



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

WINGRED LOBATO GONÇALVES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL E NANO-EMULSÃO DE *Protium
heptaphyllum* FRENTE ÀS CEPAS DE *Leishmania amazonensis***

**Macapá/AP
2022**

WINGRED LOBATO GONÇALVES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL E NANO-EMULSÃO DE *Protium
heptaphyllum* FRENTE ÀS CEPAS DE *Leishmania amazonensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para a obtenção do título de Mestre Ciências da Saúde.

Orientadora: Dr.^a Raquel Rodrigues do Amaral

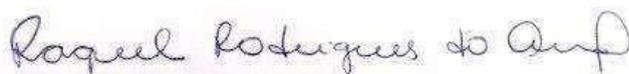
Macapá/AP
2022

WINGRED LOBATO GONÇALVES

ANÁLISE DA ATIVIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL E NANO-EMULSÃO DE *Protium heptaphyllum* FRENTE ÀS CEPAS DE *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaaios Biológicos, como requisito para a obtenção do título de Mestre Ciências da Saúde.

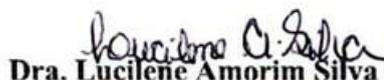
DATA DE APROVAÇÃO: 25/02/2022



Orientadora: Prof. Dra: Raquel Rodrigues do Amaral
Universidade Federal do Amapá

Documento assinado digitalmente
 RUBENS ALEX DE OLIVEIRA MENEZES
Data: 22/03/2022 11:12:53-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador: Prof. Dr. Rubens Alex de Oliveira Menezes
Universidade Federal do Amapá



Dra. Lucilene Amorim Silva

Examinadora: Prof. Dra: Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente
 Caio Pinho Fernandes
Data: 26/03/2022 19:37:09-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador: Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes
Universidade Federal do Amapá

Macapá/AP
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Gonçalves, Wingred Lobato

- G635a Análise da atividade do óleo essencial e nano-emulsão de *Protium heptaphyllum* frente às cepas de *Leishmania amazonensis* / Wingred Lobato Gonçalves. - 2022.
1 recurso eletrônico. 48 f.
- Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Macapá, 2022.
Orientadora: Professora Doutora Raquel Rodrigues do Amaral
- Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF). Inclui referências.
1. Plantas medicinais. 2. Óleos essenciais. 3 Extrato vegetal. 4. Leishmaniose. 5. Protium Heptaphyllum. I. Amaral, Raquel Rodrigues do, orientadora. II. Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 edição, 615.321

GONÇALVES, Wingred Lobato. Análise da atividade do óleo essencial e nano-emulsão de Protium heptaphyllum frente às cepas de Leishmania amazonensis. Orientadora: raquel Rodrigues do Amaral. 2022. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Macapá, 2022.

Aos meus pais, Manoel Haroldo Ferreira Gonçalves e Beatriz do Socorro Lobato Gonçalves, pessoas essenciais em minha vida, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus Irmãos Wanny e Wellington, por todoo apoio e amizade. Ao Taniel, pelo companheirismo, dedicação, incentivo e amor. À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Raquel Rodrigues do Amaral, pelo exemplo de profissional, paciência e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que sempre me acompanha e mostra os melhores caminhos.

À minha família por todo apoio e confiança depositado em mim. Em especial aos meus pais Beatriz e Haroldo por todo cuidado, incentivo e amor diariamente. Aos meus irmãos Wanny e Wellington, obrigada pela parceria, companheirismo e por sempre acreditarem em mim. Ao meu namorado Toniel por me encorajar e me animar durante esse processo.

A Professora Raquel Rodrigues do Amaral, por aceitar me orientar, obrigada pela confiança depositada e por todos os ensinamentos. Ao Professor Emerson Augusto Castilho Martins que gentilmente aceitou acompanhar todo o processo de desenvolvimento dos ensaios, assim como compartilhar conosco conhecimento e experiências, e me deu o seu grande auxílio sempre que necessário.

Ao Professor Caio que nos cedeu material para realização do projeto. À Ana Carolina Stocco de Lima por todo apoio e suporte na realização do ensaio. A Mikaela Amaral Ferreira pela colaboração do desenvolvimento da Nano- emulsão.

Às amigas Karoline Sampaio e Thamilly Picanço pelo apoio, obrigada pelo incentivo e pela amizade.

“Crescimento significa mudança, e toda mudança implica o risco de passar do conhecido ao desconhecido.”

– George Shinn

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, afetando cerca de dois milhões de pessoas a cada ano e, portanto, classificadas como um problema de saúde pública. Sabendo que derivados de espécies vegetais vem apresentando-se com potencial para o desenvolvimento de novas terapias, objetivou-se analisar *in vitro* a atividade leishmanicida do óleo vegetal *Protium heptaphyllum* e nano-emulsão preparadas a partir dele, essa pesquisa visa contribuir com o tratamento da *Leishmania* agregando aos fármacos em tratamentos convencionais e/ou melhorando assim a resposta terapêutica dos indivíduos. Para a realização da atividade foi utilizado uma placa de 96 poços, e adicionado às soluções do óleo e da nano-emulsão em estudo nas diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 25° durante 24 e 48 horas. Quanto à atividade leishmanicida, todos apresentaram uma moderada atividade frente às cepas avaliadas com as devidas concentrações de inibição: (CI50 = 0.01 do óleo em 24h, IC50 = 0.0107 óleo em 48h, CI50 = 0,692 com nano em 24h, CI50 = 0.0117 com nano em 48h).

Palavras-chave: óleo essencial; atividade leishmanicida; parasitologia; *Protium heptaphyllum*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a set of parasitic diseases caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*, affecting about two million people each year and, therefore, classified as a public health problem. Knowing that derivatives of plant species have shown potential for the development of new therapies, the objective was to analyze *in vitro* the leishmanicidal activity of the vegetable oil *Protium heptaphyllum* and the nano-emulsion prepared from it, this research aims to contribute to the treatment of *Leishmania* adding to drugs in conventional treatments and/or thus improving the therapeutic response of individuals. To carry out the activity, a 96-well plate was used, and added to the oil and nano-emulsion solutions under study at different concentrations. The assay was performed in triplicate. Plates were incubated at 25° for 24 and 48 hours. As for leishmanicidal activity, all showed moderate activity against the strains evaluated with the appropriate inhibition concentrations: (IC₅₀ = 0.01 of the oil in 24h, IC₅₀ = 0.0107 of the oil in 48h, IC₅₀ = 0.692 with nano in 24h, IC₅₀ = 0.0117 with nano in 48 hours).

Keywords: essential oil; leishmanicidal activity; parasitology; *Protium heptaphyllum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Casos de leishmaniose cutânea/mucosa por segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019.....	17
Figura 2 – Área em desmatamento na Região Amazônica.....	22
Figura 3 – Casa construída em área da floresta amazônica para extrativismo de borracha. ...	23
Figura 4 – Assentamento - criação de novos bairros - invasão de mata fechada.	24
Figura 5 – Ciclo de transmissão da <i>Leishmania amazonensis</i> na Amazônia brasileira.....	25
Figura 6 – Ciclo de transmissão da <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> na Amazônia brasileira.	26
Figura 7 – Ciclo de transmissão da <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> entre <i>Lutzomyia wellcomei</i> e roedores silvestres na Amazônia brasileira.	27
Figura 8 – <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March. – aspecto do tronco com resina exsudada.	32
Figura 9 – Diluição seriada da solução de óleo/ Nano-emulsão.....	35
Figura 10 – Placa do ensaio com 96 poços.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de inibição dos parasitas.	37
Tabela 2 – Média de Crescimento dos controles (Leitura na câmara de Neubauer).	38
Tabela 3 – Toxicidade in vitro do óleo e nano-emulsão de <i>Protium heptaphyllum</i> frente à cepa <i>Leishmania amazonensis</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
CC50	Concentração citotóxica
CE50	Concentração efetiva que causa efeito sobre 50% dos organismos
CI50	Concentração inibitória de 50% do crescimento
CL50	Concentração de Letalidade sobre 50% dos micro-organismos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FIG	Figura
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea-difusa
LD	Leishmaniose Difuso
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
ml	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
OEs	Óleos essenciais
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ppm	Partes Por Milhão
SP	São Paulo
SUS	Sistema Único de Saúde
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	LEISHMANIOSE.....	16
3.1.1	Definição	16
3.1.2	Epidemiologia	16
3.1.3	Manifestações Clínicas	17
3.1.4	Tratamento	19
3.1.5	Prevenção	20
3.1.6	Ciclo De Vida	21
3.1.7	Transmissão Vetorial	22
3.1.8	Ciclo de transmissão	24
3.1.8.1	Ciclo de transmissão da <i>Leishmania amazonensis</i>	24
3.1.8.2	Ciclo de transmissão da <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	25
3.1.8.3	Ciclo de transmissão da <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	26
3.2	PRODUTOS NATURAIS COMO TRATAMENTO ALTERNATIVO À LEISHMANIOSE.....	28
3.2.1	Atividade antileishmania <i>in vitro</i> com produtos naturais	28
3.3	ÓLEOS VOLÁTEIS/ ESSENCIAIS	29
3.4	NANO-EMULSÃO	30
3.4.1	<i>Protium heptaphyllum</i>	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	34
4.2	PREPARAÇÃO DA NANOFORMULAÇÃO	34
4.3	PARASITAS.....	34
4.4	REAGENTES UTILIZADOS	34
4.5	ENSAIO BIOLÓGICO.....	35
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é classificada como uma doença endêmica ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania* e ocorre em várias partes do mundo, sendo responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade. É uma zoonose que compreende formas clínicas variadas e pode ser dividida em dois principais grupos: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV) (DUTRA *et al.*, 2009).

