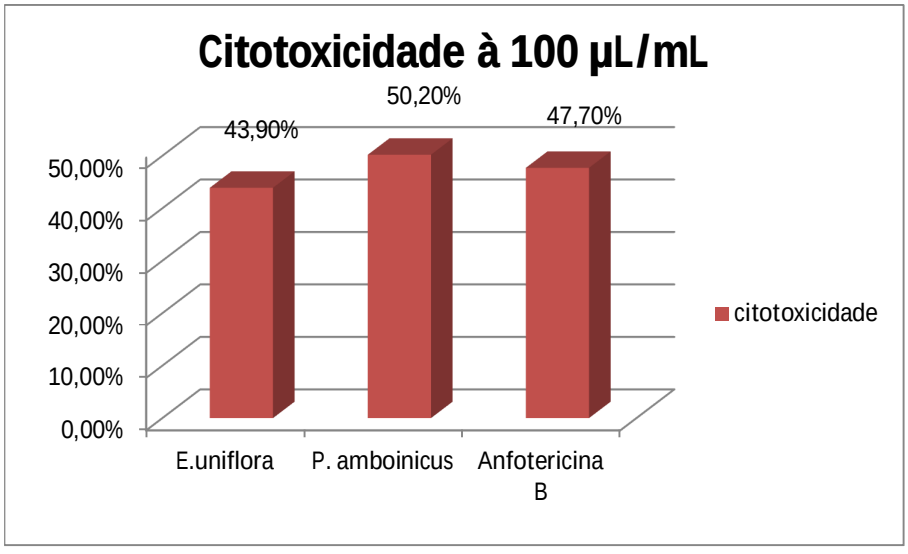
Citotoxicidade à 100 µL/mL
43,90%
50,20%
47,70%
50,00%
40,00%
30,00%
20,00%
10,00%
0,00%
E.uniflora
P. amboinicus
Anfotericina B
citotoxicidade

Fig. 2.

7. CAPÍTULO 2

Atividade leishmanicida e antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* encontrados no Nordeste brasileiro

Danyelle S. Cossolosso[1], Selene M. Morais[12*], Clécio Galvão Martins[2], Antonio A.S Silva[2], Maria J. Teixeira[3], Manoel Odorico de Moraes Filho[4], Francisco Stefânio Barreto[4], Igor de Sá Carneiro[5], Claudio Cabral Campello[6] e Nadja S. Vila-Nova [2]

ABSTRACT- - CossolossoD.S., Morais S.M., Vila-Nova N.S., Silva A.A., Teixeira M.J., Moraes Filho M.O., Barreto F.S., Carneiro I.S., Campello C.C. & Galvão C. 2013 [**Leishmanicidal and antioxidant activity of essential oils of *Crotons* found in the Brazilian Northeast].**Atividade leishmanicida e antioxidante de óleos essenciais de *Crotons* encontrados no Nordeste brasileiro].*Revista 00(0):00-00*. Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE 60740-000, Brazil. E-mail: selenemaiademorais@gmail.com

INDEX TERMS: leishmanicidal activity, antioxidant, chemical constituents, essential oils, *Crotons*

Recebido em .....
Aceito para publicação em .....

[1]Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil
[2]Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Av. Paranjana, 1700, CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil
[3]Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, CEP 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil
[4]Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Rua Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, CEP, 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brazil
[5]Departamento do Centro de Ciências da Saúde – Universidade de Fortaleza. Av. Washington Soares, 1321, Bairro Edson Queiroz, CEP 60811-905, Fortaleza, Ceará, Brasil.

RESUMO

A leishmaniose é uma das principais doenças parasitárias com prioridades de pesquisa segundo a Organização Mundial da Saúde. A urgência por drogas menos tóxicas tem conduzido a pesquisa por novas terapias alternativas. Os óleos essenciais (OEs) de *Crotons* apresentam um amplo espectro de atividades biológicas. Diante disso, buscou-se avaliara atividade leishmanicida e antioxidante de OEs de *Crotons*, assim como determinar suas constituições químicas e suas toxicidades. Para a identificação dos componentes OEs foi usado o método de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria em massa (CG- EM). A análise da capacidade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH. Para os testes *in vitro* contra diferentes cepas de *Leishmania*, os OEs e a Anfotericina B, como droga controle, foram incubadas por 24 h a 24°C e a viabilidade das células foi testada através do método MTT. Os testes de toxicidade foram realizados por meio de *Artemia* sp. e macrófagos AMJ2-C11. O óxido de cariofileno e espatulenol foram os principais componentes encontrados em todos os OEs estudados, com exceção do *C. nepetaefolius*, que apresentou o metil-eugenol e E-cariofileno como principais componentes. No teste antioxidante, todos os OEs apresentaram atividade antioxidante, porém, o OE de *C. argyrophylloides* apresentou um maior potencial com IV_{50}de 12,55 µg/mL. No teste de toxicidade com *Artemia* sp., todas as espécies vegetais apresentaram bioatividade. No teste de citotoxicidade em macrófagos AMJ2-11, os OEs de *C. argyrophylloides* e do *C. sonderianus* foram menos tóxicos que a Anfotericina B e os outros OEs testados apresentaram toxicidade semelhante à droga controle. Quanto ao teste leishmanicida, dentre os OEs testados, o OE de *C. nepetaefolius* foi o que apresentou melhor resultado contra *L. amazonensis*, com IC_{50} de 9,87 µg/mL, sendo semelhante à Anfotericina B com IC_{50} de 7,38 µg/mL. Os OEs de *C. nepetaefolius, C. mucronifolius, C. blanchetianus, C. sonderianus e C. sincorensis* apresentaram os melhores resultados contra *L. braziliensis*, com valores de IC_{50} de 9,08 µg/mL, 9,75 µg/mL, 13,04 µg/mL, 13,60 µg/mL e 14,16 µg/mL, respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas entre si. Quanto a *L. infantum chagasi*, todos os OEs apresentaram atividade e não diferiram estatisticamente entre si. Diante desses dados, observamos que todos os OEs testados apresentaram atividades antioxidantes e leishmanicidas, sendo promissores no combate à doenças tropicais e que o OE de *C. nepetaefolius*, em especial, apresentou elevado efeito contra espécies de *Leishmanias* causadoras da leishmaniose tegumentar.

*Palavras chaves:*Atividade leishmanicida. Antioxidante. Constituintes químicos.Óleos essenciais.*Crotons.*

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of leading parasitic diseases research priorities according to the World Health Organization. The urgency for less toxic drugs has lead to the search for new alternative therapies. Essential oils (EOs) of *Croton* species present a wide spectrum of biological activities. In the search for new leishmanicidal agents, the leishmanicidal and antioxidant activity of essential oils from several *Croton* species were evaluated as well as determined chemical compositions and their toxicities. The constituents of EOs were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The analysis of antioxidant capacity was measured by the DPPH method. For in vitro testing against different strains of *Leishmania*, the EOs and amphotericin B as a drug control, were incubated for 24 h at 24 °C and the cell viability was tested by MTT method. The toxicity tests were performed by *Artemia* sp. and macrophages AMJ2-C11. The spathulenol and caryophyllene oxide were the major components found in all EOs studied,with the exception of *C. nepetaefolius*, which presented the methyl eugenol and E-caryophyllene as main components. In antioxidant testing, all EOs showed antioxidant activity, however, the OE *C. argyrophylloides* showed higher potential with IV_{50} 12.55 µg /mL. In toxicity test with *Artemia* sp., all plant species showed bioactivity. In the cytotoxicity test in macrophages AMJ2-11, the EOs and *C. argyrophylloides* and *C. sonderianus* were less toxic than amphotericin B and other EOs tested were similar to control drug toxicity. In the antileishmanial testing, among EOs tested, the EO of *C. nepetaefolius* showed the best result against *L. amazonensis*, with IC_{50} of 9.87 µg/mL amphotericin B is similar to the IC_{50} of 7.38 µg/mL. The EOs of *C. nepetaefolius, C. mucronifolius, C. blanchetianus, C. sonderianus* and *C. sincorensis* showed better results against *L. braziliensis*, with IC_{50} values of 9.08 µg/mL, 9.75 µg /mL, 13.04 µg / mL, 13.60 µg /mL and 14.16 µg/mL, respectively, with no significant statistical difference among themselves. As for *L. infantum chagasi* all EOs presented activity and not statistically different. Considering these data, all EOs tested presented antioxidant and antileishmanial activities, being promising targets to fight tropical diseases and the EO of *C. nepetaefolius*, in particular, showed the highest effect against *Leishmania* species.

Key words: Leishmanicidal activity.Antioxidant.Chemical constituents.Essential oils, *Crotons.*

INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um crescente problema de saúde pública em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano. No Brasil,é considerada uma das endemias de interesse prioritário. Diante disso, a Organização Mundial de Saúde(OMS) tem considerado as leishmanioses como doenças prioritárias em seu programa de controle, estando entre as seis doenças tropicais mais relevantes do mundo (WHO, 2010).

A adoção de diferentes estratégias de controle das leishmanioses no Brasil é recomendada pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde (SUS) devido ao aumento contínuo das afecções causadas por esses parasitas, tanto nas formas tegumentares, quanto na visceral, além das diferentes situações epidemiológicas encontradas, com tendência à urbanização (BRASIL, 2006; COSTA, 2005). Dentre as práticas recomendadas, está a utilização de plantas medicinais na busca de novos tratamentos contra leishmanioses (BRASIL, 2006).

Croton é um grande gênero de Euphorbiaceas, que inclui cerca de 1.300 espécies de árvores, arbustos e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (MONTE *et al.*, 1984), popularmente conhecidos como "marmeleiro" ou "velame".

