



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALBERTO FONTES DÓRIA

Avaliação do nerol sobre promastigotas e macrófagos infectados com
amastigotas de *Leishmania amazonensis*

SÃO CRISTÓVÃO

2023

ALBERTO FONTES DÓRIA

Avaliação do nerol sobre promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Welber Arrais da Silva

SÃO CRISTÓVÃO

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Dória, Alberto Fontes

D696a Avaliação do nerol sobre promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* / Alberto Fontes Dória ; orientador Wagner Welber Arrais da Silva. – São Cristóvão, SE, 2023.
57 f. : il.

Dissertação (mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, 2023.

1. Biotecnologia. 2. Monoterpenos – Uso terapêutico. 3. Produtos naturais. 4. Macrófagos. 5. Leishmaniose – Tratamento. I. Silva, Wagner Welber Arrais da, orient. II. Título.

CDU 606:615

ALBERTO FONTES DÓRIA

Avaliação do nerol sobre promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Welber Arrais da Silva

1º Examinador: Prof. Dra. Carla Maria Lins de Vasconcelos

2º Examinador: Prof. Dra. Paula Cristina de Souza Souto

“Eu tive muitas coisas que guardei em minhas mãos, e as perdi. Mas tudo o que eu guardei nas mãos de Deus, eu ainda possuo”

MARTIN LUTHER KING

DEDICATORIA

Dedico este trabalho a **DEUS**, grande Arquiteto do Universo, responsável pela minha criação e de todas as outras criaturas. Por cada ar inalado pelos meus pulmões, por acordar cada manhã e por ter a **CERTEZA** que, mesmo com dias difíceis, mesmo com obstáculos, o Senhor proporciona sempre dias melhores, sempre uma nova página a escrever, sempre e para **SEMPRE**....

Aos meus pais **JOSÉ ALBERTO e SIMONE** e a meu irmão **PEDRO**, essas três pessoas muito importantes na minha vida e que sempre vibraram e sorriram comigo em cada sucesso, cada nova etapa alcançada. Eles sabem o quanto são importantes. *“E até os cabelos da vossa cabeça estão todos contados. Não temais pois; mais valeis vós do que muitos passarinhos”* (Lucas cap. 12, versículo 7). Realmente, Senhor, somente o Senhor sabe o que realmente precisamos e nada foge do seu controle, e esses três tesouros foram/são fundamentais na minha vida. **TUDO É SEU** Senhor e nada meu, pois tens a vida em Tua mão.

A minha namorada **Emylle**, por todo o amor a mim destinado, por ser sempre minha mão amiga, aconselhando-me, ajudando-me em todos os sentidos, sendo uma companheira indescritível...Realmente Deus não poderia ter escolhido alguém melhor para que eu pudesse compartilhar a vida...

A minha madrinha **Salette**, por todo o amor empregado e por todos os cuidados que sempre teve comigo e com meu irmão Pedro, cuida de nós como se fôssemos filhos e vibra por cada conquista nossa....

Aos meus amigos do trabalho, **Felipe e Milton**, fiéis companheiros de jornada, por toda compreensão e amizade durante esse período que necessitei ficar ausente em virtude do mestrado.... Vocês são parte dessa vitória...

A ESTES, DEDICO....

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao bom **Deus** pelo Dom da Vida, por ser o Alfa e o Ômega, por sempre proporcionar novas estradas a serem trilhadas, novos caminhos a percorrer.

Humildade, humanidade e companheirismo são algumas palavras que logo surgem em minha mente ao me referir ao **Professor Dr. Wagner Welber**, pessoa da mais ilibada índole, um craque na pesquisa científica, que com toda simplicidade, transmite com serenidade tudo o que devemos ter e quais as qualificadoras para sermos de fato considerados mestres.... Tive a sorte de ter o senhor como orientador durante esses anos.... Meu muito, muito obrigado!!!

Obrigado ao meu pai **Alberto** e minha mãe **Simone**, que foram sempre meus incentivadores, abraçando a ideia do mestrado e me apoiando sempre em cada obstáculo a ser superado...

Obrigado ao meu irmão **Pedro**, por toda a amizade e amor empregados, por ser sempre um amigo que posso contar para qualquer coisa. Deus me abençoou em ter um irmão assim...

Obrigado a minha namorada **Emylle**, pessoa fantástica que Deus me presentou, uma companheira ímpar, com caráter irretocável e minha melhor amiga.... Pessoa tão singular que não necessita muitos comentários...Obrigado por TANTO!!

Ao amigo de caminhada **Jesiel Alves**, meu braço direito durante esse tempo de mestrado, todos os dias vendo esse “cába”...Por mais desgastante que fosse o dia em virtude do trabalho que tínhamos, sempre foi um companheiro irreprensível e um amigo que sabia que podia contar. Nesse pouco tempo, passamos por poucas e boas, hein ?!..

Aos colegas do **LEPAT** (Laboratório de parasitologia), **LABICEL** (Laboratório de Biologia e Imunologia do câncer e Leishmania) e do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da UFS, na figura do **Prof. Ricardo Sher, Tairla, Jileno, Amanda, Leo, Layanne, Iracema** e tantos outros.... Muito obrigado por cada sorriso, cada ajuda, cada angustia compartilhada.... Vocês são demais.... Obrigado também a **todos os funcionários da limpeza, manutenção, segurança** e demais setores da UFS.... Vocês também são parte disso...

DÓRIA, A.F.; ARRAIS DA SILVA, W. W. Avaliação do nerol sobre promastigotas e macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PROBIO), 2023.