No Brasil existem sete espécies causadoras da LTA. Seis destas espécies pertencem ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*) spp.: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, e *L. (V.) naiffi*. A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* compreende a espécie que pertence ao subgênero *Leishmania (Leishmania)* spp (BRASIL, 2013). O seu contágio ocorre através de um hospedeiro invertebrado denominado flebotômíneo, conhecido popularmente por mosquito-palha, responsável por transmitir formas promastigotas para animais silvestres e domésticos, além de humanos (DUTRA *et al.*, 2009).

A LTA se apresentou com ampla distribuição geográfica no Brasil, desde a década de 80, quando notificou casos em 19 estados e em 2003 já havia notificação em todos os estados brasileiros. Em 2006 o Ministério da Saúde responsabilizou as regiões norte e nordeste por 80% dos casos, ressaltando a importância dos ambientes de bioma amazônico na epidemiologia das leishmanioses (LIMA, 2017).

A doença se caracteriza com uma vasta manifestação clínica, envolvendo úlceras cutâneas, lesões nas mucosas e em órgãos viscerais, como por exemplo, baço, fígado e medula óssea, além do envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (MALEKI *et al.*, 2017).

As lesões da leishmaniose possuem características específicas, uma delas é a cicatrização, que não ocorre espontaneamente, além disso, também apresenta terapêutica medicamentosa com elevada toxicidade, podendo vir a apresentar resistência por parte do parasita frente à esses medicamentos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Estudos com a espécie vegetal *Protium heptaphyllum* demonstraram atividades inseticida do óleo também no controle biológico de pragas, como o ácaro *Tetranychus urticae* que gera prejuízos financeiros em plantações, apresentando susceptibilidade ao óleo essencial das folhas e frutos, sendo o óleo dos frutos mais eficiente quando comparado ao das folhas (ARAGÃO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2004b; TREVISAN *et al.*, 2003;

PONTES *et al.*, 2007).

Desta forma, o uso de plantas medicinais ganha importância e demonstra eficácia no processo de cura e prevenção de enfermidades, quando se apresenta como uma opção terapêutica viável em algumas regiões de difícil acesso e/ou grupos étnicos específicos. Visto que na medicina popular as resinas das espécies de *Protium* são usadas para muitos propósitos, por exemplo, em tratamento de úlceras, e como agente cicatrizante (MALEKI *et al.*, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Diante disso, compreende-se a importância da busca de novas terapias alternativas oriundas de produtos naturais para o tratamento da Leishmaniose e suas lesões com intuito de reduzir os efeitos adversos gerados pelas medicações-padrão. Essa pesquisa visa contribuir como tratamento da *Leishmania* agregando aos fármacos em tratamentos convencionais e/ou melhorando assim a resposta terapêutica dos indivíduos.

Dessa forma, podem ser desenvolvidos medicamentos a partir da modificação estrutural dos já existentes, com vantagens que vão desde a diminuição dos efeitos adversos, à melhora do efeito desejado. Compreende-se a necessidade em reduzir as dificuldades no tratamento das leishmanioses, e a importância da investigação de novas substâncias, o presente trabalho propõe avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida do óleo essencial *Protium heptaphyllum* e nano-emulsão preparadas a partir dele e fazer uma comparação entre as atividades encontradas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* da atividade leishmanicida do óleo *Protium heptaphyllum* e nano-emulsão preparadas a partir dele e fazer uma comparação entre as atividades encontradas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da atividade do óleo de *Protium heptaphyllum*;
- Avaliação da atividade da nano-emulsão de *Protium heptaphyllum*;
- Realizar análise estatística utilizando o probit para avaliação da atividade encontrada.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LEISHMANIOSE

3.1.1 Definição

As leishmanioses representam um grupo de doenças negligenciadas causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (*Kinetoplastida, Trypanosomatidae*), que se caracterizam por duas formas principais: amastigota e promastigota. Sua transmissão se dá por meio da picada do flebotomíneo fêmea. De modo geral, se dividem em Leishmaniose Tegumentar Americana, que ataca a pele e as mucosas, e leishmaniose visceral (ou calazar), que ataca órgãos internos (BRASIL, 2017).

De acordo com a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (SUS), a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada uma doença infecciosa, com baixa mortalidade, não contagiosa, causada por protozoário do gênero *Leishmania*, dispondo como principais espécies no Brasil a *Leishmania amazonensis*, *L. (Viana) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (VASCONCELOS *et al.*, 2018).

A transmissão é vetorial e se dá pela picada de insetos denominados flebotomíneos, relativos ao gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da disposição geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Já foram registradas, como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais, algumas espécies de roedores, marsupiais, endentados e canídeos silvestres (BRASIL, 2017).

No Brasil é obrigatório a notificação e confirmação dos casos de leishmaniose, pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o que proporciona benefícios de dados epidemiológicos concretos. Com base nos dados do SINAN, foi verificado que, no período de 2007 a 2014 registrou-se, no Brasil, um total de 996 óbitos de pacientes com LTA (média anual de 124,5 óbitos) e uma letalidade total acumulada de 0,55% (0,09% por LTA e 0,46 por outras causas), desse total de óbitos, 155 (15,56%) foram por LTA e 841 (84,44) registrados por outras causas (BRASIL, 2017).

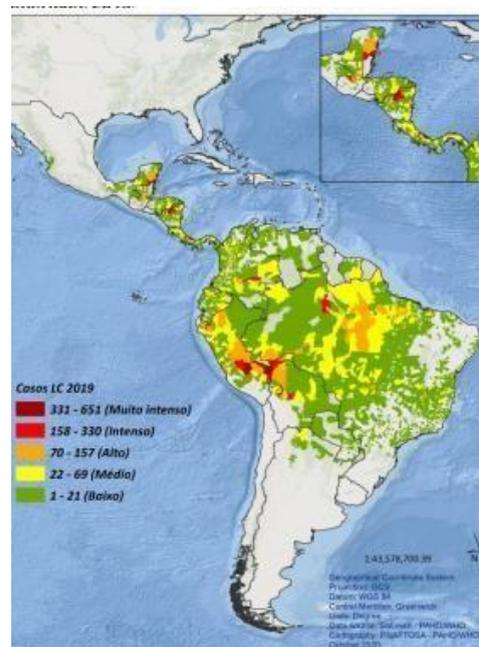
3.1.2 Epidemiologia

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que trabalha com os países das Américas para melhorar a saúde e a qualidade de vida de suas populações, de 2001

a 2019, 1.028.054 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram notificados por 17 dos 18 países endêmicos das Américas (com exceção da Guiana Francesa que continua a reportar dados diretamente para a França), com uma média de 54.108 casos por ano (OPAS, 2020).

A mesma relata que desde 2015, onde se registou o maior pico de número de casos (67.949), verifica-se uma tendência decrescente, atingindo em 2019 o menor número de casos (41.617), o que representa um decréscimo de 9% em relação ao ano anterior, dado pela redução do número de casos em 12 dos 17 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela). Em 2019, os países com maior número de casos notificados foram Brasil (15.484), Colômbia (5.907), Peru (5.349), Nicarágua (3.321) e Bolívia (2.052), que juntos representam 77% dos casos na Região (OPAS,2020) (Figura 1).

Figura 1 – Casos de leishmaniose cutânea/mucosa por segundo nível administrativo subnacional, Região das Américas, 2019.



Fonte: SisLeish-OPAS/OMS, 2019

3.1.3 Manifestações Clínicas

As leishmanioses se dividem em tegumentar americana, que acomete a pele e as mucosas, e leishmaniose visceral (ou calazar), que atinge os órgãos internos. Esclarece-se que as leishmanioses tegumentares causam lesões na pele, mais comumente ulcerações e, em casos mais graves (leishmaniose mucosa), afetam as mucosas do nariz e da boca. Em se

tratando da leishmaniose visceral, acomete as vísceras (ou órgãos internos), sobretudo fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea, podendo levar à morte quando não tratada (BRASIL, 2017). De acordo com Lima (2017), a Leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta-se das seguintes formas clínicas: cutânea (LC) no qual é caracterizada por uma pápula eritematosa podendo vir a evoluir para uma úlcera geralmente indolor, que aparece no local da picada do vetor; a disseminada (LD), que é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais envolvendo com frequência a face e o tronco.

A mucosa (LM), caracterizada por uma lesão secundária que acomete principalmente a orofaringe, com comprometimento do septo cartilaginoso e demais áreas associadas; e a forma clínica difusa (LCD), que inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento, evoluindo de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimo grandes extensões cutâneas (LIMA, 2017).

Em se tratando da muco-cutânea (LMC), os sinais e sintomas da leishmaniose na mucosa tipicamente desenvolvem-se meses a anos depois do aparecimento da lesão cutânea. Considera-se que parasitas se disseminam da lesão inicial na pele através dos vasos linfáticos e do sangue para os tecidos nasofaríngeos (PEARSON, 2019). É caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos (ROCHA, 2009).

Silva e Muniz (2009) afirmam sobre a importância de melhor compreensão da epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana, que consiste não somente no fato de possuir ampla distribuição geográfica no país, mas também sobre a constatação de que formas que podem levar a lesões permanentes tendem a acarretar graves comprometimentos psicossociais no indivíduo afetado.

É necessário que seja avaliado com uma visão holística visando adotar medidas que possam minimizar a sua incidência e, conseqüentemente, o sofrimento daqueles que convivem com essa zoonose (SILVA; MUNIZ, 2009). Apresenta-se com importância nessa avaliação também os determinantes ambientais e socioeconômicos da leishmaniose no Brasil, considerando as intervenções humanas no espaço geográfico e a forma como essa relação se estabelece também são os principais determinantes para a manutenção da transmissão da LC (BUZANOVSKY *et al.*, 2020).