Várias espécies de *Croton* são utilizadas com finalidades medicinais em diversos lugares do mundo, como para o tratamento de distúrbios estomacais, intestinais e uterinos, pleurisia (BRYANT, 1966), insônia, agitação (PALMER & PITMAN, 1972), analgesia, antitérmico, afrodisíaco, purgativo, emético, soporífero, antibiótico, antiviral, resfriados, tosse, problemas de ouvido e doenças no peito (VON KOENEN , 2001).

Em pesquisas, as propriedades inseticida, acaricida, antifúngica, leishmanicida, antiinflamatória, antinociceptiva, hipoglicêmica, antiúlcera, antiespasmódica, antitumoral e antiestrogênica já foram comprovadas em espécies ou compostos isolados desse gênero de plantas (PONTES *et al.*, 2011;FONTENELLE *et al.*, 2008; MACIEL *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003).

Investigações prévias do gênero Croton têm rendido triterpenóides e pimarane (BLOCK *et al.*, 2004; SALATINO, SALATINO & NEGRI, 2007) , caurano (KUO *et al.*,2007) , labdano, clerodano (GARCIA *et al.*, 2006) e cembrano (PUDHOM *et al.*, 2007) e nas espécies encontradas no Novo Mundo, os diterpenóides , os alcalóides e os isoquinolínicos (CHARRIS *et al.*, 2000).

Neste estudo, as espécies *Croton argyrophylloides, Croton jacobinensis, Croton sonderianus, Croton blanchetianus, Croton nepetefolius, Croton mucronifolius e Croton sincorensis*foram estudadas quanto suas composições químicas, suas atividades frente promastigotas de *Leishmania infantum chagasi, L. braziliensis* e *L. amazonensis*, além de suas toxicidades em Artêmias e macrófagos AMJ2-C11 e suas capacidades antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS

As exsicatas das espécies de *Croton* estudadas foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

As extrações dos OEs foram realizadas através de hidrodestilação, com o uso de aparelho tipo Clevenger. Para a imersão das folhas foi utilizada água destilada, tendo em seguida iniciado o processo de extração do óleo essencial que teve duração de aproximadamente 4 horas. O rendimento dos OEs foi analisado ao final das extrações e em seguida,Os OEs foram recolhidos e armazenados em vidros com tampa e estocados sob refrigeração para posteriores análises.

Análises de cromatografia em fase gasosa com o uso de detector de espectrometria de massas (CG-EM), modelo GCMS qs 5050 da marca SHAIMADZU foram realizadas paracaracterização química dos OEs. Foi utilizado o gás Hélio como gás carreador em uma velocidade linear de 2 mL min^{-1}. A temperatura inicial de 50°C até 280°C a 4°C por minuto. Injetor de 250°C, interface 250°C e detector de 280°C. Em todas as análises foi utilizada coluna capilar de sílica de 30 m de comprimento, 0,25 mm de i.d. e película de 0,25 mm. As identificações foram realizadas por comparação dos dados de cromatografia (índices de retenção) e espectrometria de massas obtidos de padrões, da literatura e de espectrotecas (Willey 275).

O 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi utilizado na determinação da atividade antioxidante, de acordo com a metodologia de YEPEZ *et al.* (2002). Onde, 3,9 mL de uma solução metanólica de radical livre DPPH $6{,}5.10^{-5}$M foi adicionado à um tubo de ensaio, para em seguida ser adicionado 0,1mL de solução metanólica da amostra de óleo essencial testado ao tubo. Realizou-se uma medição após 60 minutos da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm nas concentrações de 10000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 10 e 5 das amostras.

A atividade antioxidante dos OEs testados foi determinada através da sua capacidade de seqüestrar o radical DPPH onde calculou-se o potencial de inibição do DPPH de cada amostra em percentual, usando-se a fórmula: IV%: $\frac{A_{branco} - A_{amostra}}{A_{branco}} x100$

Onde: A_{branco}: absorbância da reação controle e $A_{amostra}$: absorbância da amostra

Para o cálculo do volume da solução de DPPH utilizou-se n° de concentração 3 x n° de amostras x 3,9 mL e a solução de DPPH deixada entre 0,6 e 0,7nm. A leitura foi realizada três vezes com o branco (MeOH) e a solução DPPH na cubeta 2.

As promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (cepa LVHSI17); *Leishmania (L.) amazonensis* (cepa BA336) e *Leishmania (V.) braziliensis* (cepa LTCP393) foram cultivadas em meio Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% urina humana masculina e mantidas

à 26°C para em seguida, serem analisadas sob um microscópio de luz na confirmação da viabilidade dos parasitas.

Para a realização dos testes *in vitro* contra as promastigotas,estas foram adicionadas em placas de 96 poços na concentração de 10^6 cel/poço determinadas após contagem na câmara de Neubauer. Em seguida, as drogas foram colocadas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/ml e a Anfotericina B utilizada como droga controle. As placas foram encubadas por 24 horas a 24°C. Os ensaios foram feitos em duplicatas, e realizada uma réplica de cada ensaio. A viabilidade das células foi testada usando o método colorimétrico MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-brometo de 2,5-difeniltetrazólio (Sigma®). Anteriormente o MTT (5mg/mL) foi dissolvido em PBS e esterilizado por membranas de 0,22µm e adicionado 20µl/poço, por 4 horas a 24°C. Uma solução de 50% SDS à 10% e de 50% álcool isopropílico (100 µL /poço) foi adicionada para lise das células e solubilização dos cristais de formazan durante 15 minutos. A densidade óptica (DO) foi determinada utilizando Multiskan MS (UNISCIENCE) a 595nm.

O ensaio de letalidade contra *Artemia* sp. foi realizado de acordo com adaptação do método proposto por Meyer *et al*. (1982). Ovos de *Artemia* sp. foram incubados em água salina, à temperatura ambiente, por um período de 48 horas em um aquário adaptado com um compartimento escuro e outro claro. Com auxílio de uma fonte de luz, as larvas eclodidas eram atraídas para a luz, recolhidas com uma pipeta de Pasteur e transferidas para um Becker com água salina. Foram preparadas soluções de extração com solventes: metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e água salina, em concentrações que vão de 10.000 a 1 ug/ml. Adicionaram-se em tubos de ensaio 10 larvas contendo 5 mL de cada uma das soluções testadas e o controle, contendo apenas o solvente (DMSO e solução salina). Os ensaios foram realizados em triplicata, o número de larvas mortas medido após 24 horas.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado a partir da metodologia adaptada de Tempone *et al.* (2005). Em que macrófagos de linhagem AMJ2-C11 semeados a uma concentração de $4x10^4$ cel/poço em microplacas de 96 poços e em seguida, incubadas a 37 ° C por período de 24 horas em incubadora umidificada em CO_2 a 5%. Os OEs foram testados à uma concentração de 100 µg/mL e para o controle foi utilizado Anfotericina B. A viabilidade dos macrófagos foi determinada através do ensaio de MTT, tal como já descrito.

Uma curva de regressão linear foi utilizada para calcular os valores de IC_{50} da ação leishmanicida dos OEs e os percentuais obtidos após os tratamentos, apresentados por média ± desvio padrão e analisados pelo teste Qui-quadrado no intervalo de confiança de 95%. Os dados da atividade leishmanicida foram testados quanto ao atendimento das exigências para a realização da análise de variância e confirmados pelo teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade de variâncias

entre os tratamentos foi confirmada pelo teste de Bartlett. A ANOVA foi então realizada com auxílio do procedimento GLM do Programa SAS (2002) e o teste de Tukey foi aplicado para a comparação das médias. Para o cálculo da CL_{50} em *Artemia* sp., foi usado o Probit análise do software SPSS Statistics 17.0 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição química dos OEs analisados por CG/EM. No OE das folhas de *C. argyrophylloides*, foram identificados 5 compostos, correspondendo à 100 % do total do óleo. No OE das folhas de *C. jacobinensis*, foram identificados 4 compostos, correspondendo à 96,73 % do total do óleo. No OE das folhas de *C. sonderianus*, foram identificados 11 compostos, correspondendo à 85,81 % do total do óleo. No OE das folhas de *C. nepetaefolius*, foram identificados 7 compostos, correspondendo à 82,83 % do total do óleo. No OE das folhas de *C. mucronifolius*, foram identificados 3 compostos, correspondendo à 65,99 % do total do óleo. No OE das folhas de *C. blanchetianus*, foram identificados 6 compostos, correspondendo à 83,79 % do total do óleo. No OE das folhas de *C. sincorensis*, foram identificados 10 compostos, correspondendo à 86,16 % do total do óleo.

O espatulenol e o óxido de cariofileno (Fig. 1) foram os compostos encontrados em maior quantidade nos OEs de C. *argyrophylloides*,*C. jacobinensis*, *C. sonderianus*, e *C. blanchetianus* e encontrados em grande quantidade nos OEs de *C. mucronifolius* e *C. sincorensis*. Apenas o *C. nepetaefolius* não apresentou esses dois componentes em sua composição. O espatulenol foi encontrado nas concentrações de 42,54%, 15,41%, 18,61%, 7,56%, 30,33% e 9,58% nos OEs de *C. argyrophylloides*, *C. jacobinensis*, *C. sonderianus*, *C. mucronifolius*, *C. blanchetianus* e *C. sincorensis*, respectivamente. O óxido de cariofileno foi encontrado nas concentrações de 40,95%, 68,62%, 44,28%, 47,28%, 37,74% e 21,76% nos OEs de *C. argyrophylloides*, *C. jacobinensis*,*C. sonderianus*, *C. mucronifolius*, *C. blanchetianus* e *C. sincorensis*, respectivamente. Os componentes majoritários do OE de *C. nepetaefolius* foram o metil-eugenol e o E-cariofileno (Fig. 1.), encontrados nas concentrações de 33,89% e 21,23%, respectivamente.