RESUMO:

As leishmanioses estão entre as doenças negligenciadas mais importantes do mundo. Trata-se de uma afecção parasitária transmitida pela fêmea de um vetor denominado de flebotomíneo. A transmissão da doença ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea desse vetor, que deposita formas infectantes no hospedeiro vertebrado e desencadeia assim a infecção. A depender da resposta imunológica e do status nutricional e sanitário do indivíduo, e da espécie incriminada na infecção, a doença pode desencadear desde apresentações cutâneas localizadas até a alterações viscerais mais significativamente graves, que quando não tratadas tornam-se fatais. Os tratamentos utilizados como de primeira escolha, como o Glucantime® e o estibogluconato de sódio, e os tratamentos de segunda escolha, como a anfotericina B, mostram-se com muitos efeitos adversos, tempo de tratamento longo, além do surgimento de parasitos resistentes às drogas. A procura por novos compostos terapêuticos com potencial leishmanicida e que possuam menos efeitos colaterais tem guiado as pesquisas mais recentes. Com isso, nosso estudo direcionou esforços para alternativa de tratamento com metabólito secundário de produto de origem vegetal, utilizando nerol, um monoterpeneo muito empregado em perfumarias e já com aplicabilidades biológicas reconhecidas, a citar como antifúngico, ansiolítico, cardioprotetor e protozoaricida. Para avaliação da ação leishmanicida, foram testadas diferentes concentrações do nerol (de 3,25 µg/mL a 100 µg/mL) em culturas de promastigotas (2×10^6 parasitos/ml) colocadas em microplaca de 96 poços, com as diluições feitas em quadruplicata. Após a incubação das promastigotas, a atividade leishmanicida da droga foi avaliada através do método colorimétrico Resazurina. Já a potencial modulação da infecção de diferentes concentrações de nerol (12,5 µg/mL a 400 µg/mL) foi realizada em culturas de macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*, colocadas em placa de 24 poços, pelo período de 24 horas, e tendo como controle positivo o Glucantime®. O último fator a ser analisado foi a citotoxicidade da droga em células de mamífero, com macrófagos peritoneais colocados em placa de 96 poços (2×10^4 células / poço) com a viabilidade celular determinada pelo método colorimétrico de MTT, objetivando mensurar a segurança da droga. O nerol demonstrou um excelente potencial leishmanicida em formas flageladas (promastigotas), com redução concentração-dependente na viabilidade dessas promastigotas, tendo a partir da concentração de 25 µg/mL apresentado uma redução de mais de 65% de da viabilidade em relação ao grupo sem tratamento, além de ter sido capaz de reduzir a taxa de infecção em todas as concentrações testadas em no mínimo 46% se comparado ao controle negativo, com viabilidade celular moderada, reduzindo a carga parasitária em todas as concentrações de nerol quando comparada ao controle sem tratamento e ao controle positivo com Glucantime®, apresentando dessa forma resultados biologicamente interessantes, abrindo espaço para novas pesquisas sobre os mecanismos envolvidos na citotoxicidade do nerol, afim de aperfeiçoá-lo em seu uso terapêutico.

Palavras-chaves: Leishmania, nerol, tratamento, alternativas terapêuticas

DÓRIA, A.F.; ARRAIS DA SILVA, W. W. Evaluation of nerol on promastigotes and macrophages infected with amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Masters dissertation, Graduate Program in Biotechnology (PROBIO), 2023.

ABSTRACT:

Leishmaniasis is among the most important neglected diseases in the world. It is a parasitic disease transmitted by the female of a vector called sand fly. The transmission of the disease occurs during the blood meal of the female of this vector, which deposits infective forms in the vertebrate host and thus triggers the infection. Depending on the immune response and nutritional and health status of the individual, and the species incriminated in the infection, the disease can trigger from localized skin presentations to more significantly severe visceral changes, which, when untreated, become fatal. Treatments used as first choice, such as Glucantime ® and sodium stibogluconate, and second choice treatments, such as amphotericin B, have many adverse effects, long treatment time, in addition to the appearance of parasites resistant to drugs. The search for new therapeutic compounds with leishmanicidal potential and that have fewer side effects has guided the most recent research. With this, our study directed efforts towards an alternative treatment with a secondary metabolite of a product of plant origin, using nerol, a monoterpene widely used in perfumeries and already with recognized biological applicability, to mention as an antifungal, anxiolytic, cardioprotective and protozoaricide. To evaluate the leishmanicidal action, different concentrations of nerol (from 3.25 µg/mL to 100 µg/mL) were tested in cultures of promastigotes (2×10^6 parasites/ml) placed in a 96-well microplate, with dilutions made in quadruplicate. After incubating the promastigotes, the leishmanicidal activity of the drug was evaluated using the Resazurin colorimetric method. The potential modulation of infection with different concentrations of nerol (12.5 µg/mL to 400 µg/mL) was performed in cultures of murine peritoneal macrophages infected with amastigotes of *Leishmania amazonensis*, placed in a 24-well plate, for a period of 24 hours, and having Glucantime ® as a positive control. The last factor to be analyzed was the cytotoxicity of the drug in mammalian cells, with peritoneal macrophages placed in a 96-well plate (2×10^4 cells / well) with cell viability determined by the MTT colorimetric method, aiming to measure drug safety. nerol showed an excellent leishmanicidal potential in flagellated forms (promastigotes), with a concentration-dependent reduction in the viability of these promastigotes, with a concentration of 25 µg/mL showing a reduction of more than 65% in viability compared to the group without treatment, in addition to being able to reduce the infection rate at all concentrations tested by at least 46% compared to the negative control, with moderate cell viability, reducing the parasite load at all concentrations of nerol when compared to the control without treatment and to the positive control with Glucantime ® , thus presenting biologically interesting results, making room for new research on the mechanisms involved in the cytotoxicity of nerol, in order to improve its therapeutic use.

Keywords: Leishmania, nerol, treatment, therapeutic alternatives

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Produtos naturais e terpenos.....	07
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Geral.....	10
2.2. Especificos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Animais.....	11
3.2. Obtenção e manutenção dos parasitos.....	11
3.3. Macrófagos peritoneais.....	11
3.4. Obtenção dos compostos químicos.....	12
3.5 Ação leishmanicida <i>in vitro</i> do nerol sobre as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	12
3.6. Infecção e tratamento das culturas de macrófagos peritoneais por amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	12
3.7. Análise da carga parasitária e taxa de infecção das culturas de macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i>	13
3.8. Determinação da citotoxicidade do nerol em macrófagos peritoneais através do MTT.....	13
3.9. Análise Estatística.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Avaliação do potencial leishmanicida do nerol em culturas de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	16
4.2. Determinação da taxa de infecção e carga parasitária em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	17
4.3. Avaliação da citotoxicidade do nerol em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c através do ensaio colorimétrico de MTT.....	20
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural da molécula do nerol (*cis*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol), disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/50949>, acessado em 14/11/22.....9
- Figura 2.** Efeito do nerol sobre a viabilidade da cultura de promastigotas de *Leishmania amazonensis*.....15
- Figura 3.** Taxa de infecção dos macrófagos peritoneais submetidos a tratamento com nerol e grupos controle negativo (CTL- Controle sem tratamento) e positivo (com GLUCA-Glucantime ®)16
- Figura 4.** Carga parasitária demonstrando a quantidade média de amastigotas por célula de macrófagos infectados. Notar diferença significativa entre os tratamentos com nerol e os grupos controles.....18