Dessa forma, as espécies buscam se adaptar às condições ambientais modificadas criando novos nichos ecológicos em florestas secundárias, áreas rurais ou habitats peridomésticos, bem como em áreas não endêmicas e urbanizadas. Buzanovsky *et*

al. (2020) discutem a cerca do impacto gerado pela construção de grandes infraestruturas, como hidrelétricas e barragens, estradas e ferrovias, e a implantação de projetos de colonização em áreas rurais são altamente favoráveis à transmissão de LT, pois envolvem drástica transformação das condições ambientais locais.

3.1.4 Tratamento

O atual tratamento para leishmaniose apresenta uma série de limitações medicamentosas como efeitos colaterais tóxicos, longa duração, alto custo e resistência aos medicamentos, o que exige o desenvolvimento de novos fármacos ou alternativas eficazes ao tratamento da LC. Os óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de metabólitos secundários de várias plantas.

O tratamento da leishmaniose é feito de acordo com Síndrome clínica, no Brasil, o tratamento das leishmanioses para humanos é fornecido de forma gratuita pelo SUS e, de acordo com o Ministério da Saúde (MS), a droga de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina - Glucantime), e como segunda escolha anfotericina B e derivados (BRASIL, 2017).

De acordo com Gontijo e Carvalho (2003), tais medicações apresentam desconfortos por sua via de administração (intramuscular ou endovenosa) e uma toxicidade intolerável nas doses terapêuticas eficazes. Por conseguinte, Salgado *et al.* (2016) discutem em seu estudo que houve um significativo aumento de escala de fracasso terapêutico da droga de escolha. Além disso, os fármacos têm considerável grau de toxicidade para o hospedeiro.

Segundo a FIOCRUZ (2021), outras drogas, utilizadas como segunda escolha, são a anfotericina B e a pentamidina. Todas estas drogas têm toxicidade considerável. O tratamento é desafiador e longo, sendo necessário monitoramento e hospitalização do paciente.

Acerca disso, Pelissari *et al.* (2011) discutem em seu estudo sobre os medicamentos já citados para o tratamento de leishmaniose visceral e para leishmaniose tegumentar americana, que apresentam toxicidade e podem vir a manifestar eventos adversos, no qual a dose de antimoniato e o tempo de tratamento dependem da forma clínica.

Para reduzir a letalidade dessas doenças, faz-se necessário principalmente o diagnóstico precoce dos casos e o tratamento oportuno, que segundo Brasil (2010) recomendam-se ações para a melhoria na prescrição dos medicamentos distribuídos pelo Ministério da Saúde (MS) para o tratamento das leishmanioses.

3.1.5 Prevenção

O Ministério da Saúde (2017) aborda acerca das atividades de controle da leishmaniose tegumentar americana usualmente empregadas que se baseiam em medidas de atuação na cadeia de transmissão, através da redução de vetores, eliminação de reservatórios infectados, vigilância e tratamento de casos humanos, proteção pessoal e medidas educativas.

Costa, Moutinho e Bruno (2004) realizaram um estudo nas regiões do município em estudo situam-se em áreas de relevo e faixas litorâneas, ambos recobertos por remanescentes de Mata Atlântica. Muitas destas localidades apresentam-se em processo progressivo de ocupação humana, que vem ocorrendo de forma desordenada, associado a um crescente desmatamento e conseqüentes alterações ambientais.

O estudo baseou-se em: a) Pesquisa entomológica, b) Controle químico do vetor, c) Controle de possíveis reservatórios, d) Controle de roedores, e) Educação em saúde. As atividades de educação em saúde provavelmente contribuíram para o controle da leishmaniose tegumentar americana, pois a população passou a colaborar mais com as equipes de Vigilância Sanitária, facilitando a realização das atividades de controle, assim como os pacientes portadores de lesão, passaram a procurar assistência médica mais rapidamente (COSTA; MOUTINHO; BRUNO, 2004).

Além disso, o aumento do número de casos desta enfermidade eleva os gastos governamentais. Ressalta-se que o medicamento utilizado para o tratamento (Glucantime) é oferecido gratuitamente pela Fundação Nacional de Saúde. Enquanto uma vacina segura e eficaz não se encontra disponível, as formas de controle que utilizam métodos mais tradicionais (redução de vetores, eliminação de reservatórios infectados, proteção pessoal, vigilância e tratamento) traduzem-se na melhor opção (GRIMALDI; TESH, 1993)

Santos *et al.* (2000) evidenciaram em seu estudo que a população exposta com maior frequência ao vetor, usa como medidas de prevenção algumas práticas em suas rotinas, por exemplo mais da metade da população (51,3%) se recolhe para dormir entre 18 e 20h, ou entre 20 e 22h (45,0%); apenas 1,9% vai dormir após 22h, principalmente na Fazenda Pataxó II, onde já há energia elétrica e televisores.

O local habitual para o pernoite é o quarto de dormir (91,9%), cerca de 6,8% dormem na sala de estar e 1,8% repousa na cozinha ao lado do fogão a lenha. Os motivos alegados para as saídas noturnas do leito foram: satisfazer necessidade fisiológicas (82,4%), cuidar de crianças (12,0%), beber água (1,8%), alimentar-se (1,2%), cuidar da casa (1,2%), outros motivos (insônia, lombalgia) alcançaram menos de 1% das respostas.

Na área do estudo de Santos *et al.* (2000), ganha destaque que a maioria da população está dentro da faixa laborativa, acima de 15 anos, e mais exposta à transmissão extradomiciliar da LTA pelas condições inerentes ao trabalho de campo. No entanto, o presente inquérito, ao constatar a presença de cães, em cerca de 80,4% dos domicílios visitados, reforça a possibilidade de transmissão a crianças com menos de cinco anos de idade, nos ambientes intrae peridomiciliar.

Desta forma, uma alternativa mais viável de controle seria no próprio domicílio, na esperança de proteção principalmente às crianças de menor idade. A explicação para a sugestiva ocorrência familiar de casos de LTA não tem encontrado suporte em uma predisposição genética e parece mais dependente de fatores epidemiológicos ambientais, socioculturais e comportamentais (WONG *et al.*, 1986).

3.1.6 Ciclo De Vida

O parasita do gênero *Leishmania* inicia seu ciclo de vida quando a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um mamífero infectado. Quando depositado no intestino do inseto, as formas amastigotas sofrem diferenciação em formas promastigotas. A partir de então, já em forma promastigota, os parasitas passam por diferentes estágios, que são determinados pelo tamanho e formato da célula, motilidade, região em que são encontradas, capacidade de divisão celular e moléculas da superfície (LIMA, 2017).

Os principais estágios são: Promastigota procíclica, nectomonas, haptomonas e metacíclicas. As formas metacíclicas não sofrem divisão celular e migram para a probóscide do inseto, causando acúmulo e obstruindo o aparelho bucal (BRASIL, 2017). Quando ocorre um novo repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo regurgita os parasitas no local da picada para desobstruir sua probóscide e assim, alimentar-se do sangue do hospedeiro mamífero.

Lima (2017) discorre acerca das formas metacíclicas quando iniciam o contato com o hospedeiro vertebrado, pois entram em contato com as proteínas do sistema complemento, que é a primeira barreira do sistema imunológico. Muitas formas metacíclicas não sobrevivem à essa primeira barreira, sendo mortas pelo complemento, porém muitas outras conseguem escapar e permanecem vivas.

Posteriormente, vão entrar em contato com a segunda barreira do sistema imune inato que é composto pelas células que realizam fagocitose, como neutrófilos, macrófagos, dentre outros. Ao serem fagocitadas pelos macrófagos, as formas promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas, que são resistentes ao ambiente ácido do fagolisossomo,

compartimento formado a partir da fusão do fagossomo com os lisossomos (SILVA; MUNIZ, 2009).

As formas amastigotas nessa fase, dentro do fagolisossomo realizam seguidas divisões binárias, que resultam no rompimento do macrófago e na liberação dessas no meio externo. As formas liberadas podem ser mortas pelo mecanismo de defesa do sistema imune ou podem ser fagocitadas por novos macrófagos, aumentando assim a infecção. Depois de estabelecida a infecção, ocorre a disseminação pela corrente sanguínea, facilitando a infecção de novos flebótomos durante a hematofagia (LIMA, 2017; BRASIL, 2013).

3.1.7 Transmissão Vetorial

No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) se apresenta com três padrões epidemiológicos de transmissão, caracterizados por (1) silvestre, (2) ocupacional e lazer, e (2) rural e periurbano em áreas de colonização (BRASIL, 2017). Se tratando da silvestre, a transmissão se dá em área de vegetação primária e é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este se expõe ao ambiente.

O outro padrão epidemiológico de transmissão se denomina por ocupacional e lazer, este é associado a exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias de treinamentos militares e ecoturismo (Figuras 2 e 3) (BRASIL, 2010; BENTO, 2018).

Figura 2 – Área em desmatamento na Região Amazônica.



Fonte: BRASIL, 2010

Figura 3 – Casa construída em área da floresta amazônica para extrativismo de borracha.



Fonte: BRASIL, 2010

Dessa forma, apresenta-se o reservatório animal no qual também é acometido pela doença. Uma vez que ocorre a contaminação aos cães e esses servem como hospedeiro do parasita. Para os Cães: Em conformidade com a Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) deferiu o registro do fármaco Miltefosina, utilizado para o tratamento de cães com leishmaniose visceral canina (LVC).