A produção dos metabólitos secundários nas plantas é susceptível aosfatores genéticos, morfológicos, umidade relativa, duração de exposição ao sol, regime de ventos,grau de hidratação do terreno, variação geográfica, estágio do ciclo vegetativo da planta, técnicas de cultivo, método de extração, e variações sazonais, daí a grande importância da caracterizaçãoquímica das espécies (SILVA, 2007; SIMÕES *et al.*, 1999).

De acordo com o banco de dados do Curso de Química da Universidade Estadual do Ceará, entre os principais componentes do OE de *C. sonderianus*, estão o espatulenol com 18,32% e o óxido de cariofileno com 8,54%, o que corroboram com os resultados obtidos no

presente estudo para o OE destaespécie, que apresentou o espatulenol com 18,61% e óxido de cariofileno com 44,28% do total doóleo.

Segundo Morais (2007), os principais componentes encontrados em seus estudos com o OE de *C. argyrophylloides* foram o α- pineno, E- cariofileno, 1,8-cineol, α-terpineol, sabineno e p-cimeno, o que diferencia dos resultados encontrados no presente estudo para essa espécie de *Croton*, em que foram encontrados o óxido de cariofileno e espatulenol como componentes majoritários. Esses componentes, encontrados nos OEsdas espécies estudadas, com exceção do OE de *C. nepetaefolius*, podem ser responsáveis por suas bioatividades. Em estudo anterior, verificou-se que o OE da espécie *Ottonia martiana* miq.(Piperaceae), rico em espatulenol e óxido de cariofileno, apresentou atividade antimicrobiana frenteà bactérias Gram-positivas (CUNICO *et al.*, 2007). Ziaei *et al.* (2011) identificaram uma possívelatividade de espatulenol como um dos compostos imunomoduladores presentes na *Salvia mirzayanii*. Esse composto mostrou a capacidade para inibir a proliferação de linfócitos e de induzira apoptose nestas células, possivelmente através de uma via independente de caspase - 3.

O OE de *Herba artemisia*, rico em óxido de cariofileno (19,1%) e espatulenol (9,9%), apresentou forte atividade antioxidante, através dos métodos de DPPH e de FRAP, com valores de 25-400 µg/mL (JIANG *et al.*, 2012). O óleo essencial de *Cinnamomum osmophloeum* contendo 15,7 % de espatulenol foi um inibidor eficaz para a IL - 1β e IL - 6, mas não para a produção de TNF - α, sugerindo a sua bioatividade anti-inflamatória *in vitro* (CHAO *et al.*, 2005).

O óleo essencial obtido das flores de *Aster lanceolatus*, de componente majoritário óxido de cariofileno, demonstrou potencial alelopático, sendo capaz de inibir a germinação ecrescimento de *Lactuca sativa* (DIAS *et al.*, 2009). O óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet*, rico em óxido de cariofileno, apresentou atividade biológica cardiovascular em ratos espontaneamente hipertensos, através da diminuição da pressão arterial média dos animais(BARCELOS *et al.*, 2010). Um estudo com fração de OE de folhas de *Alpinia zerumbet*, rico emóxido de cariofileno, detectou pronunciada inibição deste óleo sobre *Cryptococcus neoformans*, demonstrando potencial antimicrobiano (VICTÓRIO *et al.*, 2009).

O metil-eugenol, componente majoritário encontrado no OE de *C. nepetaefolius* (33,89%),também foi o componente majoritário encontrado por Morais (2007). Os outros principais constituintes encontrados nesse estudo para esta espécie de planta foram o E-cariofileno (21,23%) eo 1,8-cineol (10,44%). Outro estudo também encontrou o metil-eugenol (10,3%), o E-cariofileno (17,2%) e o 1,8-cineol (31,5%) como componentes majoritários do OE de *C. nepetaefolius*,reafirmando sua constituição química e sugerindo serem esses compostos responsáveis por suas atividades, uma vez que no mesmo estudo, também verificaram seu efeito antinociceptivo em ratos (ABDON *et al.*, 2002).

Estudos anteriores já demonstraram diversas atividades biológicas do metil-eugenol, como antibacteriana (FRANCHOMME & PÉNOËL, 1995), analgésica (SELL & CARLINI, 1976), anticonvulsivante, além de induzi efeitos de hipotermia (DALLMEIER & CARLINI, 1981), relaxante e antiespasmódica (LIMA, 2000). Mendonça (2006) analisou os efeitos desse composto em nervos ciáticos de ratos e verificou um bloqueio na excitabilidade nervosa. Quanto ao E-cariofileno, um estudo já demonstrou sua atividade anti-espasmódica no músculo liso traqueal de rato (PINHO-DA-SILVA, 2010). Outras pesquisas já evidenciaram os efeitos farmacológicos do E-cariofileno como promotor do aumento da atividade de células natural Killer (STANDEN, CONNELLAN & LEACH, 2006), que estão relacionadas com o aumento da sensibilidade à infecções (WHITESIDE & HERBERMAN, 1994), antibacteriano e antifúngico (MEVY *et al.*, 2007), antioxidante em diluições de éter etílico (SOUZA *et al.*, 2006), além de apresentar baixa toxicidade em camundongos (MENEZES *et al.*, 2007).

Para avaliar a atividade antioxidante foi usado o DPPH que apresenta coloração violeta e na presença de doadores de hidrogênio (antioxidantes seqüestrantes de radicais livres) se reduz tornando-se amarelo (GAMA, 2008). Os valores de Índice de Varredura ($IV_{50)}$ encontrados dos OEs estudados mostram na Tabela 2. que todas as espécies de *Croton* estudadas apresentaram atividade antioxidante.

As espécies que mostraram maior potencial antioxidante foram *C. argyrophylloides, C. sonderianus* e *C. jacobinensis* com valores de IV_{50}de 12,55 µg/mL, 16,76 µg/mL e 22,11 µg/mL, respectivamente. Das espécies estudadas com menor potencial apresentado, estão o *C. sincorensis* e o *C. blanchetianus,* comIV_{50}de 140,59 e 132,56, respectivamente.

O valor de IV_{50} encontrado nesse estudo para o OE de *C. argyrophylloides* é semelhante aos valores encontrados por Morais (2007) de 12,24 µg/mL no OE coletado às 6 horas da manhã e de 26,99 µg/mL no OE coletado às 13 horas da tarde. O valor de IV_{50} encontrado nesse estudo para o OE de *C. nepetaefolius* é semelhante à um dos valores encontrados por Morais (2007) de 30,05 µg/mL no OE coletado às 13 horas. Diante disso, é ratificado o elevado potencial antioxidante destas duas espécies de *Croton*. Ao que se sabe, não há na literatura dados sobre a atividade antioxidante das outras espécies de *Croton* verificadas no presente estudo, sendo, portanto, dados inéditos sobre serem potenciais doadores de elétrons.

O excesso de estresse oxidativo que origina a deterioração orgânica é atenuado ou até prevenido por terapias baseadas em antioxidantes. Dessa forma, as terapias antioxidantes utilizadas em um grande número de doenças relacionadas com a geração de radicais livres, como câncer, envelhecimento, aterosclerose, isquemia, inflamações e doenças neuro-degenerativas parecem ser promissoras (GUERRA, 2001). No que diz respeito às leishmanioses, um dos possíveis mecanismos de ação dos antimoniais pentavalentes, empregados como medicamentos padrões no tratamento da

doença, está relacionado com a Glutationa, enzima antioxidante presente no organismo que contém o grupo sulfidrila e é o tiol predominante no meio intracelular, que através de sua atuação na redução desses antimoniais, propiciam a transformação dessas drogas para suas formas trivalentes, que são as formas ativas contra os parasitas (DEMICHELI & FRÉZARD, 2005).

Um bioensaio com *Artemia* sp. foi realizado para verificação das possíveis toxicidades dos OEs de *Croton* estudados, avaliando com isso, o potencial de bioatividade de um composto. A Tabela 3 mostra os resultados dos OEs de *Croton* quanto suas letalidades em relação à *Artemia* sp., em concentrações de 1000 à 1 µg/mL. Pode-se verificar que todas as espécies vegetais apresentaram bioatividade.

A espécie de planta que apresentou a maior bioatividade frente à *Artemia* sp. foi o *C. jacobinensis,*com LC_{50} de 0,426 µg/mL, estatisticamente superior aos demais *Crotons* estudados. Em contrapartida, Ramos *et al.* (2009) verificou em seus estudos que extratos hexânico e o etanólico das folhas de *C. jacobinensis* apresentou baixa toxicidade contra *Artemia sp*., o que pode ser explicado pela ausência de determinados compostos voláteis com bioatividade que estão presentes em óleos essenciais. As espécies *C. blanchetianus, C. sonderianus* e *C. argyrophylloides* não apresentaram diferenças estatísticas quanto às suas bioatividades, apresentando valores de LC_{50} de 6, 93 µg/mL, 10,28 µg/mL e 12, 78 µg/mL, respectivamente. As espécies *C. nepetaefolius, C. mucronifolius* e *C. sincorensis* foram as que apresentaram menores bioatividades frente à *Artemia* sp., com valores deLC_{50} de 40,52 µg/mL, 24,68 µg/mL e 23, 73 µg/mL, respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas significativas entre si.

A Figura 2. mostra os resultados do teste de citotoxicidade em células monocíticas da linhagem AMJ2-C11 com os OEs das espécies de *Croton* testadas. Pode-se verificar que na concentração de 100 µL/mL, houve semelhança entre os resultados da droga controle com os OEs de todos os *Crotons* estudados, com exceção do *C. argyrophylloides* e do *C. sonderianus,* cujos percentuais de toxicidade foram bem menores que o da droga controle.