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Grupos de tratamento das culturas de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.....13
- Tabela 2.** Taxa de infecção diminuída após tratamento com nerol e com controle positivo, carga parasitária (número de amastigotas por célula após 24 horas de tratamento) e redução da quantidade de parasitas dentro da célula após tratamento com nerol e Glucantime ®.....18
- Tabela 3.** Atividade citotóxica do nerol em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c.....20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina trifosfato

CCBS: Centro de ciências biológicas da Saúde

CTL: Controle

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ELISA: Ensaio da imunoabsorção enzimática

GLUCA: Glucantime ®

GTP: Guanosina trifosfato

IC50: Taxa de inibição de 50% do parasita

IFN- γ : Interferon gama

LC: Leishmaniose cutânea

LCL: Leishmaniose cutânea localizada

LM: Leishmaniose mucosa

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LV: Leishmaniose visceral

MS: Ministério da saúde

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NO: Óxido nítrico

OES: Óleos essenciais

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em cadeia da polimerase

SF: Solução fisiológica

SINAN: Sistema de informação de agravos de notificação

TNF: Fator de necrose tumoral

UFS: Universidade Federal de Sergipe

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente um quarto da população mundial é afetada por doenças causadas por protozoários. Dentre essas enfermidades, as leishmanioses estão entre as dez mais importantes doenças que acometem humanos. Essa doença tem uma vertente antroponótica, sendo ocasionada por espécies de parasitas do gênero *Leishmania spp.* que podem ser transmitidas ao homem por intermédio da picada de insetos vetores hematófagos (WHO, 2021).

Os primeiros relatos e a origem remetem ao início da doença na antiguidade. Três hipóteses são apresentadas para essa origem: paleártica – sugere que a *Leishmania* se originou na região paleártica, uma área envolvendo Europa, Ásia, norte da Arábia e África, no período Paleoceno, sustentada por registros fósseis que indicam que flebotomíneos ancestrais e roedores também evoluíram na região paleártica durante o período Paleoceno. A hipótese Neotropical, onde admite-se uma origem de *Leishmania* na região Neotropical, com mamíferos como os primeiros hospedeiros vertebrados e, por fim, a hipótese de Supercontinente, com a quebra do supercontinente Gondwana, na região Mesozóica, onde mamíferos seriam os primeiros hospedeiros vertebrados e com os eventos de vicariância (fragmentação de uma espécie ancestral em duas ou mais áreas) foram fatores que contribuíram para a separação da linhagem (NOYES, 1998; KERR, 2000; Harkins et. al., 2016).

As leishmanioses foram disseminadas em todo o planeta pelo ser humano durante as primeiras migrações humanas e novas espécies de *Leishmania spp.* patogênicas para humanos estão por ser descobertas (STEVERDING, 2017). O termo *Leishmania*, remete à descrição do parasito feita pelo patologista escocês, o tenente-coronel Sir William Leishman, que é referenciado junto ao Major irlandês Charles Donovan, pela descoberta do parasita que causa a Leishmaniose Visceral (LV). O médico britânico Ronald Ross publicou artigo, em 1903, concluindo que os corpos ovoides encontrados nos baços de pacientes com esplenomegalia e piroxia crônica não eram tripanossomas degenerados, mas sim um novo organismo protozoário e que o quadro se assemelhava ao de calazar, sendo então posteriormente definitivo o emprego do termo *Leishmania* (ROSS, 1903; STEVERDING, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há entre 700 mil e 1 milhão de casos novos da doença ao ano (WHO, 2022). Ainda segundo OMS, 92 países são endêmicos ou já reportaram casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), ao passo que 83 países são

endêmicos ou já notificaram casos de Leishmaniose Visceral (LV) (WHO, 2022). No Brasil, concentram-se 14% dos casos de LV relatados no mundo, considerado ainda um país com transmissão dita em expansão. Com relação à LTA, somente em 2020, o Brasil notificou 17.772 casos da enfermidade (MS, 2020; WHO, 2021).

Alguns fatores são considerados cruciais para o entendimento dessa doença, como a minuciosa identificação da espécie *de Leishmania spp.* (PIRAJÁ LUCHEIS, 2014), e no que tange à prevalência da doença em muitas regiões do Brasil, itens como a falta de manejo e saneamento, negligência de indústrias farmacêuticas em investir em novas terapias, condições de moradia e falta de uma boa nutrição estão entre os fatores mais determinantes para a perpetuação do problema (MACHADO et. al., 2020).

O que se observa é um paralelo estabelecendo igualdade proporcional, quando a elevação da incidência de doenças infecciosas ou parasitárias está diretamente ligada às mais precárias condições socioeconômicas dos habitantes, a condições menores de saneamento em regiões do território brasileiro mais vulneráveis socioeconomicamente (MARCHI et. al., 2019).

Dentre essas regiões, o Nordeste, segundo dados do Ministério da Saúde, representa mais do que um terço dos casos de leishmanioses diagnosticados em todo o território brasileiro (MS/2020). Nessa grande região brasileira, Sergipe, o menor dos estados, com 21.926,908 km² de extensão territorial, vem desde o início do Século XX relatando casos de leishmanioses em seu território (SANTOS et al., 2018). Em uma análise dos casos diagnosticados no período compreendido entre 2007 a 2020, em Sergipe, 109 casos de LTA foram confirmados, ao passo que 842 casos de LV foram notificados (SANTOS et. al., 2018; SS/SE, 2020).

Existem mais de 20 espécies de mamíferos, incluindo roedores, carnívoros e humano (que é um hospedeiro acidental), que podem ser reservatórios da *Leishmania spp.* (MOKNI, 2019). O cão (*Canis lupis familiaris*, Linnaeus 1758), exerce, nas cidades, o principal papel de reservatório da infecção, por ser o principal mamífero não-humano, incriminado no ciclo zoonótico de LV, ainda que outras espécies como gatos e aves domésticos, já foram detectadas com o parasito; ao passo que, no âmbito da LTA, os animais domésticos ainda não têm uma correlação de atuação como reservatórios domésticos da doença (SS/PR, 2018; DANTAS-TORRES,2019). No que tange à LTA especificamente, já foram registradas espécies de marsupiais, e roedores como os principais hospedeiros e candidatos a reservatórios naturais no ambiente silvestre (VASCONCELOS et.al., 2018).