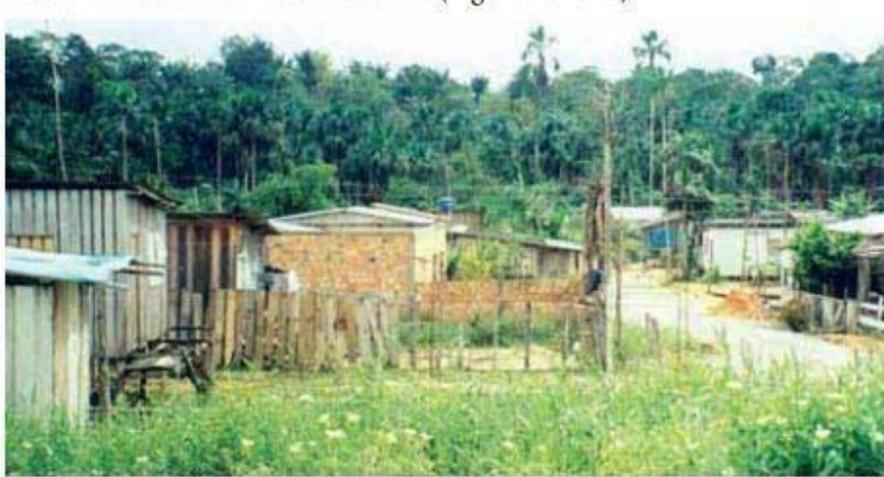
Em consonância com a Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de julho de 2008, que regulamenta o tratamento de cães, e proíbe o tratamento da leishmaniose visceral (LV) com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA, o tratamento de cães com LVC com o Miltefosina passa a ser uma possibilidade legal (BRASIL, 2010).

Cabe destacar que o tratamento de cães com LVC não se configura como uma medida de saúde pública para controle da doença e, portanto, trata-se única e exclusivamente de uma escolha do proprietário do animal, de caráter individual, o que muitas vezes está associada ao sacrifício do animal, gerando assim mais uma questão de saúde coletiva. No Brasil, a doença afeta mais de 3.500 pessoas anualmente e para cada humano afetado, a estimativa é que haja 200 cães infectados, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

O terceiro padrão de transmissão é o rural e periurbano em áreas de colonização, este padrão está relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais (Figura 4). O período de incubação da doença no ser humano é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos. Contudo, atualmente há cada vez mais evidências da transmissão peridomiciliar, por sugestiva adaptação do vetor ao redor das residências (BENTO, 2018;

BRASIL, 2010).

Figura 4 – Assentamento - criação de novos bairros - invasão de mata fechada.



Fonte: BRASIL, 2010

3.1.8 Ciclo de transmissão

Os ciclos de transmissão da Leishmaniose tegumentar americana se apresentam de forma variada de acordo com a região geográfica, o que envolve uma diversidade de espécies de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros (BRASIL, 2010; BRASIL, 2017). Dessa forma, vamos abordar os ciclos de transmissão de cada espécie de *Leishmania*.

3.1.8.1 Ciclo de transmissão da *Leishmania amazonensis*

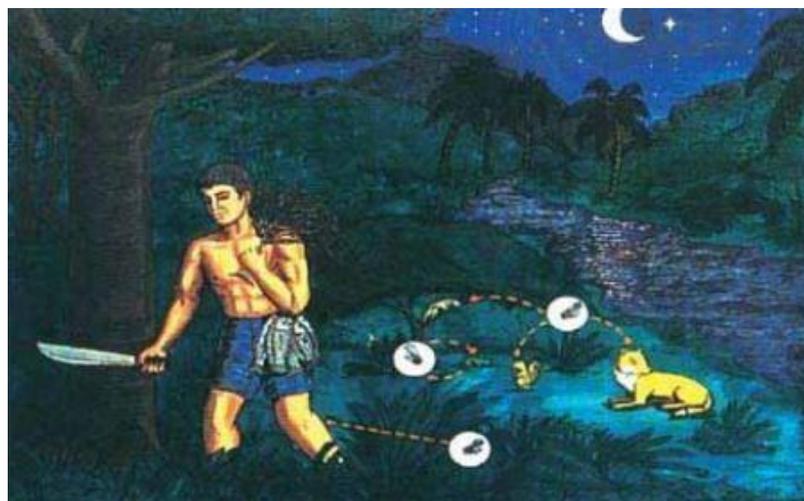
O ciclo desta espécie ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal, que engloba os estados: Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão, e também é verificado nos estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Embora o papel desempenhado por estes animais silvestres no ciclo de transmissão ainda não tenha sido bem-definido, as evidências encontradas indicam estes roedores como reservatórios desta espécie de *Leishmania* (BRASIL, 2017; NETO, 2011; BENTO, 2018).

Os flebotomíneos vetores são *L. flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia). Estas espécies são pouco antropofílicas, o que justifica uma menor frequência de infecção humana por esta *Leishmania*. Seu principal vetor, *L. flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes habitats de países

fronteiriços ao Brasil e nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo (BRASIL, 2017).

Caracteriza-se também por ocorrer em matas úmidas, onde apresenta densidade elevada, conforme demonstrado na Figura 5. A *L. amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BRASIL, 2010).

Figura 5 – Ciclo de transmissão da *Leishmania amazonensis* na Amazônia brasileira.



Fonte: BRASIL, 2010

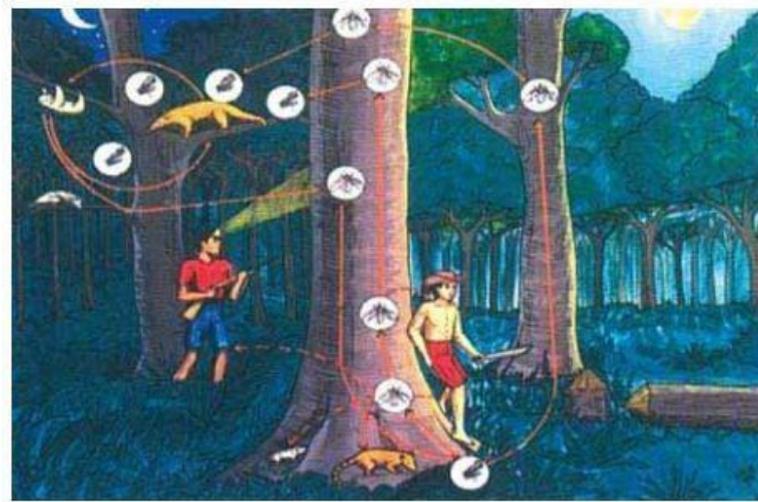
3.1.8.2 Ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) guyanensis*

No Brasil, o ciclo dessa espécie se apresenta limitado à região norte envolvendo os estados do Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará, estendendo-se para as Guianas. É encontrado em florestas de terra firme que são as que não se alagam no período de chuva. O parasito foi isolado de mamíferos silvestres, tais como a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e o gambá (*Didelphis albiventris*), tendo sido encontrado em pele e vísceras (BRASIL, 2010).

Embora o papel desempenhado por estes animais ainda não tenha sido bem-definido, as evidências encontradas indicam ser reservatórios desta *Leishmania*. Os vetores conhecidos são *L. umbratilis* (principal vetor) e *L. anduzei*. A espécie *L. umbratilis* apresenta alta densidade tanto na copa das árvores, onde predomina o ciclo silvestre, como no solo, sobre o tronco das árvores de grande porte, onde é encontrado em estado de repouso nas

primeiras horas da manhã, picando o ser humano quando este adentra no ambiente silvestre, conforme a Figura 6 (SILVA; MUNIZ, 2009).

Figura 6 – Ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) guyanensis* na Amazônia brasileira.



Fonte: BRASIL, 2010

Esta espécie de flebotomíneo está distribuída nos países fronteiriços ao Brasil e também nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima e Rondônia. A *L. (V.) guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo que as lesões múltiplas são consequências de picadas simultâneas de vários flebotomos infectados ou metástases linfáticas secundárias (BRASIL, 2020).

3.1.8.3 Ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis*

De acordo com Brasil (2010), a *L. (Viannia) braziliensis* foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da Leishmaniose tegumentar americana, sendo a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina pois e apresenta com ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina.

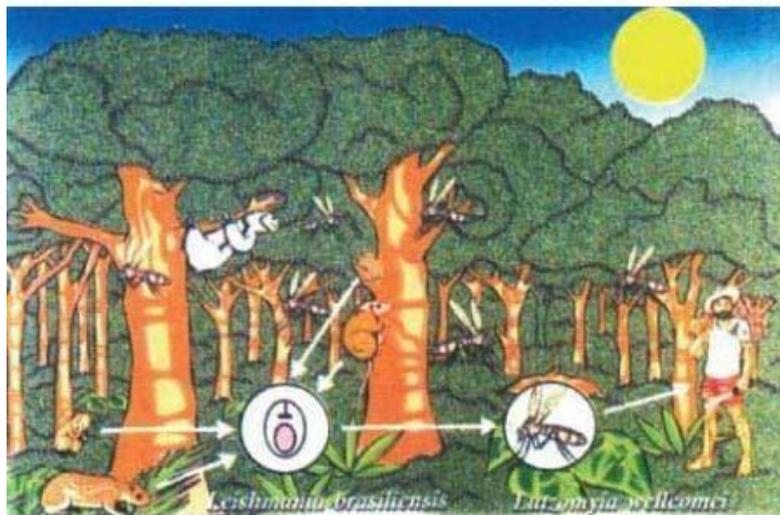
No Brasil, o parasito foi isolado de roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*) em Pernambuco, felídeos (*Felis catus*) no Rio de Janeiro, canídeos (*Canis familiaris*) no Ceará, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, e eqüídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*) nos estados do Ceará, Bahia e Rio de Janeiro.

Embora o papel desempenhado por estes animais no ciclo de transmissão ainda não tenha sido bem-definido, as evidências indicam, apenas, os roedores silvestres como

prováveis reservatórios primários desta *Leishmania*. A ecoepidemiologia da LTA associada a *L. (V.) braziliensis* vem assumindo características distintas no decorrer do tempo nos diferentes biomas do país (BENTO, 2018; BRASIL, 2017).