No teste de citotoxicidade, os OEs do *C.argyrophylloides* e do *C.sonderianus* mostraram as menores toxicidades frente à macrófagos à uma concentração de 100 µL/mL, apresentando seus percentuais de 26,72% e 35,34%, respectivamente, bem abaixo que o da droga controle Anfotericina B com 47,7%. Estudo realizado sobre toxicidade aguda com a administração oral de OE de *C. sonderianus* em camundongos, demonstrou que nas doses de 1, 2 e 3 g/kg, não apresentou alterações comportamentais, não alterou os padrões fisiológicos e nem causou morte dos animais, sugerindo uma baixa ou inexistente toxicidade, assim como a utilização promissora do OE desta espécie (AMARAL, 2004). O OE de *C. nepetaefolius* à 100 µL/mL apresentou toxicidade em macrófagos de 44,17%,semelhante estatisticamente à droga padrão com 47,70% na mesma concentração, significando um resultado aceitável do ponto de vista orgânico. Magalhães (2002),

demonstrou uma baixa toxicidadeaguda do OE desta espécie de planta em camundongos, com DL_{50} acima de 3g/kg. Esses dadoscorroboram com o baixo potencial tóxico desta espécie na sua utilização popular contra doenças. Os OEs das outras espécies de *Croton* estudadas também apresentaram resultadossemelhantes ao da Anfotericina B quanto suas toxicidades em macrófagos. Diante disso, verifica-seo potencial terapêutico dos OEs dos *Croton*, uma vez que além das baixas toxicidades apresentadasainda possuem potencial antioxidante, tendo utilizações promissoras como adjuvantes emtratamentos de diversas doenças.

A Tabela 4. mostra os resultados dos OEs das espécies de *Croton* em estudo frente à promastigotas de *L. i. chagasi, L. braziliensis* e *L. amazonensis*, além da comparação estatística entre os tratamentos. Os valores da ação dos OEs sobre as cepas de *Leishmania* apresentaram distribuição normal (confirmada por teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias entre os tratamentos (confirmada poro teste de Bartlett). Todos os OEs estudados neste trabalho apresentaram atividade contra as 3 espécies de *Leishmania*.

Em relação à *L. amazonensis*, o OE de *C. nepetaefolius* mostrou-se o mais ativo e estatisticamente semelhante à Anfotericina B contra o parasita, com IC_{50} de 9,87 µg/mL e 7,38 µg/mL, respectivamente, seguido do OE de *C. argyrophylloides* com IC_{50} de 15,50 µg/mL. Os OEs de *C. jacobinensis, C. mucronifolius* e *C. sincorensis* não apresentaram diferenças estatísticas em seus tratamentos, com IC_{50} de 23,79 µg/mL, 25,96 µg/mL e 27,03 µg/mL, respectivamente. Os OEs de *C. blanchetianus* e *C. sonderianus* apresentaram-se menos ativos contra esta espécie de parasita, com IC_{50} de 44,07 µg/mL e 42, 48 µg/mL.

Em relação à *L. braziliensis*, os OEs de *C. mucronifolius, C. nepetaefolius, C. blanchetianus, C. sonderianus*e *C. sincorensis* mostraram os melhores resultados, com IC_{50} de 9,08 µg/mL, 9,75 µg/mL, 13,04 µg/mL, 13,60 µg/mL e 14,16 µg/mL, respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas entre si. Os OEs de *C. blanchetianus, C. sincorensis* e *C. sonderianus* também não apresentaram diferenças estatísticas entre si contra a *L. braziliensis*. O OE de *C. jacobinensis,* apresentou-se o menos ativo contra esta espécie de parasita, com IC_{50} de 22,06 µg/mL.

Em relação à *L.i. chagasi,* todos os OEs de *Croton* estudados mostraram atividade leishmanicida e não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

O OE de *C. argyrophylloides* mostrou-se igualmente ativo para as 3 espécies de *Leishmania*, não havendo diferença estatística significativa entre si, assim como o OE de *C. jacobinensis,* que também não mostrou diferença significativa entre as espécies de *Leishmania*. O OE de *C. blanchetianus* apresentou semelhante atividade leishmanicida para *L. braziliensis* e *L. i. chagasi*, superior ao tratamento contra *L. amazonensis*. Para o OE de *C. nepetaefolius*, verificou-se maior atividade leishmanicida entre os OEs tanto para *L. amazonensis* quanto para *L. braziliensis*,

não havendo diferença estatística para estes. Em relação à *L. i. chagasi*, esse óleo apresentou uma menor atividade.O OE de *C. mucronifolius* apresentou-se mais ativo contra *L. braziliensis*, seguido de *L. i. chagasi* e em seguida de *L. amazonensis*. O OE de *C. sincorensis* mostrou maior atividade para *L. braziliensis* e *L. i. chagasi*, não havendo diferença estatística para estes. Em relação à *L. amazonensis*, esse óleo apresentou uma menor atividade, assim como o OE de *C. sonderianus*, que apresentou maior atividade contra *L. braziliensis* e *L. i. chagasi*, não havendo diferença estatística para estes e uma menor atividade para *L. amazonensis*.Com exceção do OE de *C. nepetaefolius* sobre *L. amazonensis*, que apresentou resultado estatisticamente semelhante, a Anfotericina B, utilizada como droga padrão, mostrou-se mais ativa do que todos os OEs estudados para as três espécies de parasitas.

Soares *et al.* (2013) evidenciaram o efeito dose-dependente do composto cariofileno isolado do óleo de *Copaifera spp*. frente à amastigotas de *L. amazonensis* com LC_{50} de 1,3 μg/mL. Outro estudo evidenciou o efeito leishmanicida do cariofileno em promastigotas de *L.braziliensis* e verificou que na concentração de 50 µg/mL, o composto foi capaz de eliminar 100% dos parasitas (LEITE *et al.*, 2013). O E-cariofileno é apresentado na forma trans do cariofileno e foi o composto encontrado em maior quantidade no OE de *C. nepetaefolius*, que apresentou uma maior atividade para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* do que para *L. i. chagasi*, verificando com isso, que esse composto possivelmente é responsável pela atividade leishmanicida do OE de *C. nepetaefolius* frente às espécies de leishmanias causadoras da leishmaniose tegumentar. Além disso, foi a espécie de *Croton* estudada que apresentou maior atividade leishmanicida contra *L. amazonensis*, semelhante à droga controle, e contra *L. braziliensis* também foi a espécie com maior atividade, juntamente como *C. mucronifolius,C. blanchetianus, C. sonderianus*e *C. sincorensis*. Diante disso, é possível ratificar o grande potencial terapêutico do OE de *C. nepetaefolius* e seu componente majoritário E-cariofileno em tratamentos contra leishmaniose tegumentar.

Carmo *et al.* (2012) demonstraram o efeito do OE de *Piper duckei*, que tem como componente majoritário o E-cariofileno,contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, promastigotas de *L. guyanensis*,assim como do composto majoritário isolado frente àpromastigotas de *L. amazonensis*,que apresentou alta eficácia e melhor resultado quando comparado ao OE da planta, reafirmando assim, a alta atividade do E-cariofileno contra parasitas causadores da leishmaniose tegumentar.

Ueda-Nakamura *et al.* (2006) demonstraram a atividade leishmanicida do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum* e de seu principal constituinte, eugenol, sobre *L. amazonensis* em ensaios *in vitro*. O metil-eugenol é um éter metilado do eugenol e foi um dos principais componentes encontrados no OE de *C. nepetaefolius*, cuja atividade leishmanicida contra *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foi elevada.

Os OEs das espécies de *Croton* estudadas apresentam muitas atividades biológicas já demonstradas em estudos e por tradições de medicinas populares, como antiinflamatório e analgésico (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007), fungicida (FONTENELE *et al.*, 2008), antioxidante (MORAIS *et al.*, 2006), acaricida (NEVES & CAMARA, 2011), entre outras.Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura que comprovem os efeitos dos OEs de *C. argyrophylloides, C. jacobinensis, C. sonderianus, C. blanchetianus, C. mucronifolius* e *C. sincorensis* e nem dos seus principais componentes, óxido de cariofileno e espatulenol, quanto suas atividades leishmanicidas para qualquer uma das três espécies de parasitas estudadas aqui. Além disso, também não foram encontrados relatos da atividade leishmanicida do OE de *C. nepetaefolius,* apenas dos seus principais constituintes e/ou derivados, E-cariofileno e eugenol frente à Leishmanias causadoras da leishmaniose tegumentar. Diante disso, esse estudo torna-se inovador na pesquisa da atividade leishmanicida com os OEs de *C. argyrophylloides, C. jacobinensis, C. sonderianus, C. blanchetianus, C. mucronifolius, C. sincorensis* e *C. nepetaefolius* e seus resultados apresentados são inéditos na literatura científica, além de poder fundamentar pesquisas futuras com OEs dessas espécies de plantas e de seus componentes majoritários isolados na busca promissora de tratamentos alternativos para leishmanioses.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

BIBLIOGRAFIAS

ABDON, A.P.V., LEAL-CARDOSO, J.H., COELHO-DE-SOUZA, A.N., MORAIS, S.M.,SANTOS, C.F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice.*Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 1215-1219, 2002.

ALBUQUERQUE, U. P., MEDIEROS, P. M., ALMEIDA, A. L. S., MONTEIRO, J. M., LINS NETO, E. M. F., MELO, J. G. de, SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal Ethnopharmacology*, v.114, p. 325–324, 2007.

BARCELOS, F.F., OLIVEIRA, M.L., GIOVANINNI, N.P.B., LINS, T.P., FILOMENO, C.A., SCHNEIDER, S.Z., PINTO, V.D., ENDRINGER, D.C., ANDRADE, T.U. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M.Sm. em ratos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 12, n. 1, p. 48, 2010.

BLOCK, S., BACCELLI, C., TINANT, B., MEERVELT, L.C., ROZENBERG, R., JIWAN, H.J., LLABRES, G., PAUW-GILLET, D.M., QUETIB-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus, Phytochemistry,* v. 65, p. 1165–117, 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2006. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos* / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRYANT, A.T., Zulu Medicine and Medicine-Men, *Struik*, 1966.