As leishmanioses são causadas por parasitas com ciclos digenéticos, isto é, o organismo precisa de ao menos dois hospedeiros para ter seu ciclo evolutivo completado. A infecção do hospedeiro vertebrado (mamíferos, incluindo o homem) acontece durante o repasto sanguíneo das fêmeas de insetos vetores, chamados de flebotomíneos. Esses insetos inoculam as formas promastigotas metacíclicas, e uma vez que essas formas estão no hospedeiro vertebrado, ocorre a fagocitose dessas por meio de macrófagos, que é uma das células pertencentes ao sistema retículo endotelial, e essas formas ficarão então restritas ao fagolisossoma (junção de fagossomo com lisossoma), cujo ambiente interno é ácido e faz com que os promastigotas se diferenciem em amastigotas, que se multiplicarão por divisão binária simples. Com a alta carga parasitária, os macrófagos rompem-se, liberam as amastigotas que infectarão novas células, levando deste modo, ao estabelecimento do processo infeccioso no hospedeiro vertebrado (TEIXEIRA et. al., 2013; BATES, 2018; GALVÃO, 2019). As fêmeas de flebotomíneos, durante o hematofagismo, ingerem as amastigotas livres no hospedeiro vertebrado, e essas, por sua vez, se diferenciam no interior do inseto em promastigotas, replicando-se e, no trato digestório do inseto, alguns protozoários diferenciam-se em promastigotas metacíclicos, fechando o ciclo (NEVES, 2022).

Após a infecção do hospedeiro vertebrado (mamíferos), a resposta imunológica tem papel fundamental na evolução fisiopatológica desta zoonose. Sabe-se que várias citocinas estão envolvidas no contexto da infecção leishmaniótica, sobretudo o Interferon gama (IFN- γ) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF), ativando estes os macrófagos, que produzem radicais livres (principalmente Óxido Nítrico - NO) no interior de fagolisossomos, e destroem as amastigotas, controlando a infecção (RODRIGUES, 2016). De fato, macrófagos ativados pelo TNF e IFN- γ em hospedeiros infectados por *Leishmania spp* possuem níveis aumentados de Óxido Nítrico, sendo o NO uma molécula que, juntamente com espécies reativas de oxigênio em macrófagos, é determinante na eliminação do parasita intracelular (FREITAS, 2010; CONCEICAO-SILVA e ALVES, 2014).

Dessa forma, dependendo do status imunológico do hospedeiro vertebrado (a citar os seres humanos), sua condição nutricional, comorbidades e, sobretudo, da espécie de parasita envolvida em cada transmissão, o desenvolvimento da infecção reverbera em diferentes situações e manifestações clínicas (MUNIZ, 2017; BURZA et. al., 2018).

A leishmaniose visceral ocorrerá em infecções causadas por espécies viscerotrópicas, ou seja, *Leishmania infantum* e *L. donovani*. A LV é considerada a forma mais grave da doença, e, se não tratada, pode levar o indivíduo à óbito. No ser humano, ela pode causar:

febre, esplenomegalia, hepatomegalia, hemorragias, edemas, emagrecimento progressivo e até morte (BURZA et. al., 2018). No Brasil, essa forma é endêmica em muitas áreas urbanas, apresentando como agente etiológico a *L. infantum* (SANTOS, 2019).

Já a Leishmaniose tegumentar americana (LTA), ocorrerá em infecções causadas por espécies dermatrópicas. Pode levar a lesões cutâneas (Leishmaniose cutânea –LC) e em mucosas (Leishmaniose mucosa-LM). No Brasil, a maioria dos casos é causada pela espécie *Leishmania braziliensis*, que produz uma das principais formas clínicas da leishmaniose tegumentar: a Leishmaniose cutânea localizada (LCL) e lesões em mucosas que podem ser desfigurantes e estigmatizantes (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014). A espécie *L. amazonensis*, usada nesse trabalho, é considerada uma espécie dermatrópica, por causar, na maioria das vezes, lesões cutâneas e em casos raros, lesões cutâneas difusas, com presença de nódulos não ulcerados na pele (BRASIL, 2017).

O diagnóstico precoce da infecção corrobora para um prognóstico favorável e está baseado na observação direta do parasita (diagnóstico direto) ou em testes imunológicos (diagnóstico indireto), que buscam a detecção de resposta imune contra o parasito. De fato, o principal desafio nos ensaios diagnósticos de infecção por *Leishmania spp.* nos últimos anos tem sido alcançar o teste padrão ouro para estabelecer programas estratégicos eficazes para controlar e tentar erradicar a doença (OLIVEIRA e FERNANDES, 2014; ELMAHALLAWY et. al., 2014). Dentre os exames de diagnóstico direto, estão o exame microscópico por meio de aspirado de órgãos e tecidos e a cultura do parasita. Ao passo que, os métodos moleculares de diagnóstico, como os ensaios de biologia molecular para detecção do DNA do parasita (Reação em cadeia de polimerase- PCR) apresentam uma alta sensibilidade e mostra-se uma ferramenta menos invasiva e bastante confiável para um diagnóstico em larga escala (ELMAHALLAWY et. al., 2014).

Além das dificuldades de diagnóstico, o efetivo controle das leishmanioses esbarra na presença de animais silvestres susceptíveis ao parasitismo (zoonose), na diversidade de espécies com capacidade vetorial e potencial sinantrópico, no avanço de áreas construídas e diminuição das florestas e na ausência de inovação terapêutica (DRUMOND E COSTA., 2011; VIRMOND, 2011).

Sendo assim, o controle das leishmanioses requer abordagens integradas, como uso regular de inseticidas, mosquiteiros, limpeza de quintais e terrenos, evitar exposição nos períodos de maior atividade do vetor (do entardecer ao anoitecer), repelentes tópicos e, sobretudo, determinação de áreas de risco, para possibilitar a redução desses vetores nas

proximidades de humanos (DANTAS-TORRES et. al., 2019). Além dos esforços para se conter o vetor transmissor, no âmbito do controle das leishmanioses, as mais recentes estratégias dependem do diagnóstico célere da enfermidade, sempre que for possível, associado com abordagens quimioterápicas para minimizar sintomas da doença e a transmissão continuada do parasita (DE OLIVEIRA, et.al., 2020).