No Pará, o parasito foi isolado e caracterizado dos vetores *L. complexa* e *L. wellcomei*, destacando que este último vetor tem como hábito picar o indivíduo mesmo durante o dia (Figura 7). A *Lutzomyia wellcomei*, embora não tenha sido encontrada infectada, é o principal vetor da *L. (V.) braziliensis* em algumas áreas de transmissão no ambiente florestal no Estado do Ceará (BRASIL, 2010).

Figura 7 – Ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) braziliensis* entre *Lutzomyia wellcomei* e roedores silvestres na Amazônia brasileira.



Fonte: BRASIL, 2010

Nos estados da Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul e Paraná o parasito foi isolado e caracterizado do vetor *L. whitmani*, e nos estados do Ceará e Rio de Janeiro da espécie *L. migonei*. No sul do Brasil, *L. neivai* é sugerido como vetor. No Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, *L. intermedia* é a espécie incriminada como vetora, e tem sido encontrada nos domicílios e anexos, em plantações, principalmente as de subsistência, e em áreas de floresta (BRASIL, 2010).

Para finalizar, devemos considerar o caso de LTA como um todo, composto do parasito, das condições particulares de cada indivíduo e do estado de seu sistema imune. A resultante desta associação é que determinará a evolução da doença. Pacientes com dificuldade terapêutica devem ser investigados do ponto de vista imunológico, com base nos conhecimentos atualmente existentes.

3.2 PRODUTOS NATURAIS COMO TRATAMENTO ALTERNATIVO À LEISHMANIOSE

Diversas plantas têm sido testadas no tratamento da leishmaniose, dentre os quais se destacam-se os “alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides, chalconas, e naftoquinonas (OLIVEIRA; GILBERT; BÔAS, 2013, p. 37).

Em uma pesquisa feita por uma equipe de pesquisadores e cientistas do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo - SP, no ano de 2019, utilizando produtos naturais no tratamento da leishmaniose, descobriu-se que um composto natural da planta originária da Mata Atlântica pode se transformar em um potente medicamento contra a leishmaniose visceral (ALLISON, 2019).

Oliveira, Gilbert e Bôas (2013) afirmam que o desenvolvimento de uma formulação a partir destas espécies deverá começar pelo ensaio *in vitro* de associações seguido pelo desenvolvimento de um fitoterápico padronizado ou de um derivado ativo de valor tecnológico agregado como produto final, seja qual for a forma farmacêutica escolhida, o que difere das que contêm apenas o material vegetal fresco ou moído, comumente utilizados pela medicina tradicional.

Portanto, entende-se que essas plantas possuem uma diversidade de mecanismos de ação que indicam que combinações dessas sejam mais eficazes que qualquer espécie única.

3.2.1 Atividade antileishmania *in vitro* com produtos naturais

Alguns estudos comprovam a atividade antileishmania *in vitro*. Mendonça-Filho (2004) avaliou o efeito leishmanicida *in vitro* sobre *L. amazonensis* do extrato rico em polifenóis do mesocarpo fibroso dos frutos de *Cocos nucifera* L. (*Palmae*). O referido extrato apresentou concentração inibitória mínima de 10 µg/mL.

Outro exemplo que pode ser citado em relação ao estudo *in vitro* sobre atividade antileishmania é o de Paula-Junior *et al.* (2006) demonstraram o efeito leishmanicida do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, o extrato demonstrou relevante capacidade antioxidante similar.

Andrade (2017), em estudo semelhante, apontou que a licarina A apresentou atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* a partir da concentração de 12,5 µg/mL, sendo esse percentual de inibição de 26,78 ± 14,76%. Com o

aumento da concentração da molécula pode-se observar um aumento na inibição do crescimento desses parasitas, de forma que as concentrações de 25 e 50 µg/mL apresentaram inibições de crescimento de $63,66 \pm 1,81$ e $74,43 \pm 3,36\%$, respectivamente, em relação ao controle (0% de inibição de crescimento). Esses dados resultaram em uma CE50 de 22,13 µg/mL após 24h de tratamento com a neolignana.

Ainda em trabalhos realizados sobre atividade antileishmania *in vitro*, Lima *et al.* (2007) utilizou em sua pesquisa formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. infatum* e *L. braziliensis* foram ajustadas a parasitemia na concentração de 1×10^6 parasitos/mL e distribuídas em microplacas de 96 poços, 180 µL de uma suspensão de parasitos em meio RPMI suplementado e 20 µL dos compostos foram adicionados a placa teste, em triplicata nas concentrações seriadas (200-3,13 µg/mL para o EEMG, eluatos e composto isolado CAH-4 e 3- 0,047 µg/mL para os compostos CAH-12 e PRINT), as microplacas foram incubadas a 24°C por 72 horas.

Após o período de 72 horas acrescentou-se a cada poço 20 µL de solução da solução de resazurina (2 mM). Logo após as placas foram novamente incubadas por 5 horas a 24°C. Simultaneamente realizou-se os controles negativo sem tratamento e positivo com 5 µg/mL de Pentamidina para eficácia do ensaio. A leitura foi realizada em Espectrofotômetro de Microplacas (BioTek) nos comprimentos de fluorescência (530/35 e 590/36).

3.3 ÓLEOS VOLÁTEIS/ ESSENCIAIS

Os óleos voláteis são alternativas na medicina popular, como o uso dos óleos essenciais vêm sendo largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, por sua ação antibacteriana, atividades antifúngica e inseticida. Atualmente, aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importante, especialmente para a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentos, produtos sanitários, indústrias de cosméticos e perfumes (ROTTINI, 2011).

Sarto e Junior (2014) consideram que os óleos essenciais estão presentes como produto natural e apresentam compostos aromáticos voláteis originados do metabolismo secundário das plantas. Uma vez que as propriedades terapêuticas e organolépticas dos óleos se devem à presença de monoterpênicos, sesquiterpênicos e de fenilpropanóides entre outros compostos voláteis. Esses compostos fornecem a atividade biológica dos óleos essenciais, como antiparasitária, antimicrobiana e antifúngica.

Pesquisas feitas por Rottini (2011) avaliaram *in vitro* a atividade leishmanicida e a

citotoxicidade de diferentes óleos essenciais como *Citrus limon*, *Citrus aurantim*, *Eucalyptus globulus*, *Endlicheria bracteolata* e do alfa-bisabolol contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Em seus resultados confirmou que os óleos essenciais pesquisados apresentam atividade leishmanicida contra as formas promastigotas.

Além disso, o óleo essencial de *E. bracteolata* e o alfa-bisabolol demonstraram uma excelente atividade contra as formas amastigotas intracelulares o que indica serem estes, compostos promissores para o desenvolvimento de um tratamento alternativo para a leishmaniose cutânea (ROTTINI, 2011).

Enfatiza-se que “os óleos essenciais são líquidos oleosos e aromáticos que se evaporam quando expostos ao ar. São obtidos de várias partes vegetais, principalmente, por hidrodestilação ou expressão” (FLORÃO, 2006). Salienta-se, ainda, que em estudos feitos por Brito (2007) os óleos essenciais obtidos das folhas frescas por arraste de vapor das plantas *Cymbopogon citratus*, *Stapf.*, *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L. e *Mentha piperita* L. apresentaram *in vitro* resultados altamente promissores contra as formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

OEs têm caráter não polar e podem facilmente atravessar paredes celulares e membranas citoplasmáticas. Assim, os componentes dos OEs atravessam a membrana, fazendo o citoplasma coagular, assim como realiza a desnaturação das proteínas, perturbando as vias metabólicas, como a biossíntese de vários lipídios e, em última análise, levar à morte celular através necrose e apoptose (ANDRADE *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais em especial constituem em misturas de vários compostos lipossolúveis e voláteis, como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides, que podem se difundir facilmente através das membranas celulares, uma grande vantagem no que diz respeito às interações com alvos intracelulares (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

3.4 NANO-EMULSÃO

Segundo Paese (2008), a utilização da técnica nanotecnologia no âmbito da saúde mostra-se promissora, uma vez que apresenta sistemas nanoestruturados com elevada área de superfície aumentando a resposta terapêutica no sítio de ação com tempo prolongado. Os sistemas nanoestruturados (como as nano-emulsões, as nanocápsulas, nanopartículas, cristais líquidos), entre outros, permite o aumento da eficiência de fármacos utilizados na terapêutica atual.

Promovendo alterações nas características de solubilidade do fármaco, diminuição

dos efeitos adversos e/ou colaterais, aumento da eficácia terapêutica, proteção do fármaco frente a fatores de degradação, tais como a luz e o calor, entre outras aplicações (ALICE; RUPPENTHAL; BECK, 2011).

Trados *et al.* (2004) descrevem as nano-emulsões como sistemas dispersos formados a partir de dois líquidos imiscíveis e estabilizadas por uma combinação de agentes tensoativos. Apresentam na fase interna gotículas de tamanho nanométrico, na faixa de 20-200nm, o que lhe traz vantagens como, melhor espalhabilidade e melhor penetração cutânea.

No processo de obtenção da nano-emulsão pode utilizar dois métodos, o de alta ou baixa energia de emulsificação. As técnicas que fazem uso de alta energia recorrem à energia mecânica por meio de alta tensão de cisalhamento, geralmente por meio de homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom (FERNANDEZ *et al.*, 2004). As técnicas de baixa energia de emulsificação, como a temperatura de inversão de fases, utilizam as propriedades físico-químicas dos sistemas para obterem emulsões com gotas muito pequenas (TRADOS *et al.*, 2004).