CARMO, D.F.M., AMARAL, A.C.F., MACHADO, G.C., LEON, L.L., SILVA, J.R.A. Chemical and Biological Analyses of the Essential Oils and Main Constituents of *Piper* Species. *Molecules*, v.17, p. 1819-1829, 2012.

CHAO, L.K., HUA, K.F., HSU, H.Y., CHENG, S.S., LIU, J.Y., CHANG, S.T. Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,v. 53,p. 7274–7278, 2005.

CHARRIS, J., DOMINGUEZ, J., DE LA ROSA, C., CARO, C. Amuronine from the leaves of *Croton flavens* L. (Euphorbiaceae), *Biochemistry Systematics and Ecology,* v. 28, p. 795–797, 2000.

COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia,* v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

CUNICO, M.M.,, LOPES, A.R., CÔCCO, L.C., YAMAMOTO, C.I., PLOCHARSKI, R.C.B., MIGUEL, M.D.G., JUNIOR, A., AUER, C.G., MIGUEL, O.G. Phytochemical and antibacterial evaluation of essential oils from *Ottonia martiana* miq. (Piperaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society,* v .18, p. 184-188, 2007.

DALLMEIER, K., CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsanteffects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. *Pharmacology,* v. 22, n. 2, p. 113–127, 1981.

DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos à base de Antimônio usados no tratamento de Leishmaniose e Esquistossomose. *Cadernos temáticos de química nova na escola,* julho, n. 6, 2005.

DIAS, J.F.G., MIGUEL, O.G., MIGUEL, M.D. Composition of essential oil and allelopathic activity of aromatic water of *Aster lanceolatus* Willd: (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. .45, p. 469-474, 2009.

FONTENELLE, R.O.S, MORAIS, S. M, BRITO, E. H. S, BRILHANTE, R. S. N, CORDEIRO, R. A, NASCIMENTO, N. R. F, KERNTOPF, M. R, SIDRIM, J. J. C, ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, n. 5, p.1383- 1388, 2008.

FRANCHOME, P., PÉNOËL, D. Phénols méthyl-éther-oxydes. In: JOLLOIS, R., editor. L´aromathérapie exactment. *Encyclopédie de L´utilisationThérapeutique des Huiles Essenciales.Limoges*, France, p. 170-176, 1995.

GAMA, J. J. T. Efeito do processo de obtenção do catchup sobre seus compostos antioxidantes, capacidade sequestrante do radical DPPH e cor. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2008.

GARCIA, A., RAMIREZ-APAN, T., COGORDAN, J.A., DELGADO, G. Absolute configuration assignments by experimental and theoretical approaches of *ent*-labdane and *cis*-*ent*-clerodane-type diterpenes isolated from *Croton glabellus*, *Canadian Journal of Chemistry*, v. 84, p. 1593–1602, 2006.

GUERRA, P. M., NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. *et al.Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed., p.15. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2001.

JIANG, S., LAI, P., LI, J., WANG, G. Antioxidant Activities and Essential Oil Composition of *Herba artemisiae scopariae* from China. *Journal of Oleo Science*, v. 61, n. 5, p. 291 -295, 2012.

KUO, P.C., SHEN, Y.C., YANG, M.L., WANG, S.H., THANG, T.D., DUNG, W.X., CHIANG, P.C. LEE, K.H., LEE, E.J., WU, T.S. Croton kinins A and B and related diterpenoids from *Croton tonkinensis* as anti-inflammatory and anti-tumor agents, *Journal of Naturals Products*, v. 70, p. 1906–1909, 2007.

LEITE, N.F., SOBRAL-SOUZA, C.E., ALBUQUERQUE, R.S., BRITO, D.I.V., LAVOR, A.K.L.S., ALENCAR, L.B.B., TINTINO, S.R., FERREIRA, J.V.A., FIGUEREDO, F.G., LIMA, L.F., CUNHA, F.A.B., PINHO, A.I., COUTINHO, H.D.M. Actividad antiparasitaria *in*

vitro citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania braziliensis. Revista Cubana de Plantas Medicinales,* v. 18, n. 4, 2013.

LIMA, C. C., CRIDDLE, D. N., COELHO-DE-SOUZA, A. N., MONTE, F. J. Q., JAFFAR, M.,LEAL-CARDOSO, J. H. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pigisolated ileum. *Planta Medica*, v. 66, n. 5, p. 408-411, 2000..

MACIEL, M. A. M, PINTO, A. C, ARRUDA, A. C, PAMPLONA, S. G. S. R, VANDERLINDE, F. A, LAPA, A. J, ECHEVARRIA, A, GRYNBERG, N. F, COLUS, I. M. S, FARIAS, R. A. F, COSTA, A. M. L, RAO, V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara. Journal of Ethnopharmacology,* v.70, p.41 – 55, 2000.

MAGALHÃES, A. V., MORAES, M. A. P., RAICK, N. A., LLANOS-CUENTAS, E. A., COSTA, J. M. L., CUBA, C. C., MARSDEN, P. D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, p. 253-262, 1986.

MENEZES, I.A.C., MARQUES, M.S., SANTOS, T.C., DIAS, K.S., SILVA, A.B.L., MELLO,I.C.M., LISBOA, A.C.C.D., ALVES, P.B., CAVALCANTI, S.C.H., MARÇAL, R.M.M.,ANTONIOLLI, A.R.A., Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of Hyptisfruticosa in mice. *Fitoterapia*, v. 78 p. 192-195, 2007.

MEVY, J.P., BESSIERE, J.M., DHERBOMEZ, M., MILLOGO, J. VIANO, J. Chemicalcomposition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri*Moldenke.*Food Chemistry*, v. 101 p. 682–685, 2007.

MEYER, B.N., FERRIGINI, N.R., PUTNAN, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica,* v. 45, p. 31-34.

MONTE, F. J. Q., ANDRADE, C. H. S., CRAVEIRO, A. A., BRAZ-FILHO,New Tetracyclic Diterpenes from *Croton argyrophylloides*.*Journal Natural of Products*,v.47, p.55–58, 1984.

MORAIS, S.M, CATUNDA-JÚNIOR, F.E.A, SILVA, A.R.A, MARTINS-NETO, J.S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. *Química Nova*, v.29, n.5, p. 907–910, 2006.

MORAIS, S.M. Antioxidantes Naturais. In: MORAIS, S.M & BRAZ FILHO, R. *Produtos Naturais. Estudos Químicos e Biológicos.* Fortaleza: EdUEE, 240p, 2007.

NEVES, I. A, CAMARA, C. A. Acaricidal activity against Tetranychus urticae and essential oil composition of four Croton species from Caatinga biome in northeastern Brazil. *Naturals Products Community*, v.6, n. 6, p.893-899, 2011.

PALMER, E., PITMAN, N. Trees of Southern Africa, *A Balkema*, v. 2A, 1972.

PONTES, W. J. T, DE OLIVEIRA, J. C. G, DA CÂMARA, C. A. G, DE ASSIS, C. P. O, DE OLIVEIRA, J. V, JÚNIOR, M. G. C. G, BARROS, R. Effects of the Ethanol Extracts of Leaves and Branches from Four Species of the Genus *Croton* on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *BioAssay*, v. 6, n. 3, 2011.

PINHO-DA-SILVA, L. Ação antiespasmódica do trans-cariofileno e o bloqueio de canais para Ca2+em músculo liso traqueal de rato. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 95p., 2010.

PUDHOM, K., VILAIVAN, T., NGAMROJANAVANICH, N., DECHANGVIPART, S., SOMMIT, D., PETSOM, A., ROENGSUMRAN, S. Furano-cembranoids from the stem bark of *Croton oblongifolius. Journal of Naturals Products,* v. 70, p. 659–661, 207.

ROSA, M. D. S., MENDONÇA, R. R., BIZZO, H. R., RODRIGUES, I. D., SOARES, M. A., SOUTO PADRON, T., ALVIANO, C. S., LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* v. 47, p.1895-1901, 2003.

SALATINO, A., SALATINO, M. L. F., NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society,* v.18, n. 1, p.11–33, 2007.

SILVA, M.G.V. In: MORAIS, S.M., BRAZ-FILHO, R. *Produtos Naturais. Estudos químicos e biológicos.* Fortaleza, Ed. UECE, p. 91-101, 2007.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 2. Ed, Florianópolis, Porto Alegre. Ed. Da UFRGS, 821p, 1999.

SELL, A. B., CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives.*Pharmacology*, v. 14, n. 4, p. 367-377, 1976.

SOARES, D.C., PORTELLA, N.A., RAMOS, M.F.S., SIANI, A.C., SARAIVA, E. *Trans-β*-Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (*Copaifera spp*.).*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 13p. v. 2013.

SOUZA, T.J.T., APEL, M.A., BORDIGNON, S.A.L., MATZENBACHER, N.I., ZUANAZZIJ.A.S., HENRIQUES, A.T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil deEupatorium ivifolium L. var hirsutum e Eupatorium inulifolium HBK. In: Reunião Anual daSociedade Brasileira de Química, 29. 2006, Águas de Lindóia. Anais da 29ª Reunião Anual daSociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia: São Paulo, 2006. Disponível em: CD-ROM.

STANDEN, M.D., CONNELLAN, P.A., LEACH, D.N. Natural killer cell activity and lymphocyteactivation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components in vitro.International *Journal of Aromatherapy*, v. 16 p. 133–139, 2006.

TEMPONE, A.G., BORBOREMA, S.E.T., ANDRADE, H.F., GUALDA, N.C.A., YOGI, A., CARVALHO, C.S., BACHIEGA, D., LUPO, F.N., BONOTTO, S.V., FISCHER, D.C.H., 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. *Phytomedicine*, 12, 382-390.