Afora a dificuldade de obtenção de diagnóstico precoce e a instituição de um tratamento seguro e eficaz disponíveis para as leishmanioses, sem mencionar a diversidade de espécies do parasito que dificulta a obtenção de vacinas, o fato dos vetores transmissores possuírem hábitos ecléticos e ocuparem diferentes nichos ecológicos e a presença de reservatórios (mamíferos) em ambiente silvestre e antrópico, um dos fatores que mais estão impactando na problemática da doença é a falta de inovação medicamentosa para tratamento das leishmanioses, configurando um cenário de negligência que esta importante zoonose se encontra (OLIVEIRA et. al., 2013; TELES, 2022).

No entanto, uma das formas de contenção da doença é justamente uma terapêutica eficaz e, desse modo, várias tem sido as drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses. As drogas ditas de primeira escolha na terapêutica são os antimoniais pentavalentes (Sb): antimoniato de N-metil-glucamina-(Glucantime ®) e estibugluconato de sódio. Ambos apresentam tratamento longo, elevado custo, além de efeitos colaterais cardiológicos e outros efeitos nocivos (alta toxicidade), além de serem, por vezes, ineficazes (BRASIL,2014; NAGLE et. al. 2014; TIWARI et. al., 2018).

Gaspar de Oliveira Vianna desenvolveu, na década de 10 do século XX, os antimoniais pentavalentes, que além de tóxico, já foram descobertos muitos episódios de resistência medicamentosa, sobretudo em áreas endêmicas, além de sua forma de administração, que se dá por via intramuscular ou endovenosa (BRASIL, 2017). Como se desencadeia a sua ação no organismo ainda é pouco compreendido, mas acredita-se que o antimoniato altera a atividade bioenergética do parasito, acarretando na sua morte por perda de moléculas energéticas, de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP). (SILVA, 2017). O principal dos efeitos colaterais dos antimoniatos é a arritmia cardíaca, mas injúria renal e pancreática também podem ocorrer (MENEZES-FILHO et. al., 2019; HENDRIX et. al., 2019).

Já como abordagem de segunda escolha, em casos em que o uso dos antimoniais, por alguns fatores, não se mostrou eficaz, utiliza-se anfotericina B, ou anfotericina B Lipossomal, que são drogas utilizadas como antifúngicos advindo de uma cepa de bactérias da espécie

Streptomyces nodosus. A anfotericina B lipossomal foi uma forma produzida a fim de minimizar os incômodos efeitos adversos da anfotericina B, porém tem elevado custo e o seu mecanismo se dá por toxicidade seletiva no ergosterol, na membrana do parasito, desencadeando alteração na integridade da membrana, resultando em vazamento de íons e, finalmente, levando à morte celular. Efeitos adversos como náuseas, dor de cabeça e nefrotoxicidade tem sido relatados (ZHANG et. al.,2020; KUMARI et. al., 2022).

Em pacientes impossibilitados de usar os fármacos de primeira escolha, seja por imunocomprometimento ou por resistência medicamentosas, a anfotericina B lipossomal é considerada de primeira escolha. Além de que, a associação da anfotericina B lipossomal com outra droga com ação leishmanicida, a miltefosina, tem obtidos excelentes resultados em paciente com supressão da imunidade (MONGE MAILLO E LOPES-VELEZ, 2021).

As pentamidinas, do grupo das diramidinas, são drogas que atuam em casos também que não respondem aos antimoniais, estando na sua elevada toxicidade um obstáculo à sua ampla implementação em protocolos terapêuticos, apresentando efeitos como náuseas, vômitos, hepatotoxicidade, tosse, hipotensão, nefrotoxicidade, hipoglicemia e até morte súbita. A droga pode ser administrada por via intravenosa ou intramuscular. A pentamidina interfere na síntese de poliamina, na atividade de RNA polimerase, entra na célula do protozoário ligando-se ao RNA de transferência e impede a síntese de proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidios e folato. Além desse mecanismo, as pentamidinas possuem excelente ação anti-inflamatória (HAFIZ e KYRIAKOPOULOS, 2022).

A miltefosina, desenvolvida como uma substância anticancerígena, é uma molécula anfifílica (característica hidrofílica e hidrofóbica), composta por ésteres de fosfocolina de um álcool de cadeia longa. Seu mecanismo de ação ainda está sendo investigado, e tem sido relacionado a inibição da síntese da membrana celular. É a única droga eficaz administrada contra leishmaniose por via oral disponível no mercado. Apresenta taxas de cura de até 90% dos casos após sua introdução inicial. Por outro lado, o elevado custo e o aumento da resistência têm limitado seu uso a combinações com outras drogas. Apesar de eficiente, também pode produzir efeitos colaterais gastrointestinais, distúrbios reprodutivos e até, mais recentemente descoberto, problemas articulares intensos. Mesmo assim, mostra-se uma alternativa viável para uma ampla gama de espécies de *Leishmania spp.*, principalmente com associações terapêuticas empregadas (BERMAN 2005; ARMITAGE et. al., 2018; GHORBANI e FARHOUDI, 2018; ROAT et. al., 2020; DAGA et. al., 2021).

O emprego de derivados de metais, metais de transição e semimetais também tem sido visto em experimentos com uma certa regularidade. O rutênio, por exemplo, já teve sua atividade testada em modelos experimentais de leishmanioses (SALAMA, 2013). Metais de transição como o zinco, cobre, ferro e níquel foram complexados a outras substâncias e tiveram boas respostas em macrófagos infectados, embora novos estudos sejam necessários para o aprimoramento dos mecanismos de atuação dos compostos e a concentração ideal para cada espécie de parasito (RICCI, 2015).

1.1 Produtos naturais e terpenos

Diante do exposto, é visto que se faz necessário novos estudos utilizando alternativas terapêuticas para tratamento da leishmaniose, com diminuição de efeitos adversos, maior eficiência, menor custo (GALVÃO, 2019). As plantas medicinais advêm de uma cultura milenar de um amplo grupo de nações espalhados pelos continentes e vêm ganhando um grande espaço no âmbito da pesquisa científica devido às recorrentes descobertas de seus benefícios e propriedades fitoterápicas (SANCHITA E SHARMA, 2018).