A prática do uso de óleos vegetais para desenvolver esses sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos é relatada na literatura de forma assídua, como por Morais *et al.* (2008), Andrade *et al.* (2007) e Bernardi *et al.* (2011), no qual se apresenta com valor considerável quando usado como insumo para produções de novos medicamentos com potencial antimicrobiano. Por este motivo, a busca por novas alternativas tecnológicas que aumentem a eficiência de fármacos já conhecidos tem sido intensificada (ETHERIDGE *et al.*, 2013).

3.4.1 *Protium heptaphyllum*

A família *Burseraceae*, amplamente distribuída em áreas tropicais, possui cerca de 750 espécies e 190 gêneros na África, Malásia e nas Américas (SOUZA *et al.*, 2015). Compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies tropicais e subtropicais. Alguns gêneros desta família são produtores de uma seiva oleosa rica em óleo essencial e triterpenos das séries oleano, ursano e eufano (BANDEIRA *et al.*, 2002).

A espécie *Protium heptaphyllum* (Figura 8) é conhecida popularmente como almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha ou almecegueiro bravo, ocorre em todo Brasil, sendo largamente encontrada na região amazônica, onde sua seiva é conhecida como breu branco, goma limão, almécega do Brasil (LORENZI, 1992).

Figura 8 – *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. – aspecto do tronco com resina exsudada.



Fonte: http://www.ulf-mehlig.de/jpg/dunes/du_protium-1-0.html

É encontrada na região amazônica, em vários estados do Brasil e países da América do Sul, sendo caracterizada como aromática perene ou semidecidual, de solo arenoso úmido ou seco e que atinge 10-20 m de altura. Seu caule exala uma resina oleosa chamada almecega ou breu-branco, que endurece ao contato com ar, de cor branco-esverdeada, aroma agradável e rico em óleos essenciais (MOBIN *et al.*, 2017).

A família *Burseraceae* é composta por diversas plantas conhecidas pela produção de resinas amplamente empregadas na indústria de cosméticos, produção de verniz e calafetagem de embarcações de madeira, em rituais religiosos na forma de incenso e na medicina popular. O gênero *Protium* possui espécies com atividade citotóxica, antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatória e acaricida, já conhecidas pela ciência (CAMPORESE *et al.*, 2003; CARRETERO *et al.*, 2008; GONZÁLEZ *et al.*, 1994; PONTES *et al.*, 2007).

De acordo com Bandeira *et al.* (2002), esta espécie é considerada pela medicina popular como um importante agente terapêutico, sendo utilizada como anti-inflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante. Assim como, ela é utilizada na indústria de verniz e calafetagem de embarcações.

Em estudos farmacológicos de Siani *et al.* (1999), foi comprovado que o óleo da resina possui eficácia terapêutica, demonstrando atividades antiinflamatória, antinociceptiva e antineoplásica. Similar aos resultados de Marquina-Chidsey *et al.* (2017) com os óleos obtidos a partir das folhas e resina no qual têm algumas propriedades biológicas, como anti-inflamatórias, antitumorais e antileishmaniose.

Na medicina popular, as resinas das espécies de *Protium* são usadas para muitos propósitos, por exemplo, tônicas e estimulantes, tratamento de úlceras e como agente

cicatrizante. Outros gêneros são descritos como possuindo propriedades anti-sépticas sobre doenças de pele e anti-tumoral (LORENZI, 1992; SIANI *et al.*, 1999; CITÓ *et al.*, 2006). Sua utilização popular como analgésico (CORREIA, 1984) é amplamente difundida, tendo propriedades gastroprotetora e anti-inflamatória comprovadas (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

Estudos preliminares relataram que o óleo essencial da resina e *Protium heptaphyllum* causou a inibição da pleurisia induzida por zymosan ou lipopolissacarídeo em camundongos e verificou-se possuir propriedades antinociceptiva em modelos de ratos. Já existem também relatos de significativa atividade anti-inflamatória do óleo em modelos agudos e crônicos, sendo este efeito decorrente possivelmente da presença de monoterpenos, tais como d-limoneno (AMARAL *et al.*, 2009) e de atividades sedativa, hipnótica e antinociceptiva atribuídas aos terpenos alfa e beta amirina (OLIVEIRA *et al.*, 2005; ARAGÃO *et al.*, 2006).

No estudo realizado por Neto (2011) evidenciou que a resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March associada ao extrato, frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam exercem significativa ação contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo portando possíveis candidatos ao tratamento da Leishmaniose, promovendo o incremento na ativação e capacidade fagocítica de macrófagos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *Protium heptaphyllum* foi gentilmente cedido pela Prof. Rosa Helena Veras Mourão do Laboratório de Bioprospecção e biologia experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA para a execução desse trabalho.

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação da Resina retirada da casca da árvore. A partir desse óleo essencial, foi preparada uma solução na concentração de 6000 ppm, utilizando 300 µL do óleo em 700 µL de DMSO para ser utilizado na realização do ensaio biológico.

4.2 PREPARAÇÃO DA NANOFORMULAÇÃO

Foi utilizado o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* para obtenção de uma nano-emulsão. Para isso, utilizou-se o método de baixo aporte de energia. Em um vial foram adicionados 100 mg do óleo, 100 mg de PEG 600 e 1,8 g de água destilada, com agitação constante até a formação da nano-emulsão. A partir dessa formulação obtida, foi feita uma solução mãe de 6000 ppm, com a mistura de 100 µL da nano-emulsão em 733 µL de água destilada.

4.3 PARASITAS

As formas promastigotas da cepa de *Leishmania (L) amazonensis* (MHOM/BR/2009/M26361) foram cedidas pelo Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. E a seguir, as formas promastigotas desta espécie de *Leishmania* foram primeiramente cultivadas em meio *Schneider's Drosophila Medium* (1x) em frascos de cultura de células com 10 cm² de área com complementação de 15% de soro bovino fetal (Gibco).

4.4 REAGENTES UTILIZADOS

De acordo com estudo realizado por Duran *et al.* (2011), a concentração não tóxica de DMSO foi de até 2%. Uma concentração de 0,5% e 1% de DMSO não influenciou o crescimento dos parasitas conforme determinado microscopicamente. Dessa forma o

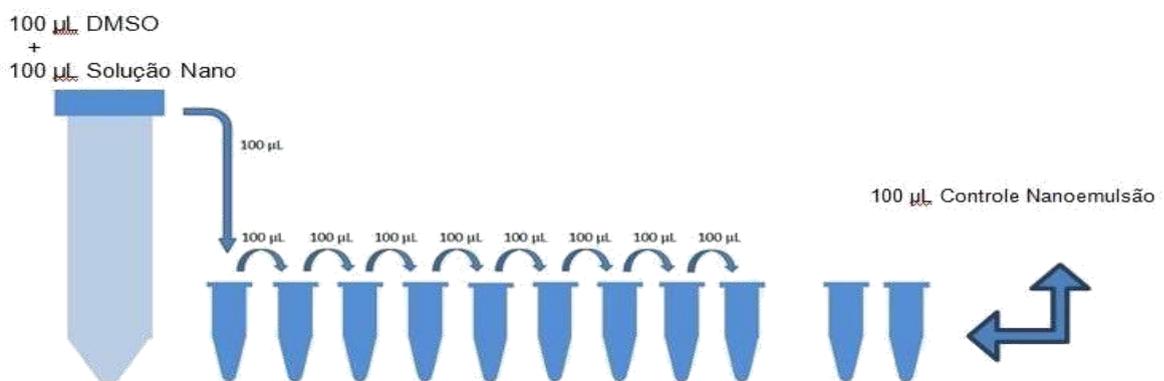
Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado na concentração entre 1 para a solubilização do óleo essencial e nano-emulsão.

4.5 ENSAIO BIOLÓGICO

Para a realização do ensaio foram utilizados três controles: 1 - Cultura de parasitas, 2 - Controle do DMSO em água e 3 - Veículo utilizado no preparo da nanoemulsão. O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços, contendo em cada poço 150 μ L de meio de cultura com a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* com $2,2 \times 10^7$ parasitas/mL.

A solução mãe obtida com o óleo e nano-emulsão na concentração de 6000 ppm foi diluída em DMSO na proporção 1:1, sendo adicionado 1,5 μ L dessa solução no primeiro poço (volume final de 150 μ L), chegando-se a uma concentração de óleo ou nanoemulsão com 30 ppm sendo feito diluições seriadas na proporção de 1:100. As concentrações variaram de 30 μ g/mL à 6g/mL demonstrado na Figura 9.

Figura 9 – Diluição seriada da solução de óleo/ Nano-emulsão.



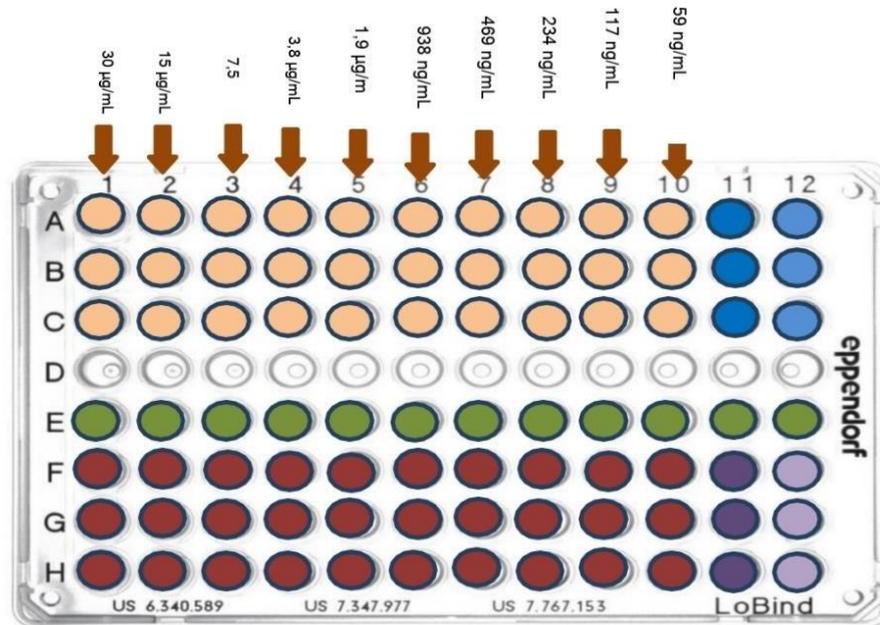
Fonte: O autor, 2021

Posteriormente, a placa foi incubada à temperatura de 25°C por 24 horas, após esse período foi retirado 30 μ L de cada poço para realizar a contagem a partir da motilidade apresentada pelo parasita, no qual foi realizada de acordo com a verificação visual em câmara de Neubauer, e uma nova contagem se deu após 48h de incubação.