UEDA-NAKAMURA, T., MENDONÇA-FILHO, R.R., MORGADO-DIAZ, J.A., MAZA, P. K., FILHO, B. P. D., CORTEZ, D. A.G., ALVIANO, D. S., ROSA, M. S. S., LOPES, A. H. C. S., ALVIANO. C. S., NAKAMURA C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*. v. 55, n.2, p. 99 – 105, 2006.

VICTÓRIO, C.P., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S., LAGE, C.L.S. Chemical composition of the fractions of leaf oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. and antimicrobial activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 697-701, 2009.

VON KOENEN, E. Medicinal, Poisonous and Edible Plants in Namibia Kluas Hess Publishers, *Windhoek and Göttingen*, 2001.

ZIAEI, A., RAMEZANI, M., WRIGHT, L., PAETZ, C., SCHNEIDER, B., AMIRGHOFRAN, Z. Identification of Spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the Immunomodulatory effects.*Phytotherapy Research*, v. 25, n. 4, p. 557-562, 2011.

WHITESIDE, T.L,, HERBERMAN, R.B, Role of human natural killer cells in health and disease.*Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 1 p. 125–33, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Division of control of tropical diseases, Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden magnitude/ en/index.html. (Acesso: Junho, 2013).

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LOPEZ, S.; BOLANOS, G. 2002. Producing antioxidant fractions from herbaceuos matrices by supercriticalfluid extraction. Fluid Phase Equilibra, 254, 879-884.

TABELAS

Tabela 1. Componentes encontrados nos OEs de *Crotons* pelo método de Cromatografia gasosa e Espectrofotometria de massas, com seus respectivos Índice Kovat e teores em cada óleo.

Componentes	Índice Kovat (KI)	*C. arg* %	*C. jac* %	*C. son* %	*C. nep* %	*C. muc* %	*C. bla* %	*C. sin* %
β-pinene	**979**	-	-	-	-	-	-	3,09
1,8-cineol	**1031**	-	-	-	10,44	11,15	-	5,15
α- terpineol	**1189**	-	-	-	3,58	-	-	-
3,5-dimetoxitolueno	**1264**	-	-	-	5,74	-	-	-
α- copaene	**1376**	-	-	1,58	-	-	-	-
β- elemene	**1390**	7,88	-	4,62	-	-	2,32	-
Metil-eugenol	**1403**	-	-	-	33,89	-	-	-
E- cariofileno	**1419**	-	-	4,59	21,23	-	-	-
Aromadendrene	**1441**	-	-	3,01	-	-	3,86	-
α-humulene	**1454**	-	-	1,61	2,14	-	-	-
Allo aromadendrene	**1460**	3,8	-	2,04	-	-	-	-
α-muurolene	**1479**	-	-	1,62	-	-	-	-
β-selinene	**1490**	-	-	2,85	-	-	-	-
α- selinene	**1498**	-	-	1	-	-	4,84	-
Hedicariol	**1548**	-	-	-	-	-	-	7
Germaceno B	**1561**	-	7,61	-	5,81	-	-	-
Espatulenol	**1578**	42,54	15,41	18,61	-	7,56	30,33	9,58
Óxido de cariofileno	**1583**	40,95	68,62	44,28	-	47,28	37,74	21,76
Globulol	**1590**	-	-	-	-	-	-	6,36
Viridiflorol	**1592**	-	-	-	-	-	-	5,46
Epóxido de humulene II	**1608**	-	-	-	-	-	4,7	5,63
10-epi-ϒ-eudesmol	**1623**	-	-	-	-	-	-	4,71
β-eudesmol	**1650**	-	-	-	-	-	-	17,42
Epóxido de aromadendrene	**1641**	4,83	5,09	-	-	-	-	-

Abreviações/ especies: C. arg.= C. argyrophylloides, C. jac.= C. jacobinensis, C. son.= C. sonderianus, C. nep.= C. nepetaefolius, C. muc.= C. mucronifolius, C. bla.= C. blanchetianus, C. sin.= C. sincorensis.

Tabela 2. Atividade antioxidante de OEs de *Croton*s através do método de DPPH.

Óleo essencial/ Espécie vegetal	IV_{50} (µg/mL)	desvio padrão
Croton argyrophylloides	12,55	± 0,43
Croton jacobinensis	22,11	± 3,24
Croton sonderianus	16,76	± 2,51
Croton nepetaefolius	24,96	± 6,87
Croton mucronifolius	69,73	± 15,72
Croton blanchetianus	132,56	± 17,36
Croton sincorensis	140,59	± 28,98

*Índice de varredura que neutraliza o radical DPPH

Tab. 3. Citotoxicidade dos OEs de Crotons frente à *Artemia* sp.

Óleo essencial / Espécie vegetal	% letalidade / Concentração				LC_{50}* µg/mL (intervalo de confiança)
	1000 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	
C. argyrophylloides	100	96,66	26,66	6,66	$12,78^{a}$ (7,8 – 21,34)
C. jacobinensis	100	100	80	73,33	$0,426^{b}$ (0,023 – 1,287)
C. sonderianus	100	100	43,33	0,03	$10,28^{a}$ (6,61 - 16,39)
C. nepetaefolius	100	83,33	6,66	0,0	$40,52^{c}$ (26,48 – 61,08)
C. mucronifolius	100	60	16,66	0,0	$24,68^{c}$ (16,37 – 37,76)
C. sincorensis	100	100	6,66	0,0	$23,73^{c}$ (16,11 – 55,53)
C. blanchetianus	100	100	50	13,33	$6,93^{a}$ (4,13 – 11,68)

LC_{50}*: Concentração capaz de matar 50% do microorganismo em questão.

Tabela 4. Atividade leishmanicida de OEs de *Crotons*sobre as espécies *Leishmania (L.) chagasi, Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis.*

OEs/ espécies	IC_{50} (%)		
	L. amazonensis	***L. braziliensis***	***L. i. chagasi***
C. argyrophylloides	15,50 ± 2,48 A*c**	16,71 ± 1,35 Ab	16,41 ± 1,98 Aa
C. blanchetianus	44,07 ± 5,99 Aa	13,04 ± 1,17 Bbc	13,49 ± 1,55 Ba
C. jacobinensis	23,79 ± 2,11 Ab	22,06 ± 4,98 Aa	17,69 ± 1,19 Aa
C.mucronifolius	25,96 ± 1,38 Ab	9,75 ± 3,67 Cc	13,95 ± 1,90 Ba
C. nepetaefolius	9,87 ± 2,21 Bde	9,08 ± 2,59 Bc	14,80 ± 3,34 Aa
C. sincorensis	27,03 ± 1,61 Ab	14,16 ± 3,49 Bbc	13,05 ± 3,60 Ba
C. sonderianus	42,48 ± 3,20 Aa	13,60 ± 2,76 Bbc	13,26 ± 3,16 Ba
Anfotericina B	7,38 ± 1,26Ae	2,50 ± 0,54Bd	5,39 ± 1,14Ab

$IC_{50:}$ Concentração capaz de inibir 50% do microorganismo em questão
*Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas.
**Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas.

FIGURAS

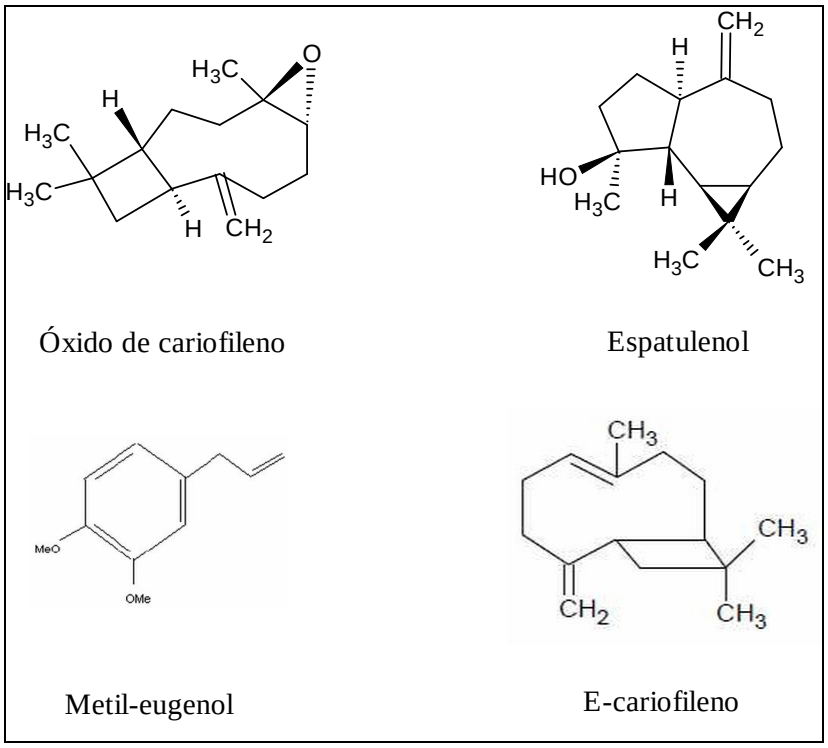

Fig. 1. Representação da estrutura molecular do Espatulenol,óxido de cariofileno, metil-eugenol e E-cariofileno.