Considerando o fato de serem mais acessíveis e sustentáveis, o tratamento com produtos naturais oriundos de ordem vegetal deve ser preconizado em estudos, dado os efeitos colaterais que se tem com o uso de fármacos de primeira frente no combate às leishmanioses (BORGES et. al., 2017).

Os compostos derivados de bases vegetais, a citar, os óleos essenciais (OES), têm cada vez mais ganhado corpo nas pesquisas mais recentes, conseguindo bons resultados nos testes *in vitro*, colocando OES como promissores nos experimentos científicos de alternativas de tratamento. Diversos estudos demonstraram uma correlação positiva entre a utilização de plantas usadas no Brasil e a atividade leishmanicida desempenhada por seus derivados (BRITO et. al. 2013; SILVA et. al., 2014; PEREIRA, 2014; SALAMA et. al., 2017; TELES, 2022).

Os terpenos encontrados em OES, por exemplo, são sabidamente compostos já descritos com atividades fungicidas, bactericidas e leishmanicidas, apresentando índices bons e esperançosos, para mais estudos *in vitro* e *in vivo* (SILVA et. al., 2020, TELES, 2022). Dentre esse grupo dos terpenos, tem-se os monoterpênicos, que tem demonstrado potencial terapêutico contra Malária, Esquistossomose, Tuberculose, Doença de Chagas e Leishmaniose (COELHO et.al., 2016).

O composto monoterpeneo pineno, majoritário dentre os derivados de plantas da espécie *Thymus hirtus*, *Agaricus campestris* e *Myrtus communis*, apresentou atividade leishmanicida moderada quando usado de forma isolada contra *L. amazonensis* (RODRIGUES et al., 2015). Ao passo que, um outro estudo mostrou os monoterpeneos α -pineno, p-cimeno e 1,8-cineol, compostos mais representativos nos OES de plantas do gênero *Protium* sp., sendo eficientes contra as formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* *in vitro*, tendo a IC50 dos OES de uma das espécies do gênero da planta testada, apresentado valor de 14,8 $\mu\text{g/mL}$ para promastigotas e 7,8 $\mu\text{g/mL}$ para amastigotas. Na citotoxicidade para macrófagos, não foi observada toxicidade na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ com os OES testados no estudo. A viabilidade dos macrófagos foi cerca de 90%, mesmo a 200 $\mu\text{g/mL}$ (SANTANA, 2020).

No grupo dos monoterpeneos, o nerol, que é muito utilizado em produtos cosméticos e aromatizantes, possui uma ampla gama de atividades biológicas. O nerol (cis-2,6-dimetil-2,6-octadien-8-ol) tem potencial de diversos tratamentos *in vitro* e *in vivo*. Esse monoterpeneo têm estudos já demonstrando atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-helmínticas. (NOGUEIRA et. al., 2013; ALMEIDA et. al., 2014; COSTA et. al., 2014; SILVA et. al., 2014).

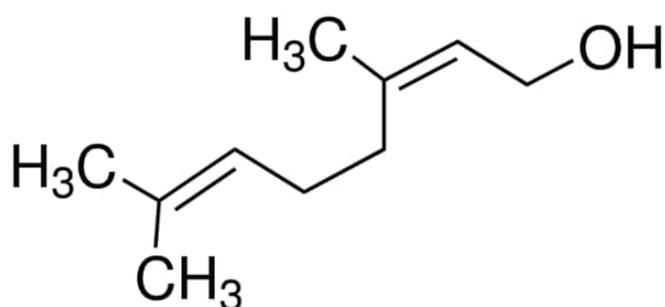
O nerol é encontrado em óleos de várias espécies vegetais, como as do gênero *Humulus* sp., *Cymbopogon* sp., *Rosa* sp., *Lavandula* sp., e foi primeiramente isolado do óleo de Neroli, obtidos das flores da laranja amarga (*Citrus x aurantium*), o que justifica seu nome. É um isômero cis (apresenta a mesma fórmula molecular) do geraniol (KUMAR et. al., 2013, MSAADA et. al., 2012).

TIAN et. al. (2013) já relataram potente ação antifúngica do nerol. Quanto à viabilidade celular da droga, SILVA et. al. (2021), utilizando teste de azul de tripano, demonstraram uma diminuição significativa na viabilidade celular, sobretudo a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Usando o teste de integridade mitocondrial (MTT), na concentração máxima testada de 1000 $\mu\text{g/mL}$, as células exibiram atividade celular diminuída (SILVA et. al., 2021).

OES contendo monoterpeneos, sobretudo o nerol, como composto majoritário, foram extraídos das folhas de *Lippia alba* (Mill.), e, quando testados quanto à sua atividade para com *Leishmania* spp, este apresentou atividade antipromastigota de *L. amazonensis* com IC50 de 50,8 $\mu\text{g/mL}$ (SANTOS, 2016). Nessa mesma linha, tendo como um dos compostos majoritários o nerol, os óleos essenciais da planta malva-cheirosa (*Pelargonium graveolens*),

tiveram atividade leishmanicida confirmada, com número de parasitas reduzidos em mais de 90% do seu total, tendo um potencial leishmanicida, na amostra avaliada, maior do que a de anfotericina B, isso para *L. infantum* e *L. major* (ESSID et. al., 2015). Mais recentemente, outros terpenos tiveram ratificadas sua ação em amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* (ARAÚJO et. al., 2022).

Além disso, SILVA et. al. (2021), observaram um número significativo de trabalhos envolvendo propriedades biológicas de alguns monoterpenos, como o nerol, embora o potencial leishmanicida deste terpeno em particular ainda não foi bem descrito, encontrando-se limitado na literatura, apresentando então promissoras investigações, o que mostra a relevância de estudo dessa alternativa terapêutica (SILVA et. al., 2021). Isto posto, nosso trabalho se baseia na avaliação, *in vitro*, da atividade do nerol em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, assim como mensurar a sua toxicidade sobre a célula de mamífero.



NEROL

Figura 1: Fórmula estrutural da molécula do nerol (*cis*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol), disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/50949>, acessado em 14/11/22.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar atividade biológica do terpeno nerol no modelo experimental da leishmaniose.

2.2. Específicos

1. Estudar o potencial leishmanicida do nerol em culturas de promastigotas de *L. amazonensis*.
2. Avaliar o potencial do nerol sobre a infecção de macrófagos com amastigotas de *L. amazonensis*.
3. Avaliar citotoxicidade do nerol em células de mamífero

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas, SPF (Specific pathogen free), foram fornecidos pelo Centro de bioterismo da Fiocruz - Bahia. Os animais foram mantidos com água e ração estéreis fornecidos no biotério do Departamento de Fisiologia- CCBS/UFS. Todos os procedimentos foram executados de acordo com os princípios éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com aprovação do comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal de Sergipe (Número de registro: 26/2017).