Corroborando com o resultado encontrado neste estudo, Cabral *et al.* (2021) demonstra que a espécie vegetal *Protium heptaphyllum* apresenta atividade leishmanicida, aplicando o mesmo método, verificando se o crescimento das formas promastigotas havia sido inibido, conforme revelado pela contagem do número total de promastigotas vivos na câmara de Neubauer com base na motilidade flagelar. Todo o ensaio foi realizado em

triplicata ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Placa do ensaio com 96 poços.



Legenda:

- **Tratamento Óleo:** DMSO + Parasito + Solução óleo
- **Tratamento Nano-emulsão:** DMSO + Parasito + Solução Nano
- **Controle da Nano:** Parasito + tensoativos
- **Controle DMSO:** DMSO + Parasito
- **Controle de crescimento do Parasito:** cultura de Leishmania

Fonte: O autor, 2021

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a estatística foi realizada a Análise Probit e computação LC50 usando *Microsoft Excel*, no qual se calcula a concentração do tratamento utilizado que pode ser 50% eficaz usando a análise Probit.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de cada coluna da placa foram analisadas gerando tabelas que evidenciam a ação das amostras com óleo e nano-emulsão em 24 e 48 horas de exposição à cultura do parasita. A Tabela 1 apresenta a concentração de óleo e nano-emulsão em cada coluna da placado ensaio, e representa em porcentagem a inibição dos parasitas.

Tabela 1 – Percentual de inibição dos parasitas.

Concentração µg/ml (ppm)	Inibição			
	Óleo		Nano	
	24h	48h	24h	48h
30	90%	97%	97%	98%
15	90%	97%	97%	99%
7,5	88%	97%	97%	98%
3,8	90%	97%	97%	97%
1,9	89%	94%	93%	95%
0,938	86%	93%	92%	93%
0,469	86%	91%	89%	92%
0,235	76%	87%	84%	90%
0,118	71%	86%	82%	90%
0,059	64%	85%	82%	89%
Média	44.2	34.6	23.8	19
Desvio padrão	22.8	18.7	15.01	11.6

Fonte: O autor, 2021

Os valores na tabela indicam a porcentagem de inibição dos parasitas após a cultura ser exposta as soluções de óleo e nano-emulsão. Nos poços com a amostra da nano-emulsão percebeu-se maior índice de inibição quando comparado às amostras do óleo, vale ressaltar que houve um aumento significativo da inibição dos parasitas quando comparado a leitura de 24 horas com a de 48 horas, levando em consideração o maior tempo de exposição.

A amostra da nano-emulsão com concentração de 15 µg/ml foi a que apresentou maior inibição dos parasitas com 99% em 48h. E a concentração que teve menor inibição foi de 59 ng/ml na amostra do óleo com 64% de inibição em 24h de exposição, conforme apresentado na Tabela 1.

Para identificação da inibição dos parasitas neste estudo, analisou-se e comparou-se a curva de crescimento do controle dos parasitas, comparando o controle do DMSO e com o controle da nano-emulsão, identificada na Tabela 2, apresentando o menor desvio padrão na amostra da nanoemulsão de 48h.

Tabela 2 – Média de Crescimento dos controles (Leitura na câmara de Neubauer).

Controles	0 Horas (inicial)	24h	DP	48h	DP
Parasitas	33	260.25	54.8	320	81.8
DMSO	33	295.7	62	274	82.7
Nano	33	245	78.9	167	18.8

Fonte: O autor, 2021

A média do controle da curva de crescimento dos parasitas aumentou no decorrer do ensaio, no controle de DMSO percebe-se uma pequena inibição e no controle da nanoemulsão a inibição se apresenta consideravelmente com o tempo de exposição do estudo.

A ação biológica do *Protium heptaphyllum* tem sido demonstrada em diversos trabalhos como os de Lorenzi (1992), Siani *et al.* (1999) e Citó *et al.* (2006) com ação anti-tumoral, Citó *et al.* (2003) e Violante, Garcez e Garcez (2012) com atividade larvicida e ação fungicida sobre *Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans*, e Sincurá *et al.* (2017) com atividade inseticida. No entanto, destes estudos, quase todos realizaram seus ensaios com a resina produzida pela planta, assim como extratos das folhas e cascas. Dessa forma destaca-se nesse ensaio, o resultado potencializado da atividade leishmanicida a partir do uso da nano-emulsão.

De acordo com Obando (2013), no ensaio a dose-resposta permite estabelecer a dose necessária para matar uma porcentagem determinada de indivíduos. Em seguida, leva em consideração os dados de inibição e dose, no qual foi usado a tabela Probit para verificar a taxa de inibição que indicou as concentrações inibitórias letal que matam 50% (CI50) ou 95% (CI95) da população (FINNEY, 1971).

Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida da resina do óleo e da nano-emulsão de *Protium heptaphyllum* contra formas de *Leishmania amazonensis* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Toxicidade *in vitro* do óleo e nano-emulsão de *Protium heptaphyllum* frente à cepa *Leishmania amazonensis*.

Amostras	CI50
Óleo 24h	13,2 ng/mL (0,013 ppm)
Óleo 48h	10,7 ng/mL (0,011 ppm)
Nano-emulsão 24h	6,9 ng/mL (0,007 ppm)
Nano-emulsão 48h	1,2 ng/mL (0,001 ppm)

Fonte: O autor, 2021

Dessa forma, na CI50 das amostras analisadas neste estudo, o óleo e da nano-emulsão em 24 e 48 horas do *Protium heptaphyllum* são consideradas altamente ativos. Conforme o estudo de Andrade *et al.* (2016) e Cabral *et al.* (2020), o que confirma esse achado, quando evidencia que os óleos essenciais com LC50 < 10 µg/mL são considerados altamente ativos.

Quanto à atividade leishmanicida, os valores de CI50, que é a concentração capaz de inibir 50% do crescimento do parasita, é classificado por Andrade *et al.* (2016) e Cabral *et al.* (2020) da seguinte forma: os óleos essenciais cuja IC50 < 10 µg/mL são considerados altamente ativos, quando CI50 > 10 < 50 µg/mL, eles são ativos, enquanto quando CI50 > 50 < 100 µg/mL, eles são moderadamente ativos. São considerados inativos quando CI50 > 100 µg/mL.

Assim como discutido por Roldos *et al.* (2008), no qual as concentrações com toxicidade abaixo de 1000 µg/mL pode ser viável para mais ensaios *in vitro* e *in vivo* para atividades biológicas. Diante disso neste estudo foi possível constatar a atividade leishmanicida ativa, visto os valores apresentados na Tabela 3.

6 CONCLUSÃO

Este estudo apresentou resultados satisfatórios contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, evidenciando atividade biológica significativa do óleo de resina de *Protium heptaphyllum* e quando comparada a sua nano-emulsão, essa se demonstrou mais eficaz, com atividade leishmanicida potencializada.

Apesar das nanoformulações apresentarem eficácia quanto aos testes realizados em micro-organismos, destaca-se a necessidade da realização de novos testes. Desta forma, é imperioso estudos inéditos que investigue os compostos em sua capacidade para ocorrer a atividade leishmanicida da resina da casca de *P. heptaphyllum* e seus mecanismos celulares.

Como perspectivas, o presente ensaio demonstrou favoráveis perspectivas no que se refere ao potencial para desenvolvimento de um novo e seguro medicamento, que utilize o óleo e a nano emulsão descritas, objetivando menos efeitos colaterais que os tradicionais para o tratamento da leishmaniose.

Visto que esses resultados demonstram potencial leishmanicida maior na nano-emulsão elaborada a partir do óleo de *Protium heptaphyllum*, no qual se percebeu que fazer uma nano-formulação a partir do óleo fez com que a atividade leishmanicida aumentasse, assim como investigar a ação dos tratamentos utilizados em modelos de Leishmaniose *in vivo*.

Estudos como este podem fornecer suporte para estudos futuros visando a obtenção de uma formulação farmacêutica a base de óleo de *Protium heptaphyllum*. Os resultados aqui apresentados são um ponto de partida para novos estudos sobre o conhecimento das atividades biológicas da planta *Protium heptaphyllum*.

Tem sido demonstrado que vários óleos essenciais, ou seus constituintes, possuem atividade inibitória contra protozoários. Os resultados do estudo de Cabral *et al.* (2020) também revelaram atividade biológica significativa contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Esses resultados mostram que os OEs de *P. Heptaphyllum* folhas frescas jovens e adultas, principalmente os Oes têm potencial para desenvolver um medicamento novo e seguro com menos efeitos colaterais que os tradicionais em o tratamento da leishmaniose.