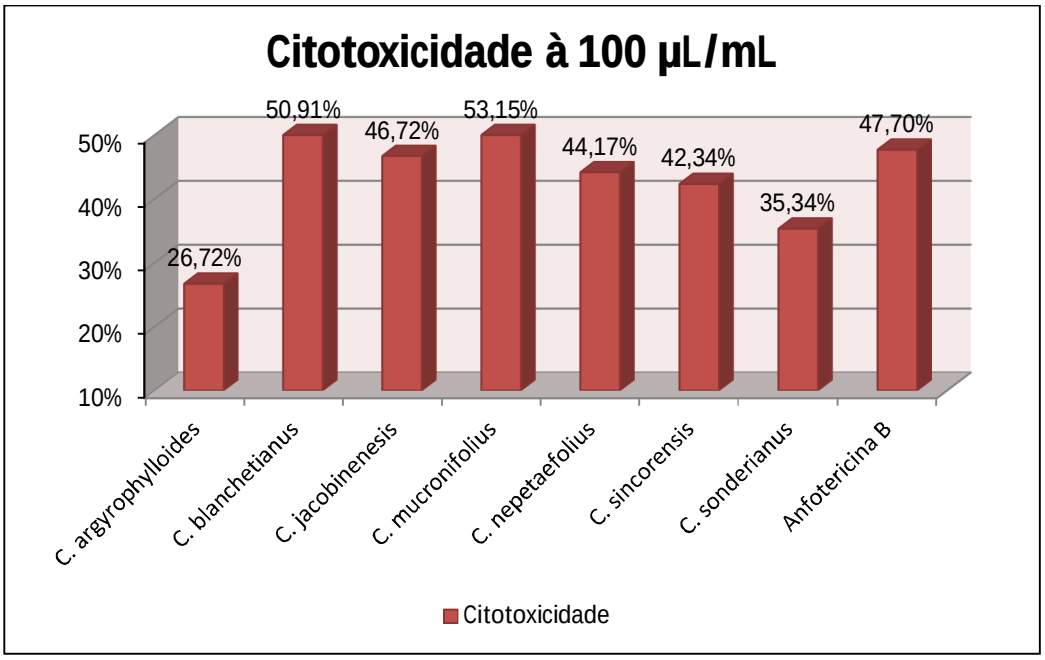

Fig.2. Citotoxicidade dos óleos essenciais de *Crotons* em células monocíticas da linhagem AMJ2-C11Na.

8. CONCLUSÕES

Com os resultados demonstrados neste estudo, pode-se observar que os óleos essenciais ricos em timol extraídos da *P. amboinicus* e *E. uniflora* possuem potencial atividade leishmanicida e antioxidante, com citotoxicidade semelhante a droga padrão Anfotericina B. Sendo estes vegetais promissores no tratamento da Leishmaniose, e de fácil acesso e barato para a população.

Os óleos essenciais de *Crotons* estudados apresentam citotoxicidade semelhante ou menor que a droga padrão Anfotericina B. Além disso, foi demonstrado que todos eles apresentam atividades leishmanicida e antioxidante, sendo promissores no combate à doenças tropicais e que o OE de *C. nepetaefolius*, em especial, apresentou elevado efeito contra espécies de *Leishmanias* causadoras da leishmaniose tegumentar.

9. PERSPECTIVAS

Os OEs de *Plectranthus amboinicus, Eugenia uniflora* e de espécies de *Croton* encontradas no Nordeste brasileiro apresentaram neste estudo, resultados promissores quanto suas atividades leishmanicida e antioxidante, sendo inéditos quanto ao seu embasamento científico em relação ao uso dessas espécies na medicina popular. Além disso, o uso de produtos naturais nos tratamentos de doenças negligenciadas, como a leishmaniose, torna-se, muitas vezes, a única alternativa para grande parte da população devido ao fácil acesso e baixo custo desses produtos. Sendo assim, é importante que o ramo científico invista cada vez mais em pesquisas com produtos naturais, como os óleos essenciais estudados neste trabalho, envolvendo testes com amastigotas e *in vivo*, a fim de estimular e proporcionar uma maior qualidade de vida para a população.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADEJO, A. C.; OLOKE, K. J.; ALADESANMI, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia*, v.5, p. 451-455, 1989.

AGUIAR, L. A.; PORTO, R. S.; LAHLOU, S.; CECCATTO, V. M.; BARBOSA, R.; LEMOS, T. L. G.; SANTOS, H. S. dos; COELHO-DE-SOUSA, A. N.; MAGALHÃES, P. J. C.; ZIN, W. A.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of a new kaurene diterpene isolated from *Croton argyrophylloides* on rat airway smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 64, p. 1155–1164, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDIEROS, P. M. de; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G. de; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal Ethnopharmacology*, v.114, p. 325–324, 2007.

ALENCAR, J. E. Calazar Canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil, Fortaleza: {s. n.}, 1959.

ALVES, T. M. A. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367–373, 2000.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 10, p. 106-121, 2009.

AMOROZO, M. C. M. Uso e Diversidade de Plantas Medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil, *Acta Botânica Brasileira*,v. 16, n. 2, p. 189-103, 2002.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. *Eugenia uniflora* L. "brazilian cherry" leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. *Adolfo Lutz Institute Journal*, v. 62, n. 1, p. 55 – 61, 2003.

ARGÜELLO, C. Leishmaniasis en Mexico. *Avance y Perspectiva*, v. 14, p. 21, 1995.

ARTHUR, G.; BITTMAN, R.The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids.*Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1390, p. 85-102, 1998.

BALASSUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by - products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, p. 191 – 203, 2006.

BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. D. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes And Infection*, v. 4, p. 23–29, 2002.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review.*Food and chemical toxicology*, v.46, p.446- 475, 2008.

BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology*, v. *34*, p. 474-479, 1995.

BARREIRA, J. C. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; PEREIRA, J. A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food chemistry*, v. 107, p. 1106 – 1113, 2008.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p.328-337, 2004.

BERGMANN, B. R.; COSTA, S. S.; MORAES, V. L. G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. *Brazilian Journal Association for the Advancement of Science*, v. 49, p 395-402, 1997.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. M. N.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 631-637, 2006.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L. C.; ROZENBERG, R.; JIWAN, J-L. H.; LLABRÈS, G.; PAUW-GILLET, M-C.; QUETIN LECLERCQ, J.; Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus.Phytochemistry*, v.65, p.1165- 1171, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2006 a. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / *Ministério*

da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p.: il. color – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2006 b Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / *Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica.* – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.2. Ed.,*Secretaria de Vigilância em Saúde*, Brasília- DF; 2007.

BRYCESON A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance.*TM & IH. Tropical medicine and international health*, v. 6, p. 928-934, 2001.

CAMURÇA-VASCONCELOS A. L.F.; BEVILAQUA, C. M. L; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; Vieira, L.S. Anthelmintic activity of Croton zehntneri and Lippia sidoides essential.*Veterinary Parasitology*, v. 148, n. 3–4, p. 288-294, 2007.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M**.** Plant natural products with leishmanicidal activity.*Natural Product Reports*, v. 18, n°6, p. 674-688, 2001.

CHANG, K.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. *Annual Review of Microbiology*,v. 44, p. 499, 1990.

CHAPPUIS, F; SUNDAR, S.; HAIL, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews | Microbiology*, v. 5, p. 873- 882, 2007.

CHARLES, T.P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco State, Brazil.*Veterinary Parasitology*, v. 30, p. 335-343, 1989.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's hear *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 57-63, 2002.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. *Revista Virtual Química*, v. 1, n. 3, p. 241 – 256, 2009.

COPPOLA, M.G.; ERCOLINI, D.; POSTIGLIONE, A. Laleishmaniosi viscerale umana in Campania: diagnosi di laboratorio e dati epidemiologici nel biennio 1992-1993. *Microbiologia Medica*, v. 9, p. 170, 1994.

CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; DANTAS, T. N. C.Fixed and Volatile Constituents of *Croton aff. Nepetifolius*.*Journal of natural products*, v. 43, n. 6, p. 756–757, 1980.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Ed. Universidade Federal do Ceará, 1981.

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

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis.*Indian Journal of Medical Research*,v. 123, p. 399 – 410, 2006.

CRUZ, M. E. S.; SCHWANESTRADA, K. R. F.; RUPP, M. M. M.; FIORE, B. V. Controle Natural de Patógenos em Grãos de Amendoim e Café. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 2, 2009.

DESJEUX, P. Aspects de Santé publique et lutte. In: DEDET, J. P. *Les Leishmanioses*.Paris: AUPELF-UREFF-Ellipses, p.219-238, 1999.

FERREIRA JÚNIOR, W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 138, p. 238– 252, 2011.

FONTENELLE, R.O.S; MORAIS, S. M; BRITO, E. H. S; BRILHANTE, R. S. N; CORDEIRO, R.A; NASCIMENTO, N. R. F; KERNTOPF, M. R; SIDRIM, J. J. C; ROCHA, M. F. G. Antifungal

activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome.*Journal of Applied Microbiology*, v.104, n. 5, p.1383- 1388, 2008.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*,v. 29, n. 3, 1996.

FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADOCOELHO, G. L.; COSTA, C. A.; MAYRINK, W. VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, n. 13, p. 161-73, 2003.

FRAXE, T. J. P.; PEREIRA, H. S.; WITKOSKI, A. C. Comunidades ribeirinhas amazônicas modos de vida e uso dos recursos naturais. *Socioeco*, v. 2, p. 1- 224, 2007.

FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: MACHADO- PINTO, J. *Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas.* Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p. 319-328, 1994.

GONTIJO, C. M. F.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.*Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. *et al.Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed., p.15. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

GURGEL, A. P. A. D.; DA SILVA, J. G.; GRANGEIRO, A. R. S.; OLIVEIRA, D. C.; LIMA, C. M. P.; DA SILVA, A. C. P.; OLIVEIRA, R. A. G.; SOUZA, I. A.In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus(Lour.) Spreng* (Lamiaceae).*Journal of ethnopharmacology*, v. 125, n. 2, p. 361 -363, 2009.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry,* v. 47, p. 3954 – 3962, 1999.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing,* v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E., DEREURE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology,* v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential Oil of *Croton nepetaefolius* Decreases Blood Pressure through an Action upon Vascular Smooth Muscle: Studies in DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Planta Médica,* v. 66, p. 138, 2000.

LAINSON, R.; SHAW, J. In *The Leishmaniases in Biology and Medicine,* ed. Peters W, Killick-Kendrick R (Academic, London), p. 1–120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.A brief history of genus Leishmania (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas.*Amazonian Journalof the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 44, p. 94-106, 1992.