3.2. Obtenção e manutenção dos parasitos

A espécie utilizada neste trabalho foi a *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), gentilmente cedida pelo laboratório da Dra. Selma Giorgio (UNICAMP). As formas amastigotas foram mantidas em camundongos BALB/c através de inoculação subcutânea de 2×10^6 parasitos no coxim plantar da pata direita traseira, em repiques mensais de 20 μ L. A partir das lesões desenvolvidas, os camundongos, por deslocamento cervical, foram sacrificados e a pata infectada retirada. O tecido da ferida leishmaniótica raspado com bisturi em solução fisiológica (SF) e a solução obtida foi filtrada em gaze estéril para remoção dos resíduos. Os amastigotas foram contados em câmara de Neubauer (SALAMA, 2013). Já as formas promastigotas foram mantidas a 26 ° C em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 25 μ g/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino, pH 7,2 (ARRAIS-SILVA et al., 2005).

3.3. Macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram obtidos em colaboração com o Laboratório de Histologia e Embriologia da Professora Rosilene Calazans, do Departamento de Morfologia da UFS. Após a eutanásia dos camundongos BALB/c, procedeu-se à antissepsia com a colocação de álcool 70% na região abdominal, incisão na linha média do abdômen do animal e posteriormente injetou-se um volume de aproximadamente 5 ml de tampão fosfato-salino (PBS). Realizou-se massagem abdominal por cerca de 1 minuto e após isso foi feita a

aspiração do conteúdo líquido abdominal para posterior análise e contagem das células. Os macrófagos foram então cultivados sob condições propostas por AYRES et. al. (2007).

3.4. Obtenção dos compostos químicos

O nerol (*cis*-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol) (98%; peso molecular 154,25 g.mol⁻¹), foi adquirido da Sigma-Aldrich ® (St. Louis, Missouri, EUA).

3.5 Ação leishmanicida *in vitro* do nerol sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase metacíclica (definidas pela curva de crescimento), foram distribuídas em placas tipo ELISA com 96 poços em concentração de 2×10^6 parasitos/mL, em meio de cultura Schneider (Sigma®), acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibiótico. A solução fora então incubada por 24 horas em estufa incubadora tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) a 26° C na presença de diferentes concentrações de nerol. As diluições foram feitas em quadruplicata. Após a incubação das promastigotas, a atividade leishmanicida da droga foi avaliada através do método colorimétrico Resazurina. Após o período de incubação das promastigotas com a droga, 20 µL de solução de Resazurina (10% do volume total) fora adicionado a cada poço. A placa foi então incubada por mais duas horas no escuro e depois a absorbância da amostra foi medida no leitor de ELISA a 570 nm (ALTMAN, 1974. MOSMANN, 1983; DENIZOT E LANG, 1986; CAMPOS, 2008).

3.6. Infecção e tratamento das culturas de macrófagos peritoneais por amastigotas de *L. amazonensis*

As culturas de macrófagos peritoneais foram quantificadas e ajustadas para uma densidade final $2,5 \times 10^5$ células /poço. Um volume de 200µL, com essa concentração de células, foi distribuído em uma placa de 24 poços sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após uma hora, os macrófagos foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* na razão de 5 amastigotas para 1 macrófago e mantidos em estufa a 37 °C e 5% CO₂ durante 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram tratadas, em quadruplicata, de acordo com o grupo correspondente conforme a tabela abaixo:

GRUPOS	Tratamentos
1	400 µg/mL
2	200 µg/mL
3	100 µg/mL
4	50 µg/mL
5	25 µg/mL
6	12,5 µg/mL

Tabela 1. Grupos de tratamento das culturas de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.

As concentrações do nerol foram determinadas com base em alguns trabalhos relatados na literatura e adaptado de acordo com os testes realizados (TEIXEIRA et. al., 2019). Sendo assim, as doses utilizadas no presente trabalho são adaptações obtidas após vários experimentos.

Todos os tratamentos e o grupo controle (negativo e Glucantime) foram homogeneizados em meio DMEM e distribuídos no volume de 200 µL por poço. A incubação ocorreu por 24 horas mantidas nas mesmas condições experimentais anteriores e, após esse período, foram fixados em metanol por 10 minutos e corados com Kit Panótico Rápido (DIGILAB), de acordo com recomendações do fabricante (ARRAIS-SILVA et al., 2005; GOMES, 2015). As lamínulas, em quadruplicata, foram coladas com Entellan e montadas em lâminas.

3.7. Análise da carga parasitária e taxa de infecção das culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

As análises da taxa de infecção e carga parasitária foram verificadas por contagem em Microscópio óptico comum e contador de células. O campo avaliado foi quantificado por 100 macrófagos totais, dentre os quais foram diferenciados em infectados por amastigotas de *Leishmania amazonensis* e não infectados, além do número médio de parasitas intracelular. A carga parasitária foi avaliada pela razão entre o número de parasitas intracelular e o número de macrófagos infectados (ARRAIS-SILVA et. al., 2005). A taxa de infecção (T.I.) foi obtida por regra de três simples, conforme a exemplificação seguinte:

Macrófagos totais 100%
Macrófagos infectados ----- x (T.I)

3.8. Determinação da citotoxicidade de células de macrófagos peritoneais através do MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazólio). Macrófagos peritoneais, mantidos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibiótico, foram distribuídos em placas de 96 poços (2x10⁴ células / poço) e incubados por 24 h em 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as células aderidas foram tratadas com os compostos e concentrações de 400 a 3,125 µg/mL e mantidos nas mesmas condições anteriores por 24 horas. O grupo controle, células não tratadas, foi considerado com 100% viabilidade. A dosagem e incubação do MTT foram realizadas conforme recomendação do fabricante (Life Technologies, USA) e a absorbância foi medida em um leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm (SALAMA et al., 2017). Os resultados da viabilidade foram verificados como porcentagem pela relação entre a absorbância (células tratadas) e a absorbância de células controle, com resultado desta relação multiplicado por 100. A escala de intensidade foi usada para classificar a citotoxicidade dos compostos: com atividade (95 a 100 % de viabilidade), com atividade moderada (viabilidade celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (viabilidade menor que 50 %), segundo RODRIGUES *et al.* (2014).