Em suma, mais estudos *in vivo* são necessários para investigar os compostos subjacentes atividade antileishmania e citotóxica da espécie *Protium heptaphyllum* e seus mecanismos celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICE, L.; RUPPENTHAL, J. E.; BECK, R. C. R. A inovação em nanotecnologia farmacêutica no bloco econômico do BRIC. **Revista Ciência e Tecnologia**, 14(24/25):65-76, 2011.
- AMARAL, M. P. M.; *et al.* Additional Evidence for the Anti-inflammatory Properties of the Essential Oil of *Protium heptaphyllum* Resin in Mice and Rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28(5):775-82, 2009.
- ANDRADE, F. F.; *et al.* Influência da adição de PEG-12 dimeticona na estabilidade e formação de emulsões contendo cristais líquidos. **Revista Internacional de Ciência Cosmética**, 29:211-218, 2007.
- ANDRADE, M. A.; *et al.* Óleos essenciais: atividade *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*, citotoxicidade e composição química. **BMC Complemento Alternativo Med**, 16(1):444, 2016.
- ANDRADE, P. N. **Estudos *in vitro* e *in vivo* da atividade da neolignana licarina a livre ou associada ao ácido ascórbico sobre *Leishmania amazonensis* sensível e resistente ao antimônio trivalente**. 167 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2017.
- ARAGÃO, G. F.; *et al.* Um possível mecanismo para efeitos ansiolíticos e depressores de alfa e beta-amirina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Farmacologia Bioquímica e Comportamento**, 85:827-834, 2006.
- BANDEIRA, P. N.; *et al.* Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova Basil**, 25: 1078-1080, 2002.
- BENTO, G. A. **Identificação de novos marcadores moleculares para genotipagem de espécies do gênero *Leishmania***. 85f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, 2018.
- BERNARDI, D. S.; *et al.* Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. **Journal of nanobiotechnology**, 9:44-50, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. 5. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2013. 62 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. [recurso eletrônico] [S.l.: s.n.]. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Secretaria de Estado e Saúde. **Boletim Epidemiológico leishmaniose visceral.** Vigilância em Saúde / Gerência Técnica de Doenças Endêmicas. Mato Grosso do Sul: Semana epidemiológica, 2020.

BRITO, A. M. G. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L. e *Mentha piperita* L.** 75f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes. Aracaju, 2007.

BUZANOVSKY, L. P.; *et al.* Major environmental and socioeconomic determinants of cutaneous leishmaniasis in Brazil - a systematic literature review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 53, 2020.

CABRAL, R. S. C.; *et al.* Composição química de óleos essenciais de diferentes partes de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand e sua atividade antibacteriana *in vitro*. **Pesquisa de produtos naturais**, 34:2378-2383, 2020.

CABRAL, R. S. C.; *et al.* Essential oils from *Protium heptaphyllum* fresh young and adult leaves (*Burseraceae*): chemical composition, *in vitro* leishmanicidal and cytotoxic effects. **Journal of Essential Oil Research**, 33:3, 276-282, 2021.

CAMPORESE, A.; *et al.* Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). **Journal of Ethnopharmacology**, 87(1):103-7, 2003.

CARRETERO, M. E.; *et al.* Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (*Burseraceae*) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, 116(1):11-5, 2008.

CITÓ, A. M. G. L.; *et al.* Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 8:4-7, 2006.

CITÓ, A. M. G. L.; *et al.* *Protium heptaphyllum* March (*Burseraceae* resin) chemical composition of essential oil and cytotoxic evaluation with respect to *Artemia salina* Leach. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 52:74-76, 2003.

CORREIA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

COSTA, C. M.; MOUTINHO, F. F. B.; BRUNO, S. F. A experiência do município de Paraty (Rio de Janeiro, Brasil) na prevenção e controle da leishmaniose tegumentar americana. **Parasitol Latino am.**, 59:110-114, 2004.

DURAN, N.; *et al.* GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. **Parasitol Res**, 108:95-105, 2011.

DUTRA, R. C.; *et al.* Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon marginatus* Vogel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19(2A):429-435, 2009.

ETHERIDGE, M. L.; *et al.* The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine**, 9(1):1-14, 2013.

FERNANDEZ, P.; *et al.* Nano-emulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, 251:53-58, 2004.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333 p.

FLORÃO, A. **Avaliação das atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ-FIOCRUZ. **Leishmaniose**. 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/taxonomia-geral-7-doencas-relacionadas/leishmaniose-0>. Acesso em 14 ago. 2021.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1): 71-80, 2003.

GONZÁLEZ, A. G.; *et al.* Screening of antimicrobial and cytotoxic activities of Panamanian plants. **Phytomedicine**, 1(2):149-53, 1994.

LIMA, J. R. **Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente**. 2017. 146f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

LIMA, M. V. N.; *et al.* Treatment of patients with American cutaneous leishmaniasis health services evaluation in northwestern. Paraná, Brasil. **Cad Saúde Pública**, 23(12):2938-2948, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, 1992. p. 312.

MALEKI, F.; *et al.* *In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Leishmania major* to some medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 7(1):37-42, 2017.

MARQUINA-CHIDSEY, G.; *et al.* Evaluation of supercritical fluid extraction of tacamahaco (*Protium heptaphyllum*) resin. **Journal of Essential Oil Research**, 29:6:443-450, 2017.

MENDONÇA FILHO, R. R. Leishmanicidal activity of polyphenolic rich activities of *Caryocar brasiliensis* leaves hydroethanolic extract. **Rev Bras**, 23(12):2938-2948, 2004.

MOBIN, M.; *et al.* Gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry analysis and vasorelaxant effect of essential oil from *Protiumheptaphyllum* (aubl.) March. **Biomed Research International**, 2017.

MORAIS, G. G.; *et al.* Attachment of o/w emulsions containing liquid Crystal from annatto oil (*Bixa orellana*) coffee oil and tea tree oil (*Melaleuca aternifolia*) as oily phase using HLB and ternary phase diagram. **Journal of dispersion science and technology**, 29(2):297-306, 2008.

NETO, B. M. **Efeito do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e da resina de**

***Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. sobre a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonenses*.** 73f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Teresina. 2011.

OBANDO, O. A. A. **Análise da resistência a inseticidas e variabilidade genética de populações naturais de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) da Colômbia e do Brasil.** 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Curitiba, 2013.

OLIVEIRA, F. A.; *et al.* Attenuation of capsaicin- induced acute and visceral nociceptive pain by a- and h- amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Science**, 77:2942-2953, 2005.

OLIVEIRA, F. A.; *et al.* Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resina from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, 49(2):105-111, 2004a.

OLIVEIRA, F. A.; *et al.* Triterpenóides pentacíclicos, alfa, beta- amirinas, suprimem o comportamento de coçar em um modelo derato com prurido. **Pharmacol Biochem Behav.**, 2004b.

OLIVEIRA, L. F. G.; GILBERT, B.; BÔAS, G. K. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Revista Fitos**, 8(1):1-72, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses:** Informe epidemiológico nas Américas. Washington, D.C.: OPAS; 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em 17 ago. 2021.

PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos.** 185 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2008.

PEARSON, R. D. **Leishmaniose.** Manual MSD. Versão para Profissionais de Saúde. 2019. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios-extraintestinais/leishmaniose#top>. Acesso em 17 ago. 2021.

PELLISSARI, D. M.; *et al.* Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 20(1):107-10, 2011.

PONTES, W. J. T.; *et al.* Composição química e atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (*Burseraceae*). **Acta Amazonica**, 37(1):103-109, 2007.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. Uma revisão do status das propriedades medicinais dos óleos essenciais. **Culturas e Produtos Industriais**, 62:250-264, 2014.

ROCHA, M. N. **Desenvolvimento de espécies de *Leishmania* fluorescentes e**

caracterização da susceptibilidade de *L. amazonensis* GFP como modelo para testes quimioterápicos. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Belo Horizonte, 2009.

ROLDOS, V.; *et al.* Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*: *in silico*, *in vitro* and *in vivo* activity studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43:1797-1807, 2008.

ROTTINI, M. M. **Ação de óleos essenciais e do alfa-bisabolol em ensaios experimentais *in vitro* com *Leishmania amazonensis*.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2011.

SALGADO, V. R.; *et al.* The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 111(4):241-251, 2016.

SANTOS, J. B.; *et al.* Fatores sócio-econômicos e atitudes em relação à prevenção domiciliar da leishmaniose tegumentar americana, em uma área endêmica do sul da Bahia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 16(3):701-708, jul-set, 2000.

SARTO, M. P. M.; JUNIOR, G. Z. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, 20(1):98-102, 2014.

SIANI, A. C.; *et al.* Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of ethnopharmacology**, 66:57-69, 1999.

SILVA, N. S.; MUNIZ, V. D. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. **Cad. Saúde Pública**, 25(6):1325-1336, 2009.

SINCURÁ, Y. R.; *et al.* Effect of aqueous extract of *Protium heptaphyllum* (*Burseraceae*) on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), a proven vector of visceral leishmaniasis in Brazil. **Vector Biology Journal**, 2(2):24-26, 2017.

SOUZA, L. R.; *et al.* Caracterização histoquímica de ductos secretores e análise de óleo essencial de espécies de *Protium* (*Burseraceae*). **J. Essent. Óleo Res.**, 28:166-171, 2015.

TRADOS, T.; *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, 108-109:303-318, 2004.

TREVISAN, M. T. S.; *et al.* Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, 26(3):301-304, 2003.

VASCONCELOS, J. M.; *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**, 50(3):221-7, 2018.

VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. **Estudo químico e atividade antifúngica do óleo essencial das folhas de *Aniba heringerii*.** 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2012.

WONG, L.; *et al.* Unusual prevalence of *Leishmania braziliensisbraziliensis* in four families.
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 19:195-196, 1986.