LAINSON R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina,* v. 11, n. 1, p. 29-40, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.New World Leishmaniasis The Neotropical *Leishmania* Species.In COX, F. E. G.; Kreier, J. P.; Wakelin, D. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, ed. 9. Parasitology, v. 5, p. 242-266, 1998.

LANIGAN, R.S.; YAMARIK, T.A. Final report on the safety assessment of BHT.*International Journal Toxicology,* v. 2, p. 19-94, 2002.

LEE, M.; CHIOU, J.; YEN, K.; YANG, L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora.Cancer Letters,* v. 154, p. 131–136, 2000.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B. M.; LIEEDALE, G. F.; LEOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the PROTOZOA.*Journal of Protozoology,* v. 27, p. 37-58, 1980.

LIGOR, M.; BUSZEWSKI, B. Thin layer chromatographic techniques (TLC, OP TLC) for determination of biological activated compounds from herb extracts.*Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,* v. 30, p. 2617 – 2628, 2007.

LIMA, G. P. G. de; SOUZA, T. M.; FREIRE, G. P.; FARIAS, D. F.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S.; MORAIS, S. M.; CARVALHO, A. F. U.Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti L.Parasitology Research,*v. 112, n. 5, p. 1953-1958, 2013.

LÓPEZ, L.; ROBAYO, M.; VARGAS, V.; VÉLEZ, I. D. Thermotherapy. An alternative for the treatment of american cutaneous leishmaniasis. *Trials,* v. 13, n. 1, p. 58, 2012.

LORENZI, H., MATOS, J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cutivadas. *Instituto Plantarum,* Nova Odessa, SP, p.512, 2002.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHLS, K.; TINTAYA, W. Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNI, M.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *PNAS,* v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.

LUKHOBA, C.W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J.*Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology,* v.103, p. 1–24, 2006.

MACIEL; M. A. M.; PINTO; A. C.; VEIGA Jr, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova,*v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADEIRA, M. F.; UCHÔA, C. M. A.; LEAL' C. A.; SILVA, R. M. M.; DUARTE, R.; MAGALHÃES, C. M.; SERRA, C. M. B. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,* v.36, n.5, 2003.

MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P.; RAICK, N. A.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 28, p. 253-262, 1986.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("Espundia", Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* v. 80, p. 859-76, 1986.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. *Cadernos de Saúde Pública,* v. 1, p. 432-446, 1985.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). *Jornal Brasileiro de Medicina,* v. 63, n. 5/6, p. 81-105, 1992.

MATOS, FJ de A. Introdução à fitoquímica experimental. edições UFC, 1997.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. *Parasitology Today*, v. 16, p. 188 –189, 2000.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A. C. C.; MAGALHÃES, P. A.; BATISTA, S. M.; LIMA, A. O.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W. T.; NASCIMENTO, E.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,*v. 39, n. 1, p. 14 -21, 2006.

MCCHESNEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderiaus*, L, Hardwickic and 3,4-Secotrachylobanoic acids. *Journal of Natural Products,* v. 54, n. 6, p. 1625–1633, 1991.

MONTE, F. J. Q.; ANDRADE, C. H. S.; CRAVEIRO, A. A.; BRAZ-FILHO,New Tetracyclic Diterpenes from *Croton argyrophylloides.Journal Natural of Products,*v.47, p.55–58, 1984.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DETOMMASI, N. Structure - antioxidant activity relation ships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*,v. 92, p. 349 – 355, 2005.

MORAES, M. A. P.; SILVEIRA, F. T. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*,v.36, p. 459-463, 1994.

MORAIS, S. M.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico de *Cróton mucronifoliusMuell. Arg.* (Velaminho). *Acta Amazonica*,v. 18, n.1-2, p. 471-472, 1988.

MOURA, V. L. A.; MONTE, F. J. O.; BRAZ-FILHO, R. A New Casbane-Type Diterpenoid from *Croton nepetaefolius. Journal of Natural Products*, v. 53, p. 1566, 1990.

MURRAY, H. W. Interferon-gamma, the activated macrophage and host defense against microbial challenge. *Annual International Medicine.* v. 108, p. 595–608, 1988.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N, G. Advances in leishmaniasis.*Lancet*, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

MURTHY, P. S.; RAMALAKSHMI, K.; SRINIVAS, P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles.*Food Chemistry*, v. 114, p. 1014–1018, 2009.

NEVES, I. A.; CAMARA, C. A. Acaricidal activity against Tetranychus urticae and essential oil composition of four *Croton* species from Caatinga biome in northeastern Brazil.***Naturals Products Community,*** v. 6, n. 6, p. 893-899, 2011.

OGUNWANDE, L. A.; OLAWORA, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora L.International journal of aromatherapy.* v. 15, p. 147-152, 2005.

PHAPALE, R.; MISRA - THAKUR, S. Antioxidant activity and antimutagenic effect of phenolic compounds in *Feronia limonia (L)* swingle fruit. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 2, n. 4, p. 68-73, 2010.

PAULA, A. A.; DA SILVA, A. V. M.; FERNANDES, O.; JANSEN, A..M. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *Journal Parasitology.* n. 89, p. 832-836, 2003.

PINHO-DA-SILVA, L.; MENDES-MAIA, P. V.; GARCIA, T. M. N.; CRUZ, J. S.; de MORAIS, S. M.; SOUZA, A. N. C.; LAHLOU, S.; CARDOSO, J. H. L. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. *Phytomedicine,*v. 17, n. 10, p. 721-725, 2010.

PONTES, W. J. T; DE OLIVEIRA, J. C. G; DA CÂMARA, C. A. G; DE ASSIS, C. P. O; DE OLIVEIRA, J. V; JÚNIOR, M. G. C. G; BARROS, R. Effects of the Ethanol Extracts of Leaves and Branches from Four Species of the Genus *Croton* on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *BioAssay*, v.6, n.3, 2011.

PROENÇA DA CUNHA, A.; TEIXEIRA F.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. Plantas na terapêutica farmacológica e ensaios clínicos. Farmacognosia e fitoquímica..*Manuais Universitários. Fundação Calouste Gulbenkian*, Lisboa, 1ª Ed., v. 8, p. 670, 2005.

QUINNELL, R. J., COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic Visceral Leishmaniasis.*Cambridge Journal Parasitology,* v. 136, p. 1915–1934, 2009.

RAHUMAN, A.; GEETHA, G.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against Aedes aegypti and Culex Quinquefasciatus (Diptera: Culicidae).*Parasitology Research,*v. 102, p. 867-873, 2008.

RASO P.; GENARO O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Brasileiro Filho, G *et al. Bogliolo Patologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JÚNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova,*v. 26, p. 550- 553, 2003.

REBÊLO, J. M. M. Flebótomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de Saúde) São Luis: *Universidade Federal do Maranhão/Ministério da Saúde;* 1999.

RICE – EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine,* v. 20, n. 7, p. 933 – 956, 1996 .

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

RONDON, F.C.M. ; BEVILAQUA, C.M.L.; FRANKE, C.R.; BARROS, R.S.; OLIVEIRA, F.R.; ALCÂNTARA, A.C.; DINIZ, A.T. Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Veterinary Parasitology,* v. 155, p. 24–31, 2008.

ROSA, M. D. S.; MENDONÇA, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. D.; SOARES, M. A.; SOUTO PADRON, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* v. 47, p.1895-1901, 2003.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae).*Journal of the Brazilian Chemical Society,* v.18, n. 1, p.11–33, 2007.

SÁLMAN, J. G. D.; JIMENEZ, T. E. G.; CASTILHO, R. M.Efecto antioxidante de los extractos fluido e de flavanóides del *Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng.* (Orégano Francés). *Revista Cubana de Plantas Medicinales,* v. 2, p. 27–30, 1996.

SANTOS, S. O.; FARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology,* v. 12, p. 315-7, 1998.

SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. *Life Sciences,* v. 77, n.23, p. 2953–2963, 2005.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugeniu unijlora L.Journal of Ethnopharmacology,* v. 44, p. 137-142, 1994.

SILVA, A. V. M.; DE PAULA, A. A.; CABRERA, M. A. A.; CARREIRA, J. C. A. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Caderno de Saúde Pública,* Rio de Janeiro, 21 ed.,v. 1, p. 324-328, 2005.

SILVA, J. S.; SALES, M. F.; GOMES, A. P. S.; TORRES, D. S. C. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *ActaBotânica Brasileira,* v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; BRITO, A. C.; OLIVEIRA, M. R. F.; PAES, M. G.; SOUZA, A. A. A.; SILVA, B. M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão, R. N. Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Editora CEJUP; 1997.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,* v. 99, n. 4, p 239–251, 2004.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *Journal of postgraduate Medicine,* v. 49, p. 55-60, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology,* n. 39, p. 560–563, 2001.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA - JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. M. B.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova,* v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

VÁZQUEZ, G.; FONTENLA, E.; SANTOS, J.; FREIRE, M. S.; GONZÁLEZ - ÁLVAREZ, J.; ANTORRENA, G. Antioxidant activity and phenolic content f chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products,* v. 28, p. 279-285, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova,* v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VILA-NOVA, N. S.; DE MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; MACHADO, L. K. A.; BEVILÁQUA, C. M. L.; COSTA, I. R. S.; BRASIL, N. V. G. P. S.; DE ANDRADE JÚNIOR, H. F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two *Annonacea* species cultivated in Northeastern Brazil.*Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n.44, v. 5, p. 567-571, 2011.

VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINOA, P.; MAZIER, D.; WOEHRLE, F. R. Canine visceral Leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*, v. 135, p. 137–146, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Division of control of tropical diseases, Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden magnitude/ en/index.html. (Acesso: June, 2013).