Concisamente, efetuou-se primeiro a extração dos macrófagos peritoneais em camundongos Balb/c, colocou-se uma alíquota de 10 µL em câmara de Neubauer para efetuar a contagem celular. Com esses dados obtidos, procedeu-se o cálculo do meio com regra de três simples. O resultado dessa contagem será o valor total de meio somado com o volume contendo as células. Distribui-se, posteriormente, 200 µL do meio com as células em placa de 96 poços. Após 4 horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionados 200 µL do composto nerol já previamente preparados nas concentrações de 400 µg/mL a 3,125 µg/mL e mantidos por 24 horas sob as mesmas condições de estufa relatadas. Após esse período, o composto fora retirado, e os poços lavados com PBS e posteriormente colocado MTT nos poços (200 µL por poço) e deixado na estufa por 3 horas. Após, procedeu-se então a leitura da placa e a medição da absorbância num leitor com comprimento de onda de 570 nm (SALAMA et. al., 2017).

3.9. Análise Estatística

O método de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett foram utilizados para análise dos resultados obtidos. Os testes estatísticos foram realizados no software Graph Pad Prism 8.0.2 (2019) e no Microsoft Excel (2016) com suplemento Action 2.4. (Adaptado de ARRAIS-SILVA, 2003). Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do potencial leishmanicida do nerol em culturas de promastigotas de *L. amazonensis*.

A análise da atividade metabólica (viabilidade) de culturas de promastigotas de *L. amazonensis* submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de nerol foi realizada através do método colorimétrico (Resazurina). Como mostra a Figura 2, o tratamento com nerol por 24 horas mostrou efeito em todas as concentrações testadas de maneira concentração-dependente. De fato, fora observado que somente nas concentrações de 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL, houve efeito moderado, com redução da viabilidade de 18,25% ± 1.835, 29,21% ± 1.167 e 58, 62% ± 2.933, respectivamente, quando comparada com a condição controle (não tratada). Foi interessante notar que o tratamento com 25 µg/mL de nerol reduziu fortemente a viabilidade parasitária (66% ± 1.589 de redução comparada ao controle). Este efeito foi intensificado, sugerindo ação concentração-dependente, em concentrações elevadas do óleo essencial, como ocorreu com 50 µg/mL e 100 µg/mL, com reduções de 90% ± 4.158 e 99% ± 1.224, respectivamente, em relação à condição não tratada.

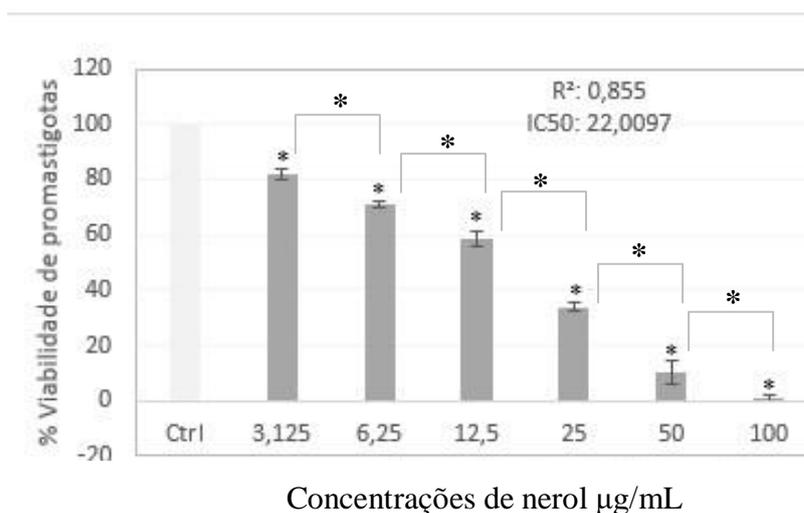


Figura 2: Efeito do nerol sobre a viabilidade da cultura de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados apresentados estão expressos em Média ± DP (Análise de Variância (Anova) seguido do teste de Dunnett). O grau de significância da diferença entre o tratamento é mostrado na figura quando * $p < 0,05$. [indica diferença significativa entre os tratamentos.

4.2 Determinação da taxa de infecção e carga parasitária em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. amazonensis*

Após os resultados indicarem ação leishmanicida do nerol em formas promastigotas, passou-se a análise do potencial do nerol em culturas de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Conforme esperado, a condição experimental não tratada (controle negativo) apresentou elevados índices de infecção, com 83,5% das células estando parasitadas. Também conforme o esperado, a condição tratada com a droga de primeira escolha, Glucantime[®], na concentração de 300 µg/mL, apresentou redução na porcentagem de células parasitadas em torno de 26,5% se comparada à condição controle negativo 24 horas pós o tratamento, com 57% dos macrófagos parasitados com amastigotas de *L. amazonensis*.

Já tratamento com nerol, em nossas condições experimentais, foi capaz de reduzir a infecção de macrófagos por amastigotas em todas as concentrações testadas e de maneira concentração-dependente. Conforme mostra figura 3, macrófagos submetidos a 12,5 µg/ mL de nerol, apresentaram 37,5 % de infecção, ou redução de 46% quando comparado ao controle negativo. Essa redução da porcentagem de células infectadas manteve-se evidente em culturas submetidas ao tratamento com 25 µg/mL de nerol, com apenas 29% das células infectadas. Ao aumentar a concentração para 50 µg/ mL, notou-se mais uma vez uma redução, mostrando uma estabilidade na redução, com 24% dos macrófagos infectados, havendo então uma progressão de redução estável, mais uma vez ratificada na concentração de 100 µg/ mL, que apresentou 21,6% das células infectadas, com mais de 60% de redução ao controle negativo. Na concentração de 200 µg/ mL, 16% dos macrófagos infectados, apresentado uma redução 5% maior do que a redução da concentração de 100 µg/ mL. Por fim, a maior concentração testada no nosso experimento, apresentou 11% de macrófagos parasitados. Este índice de infecção é cerca de 70% menor que a condição não tratada e 45% menor que a condição controle positivo (Tabela 2). Um fato relevante foi a constatação de que, o controle positivo, representado pelo Glucantime[®], apresentou uma taxa de redução mais baixa que as concentrações do nerol testadas.

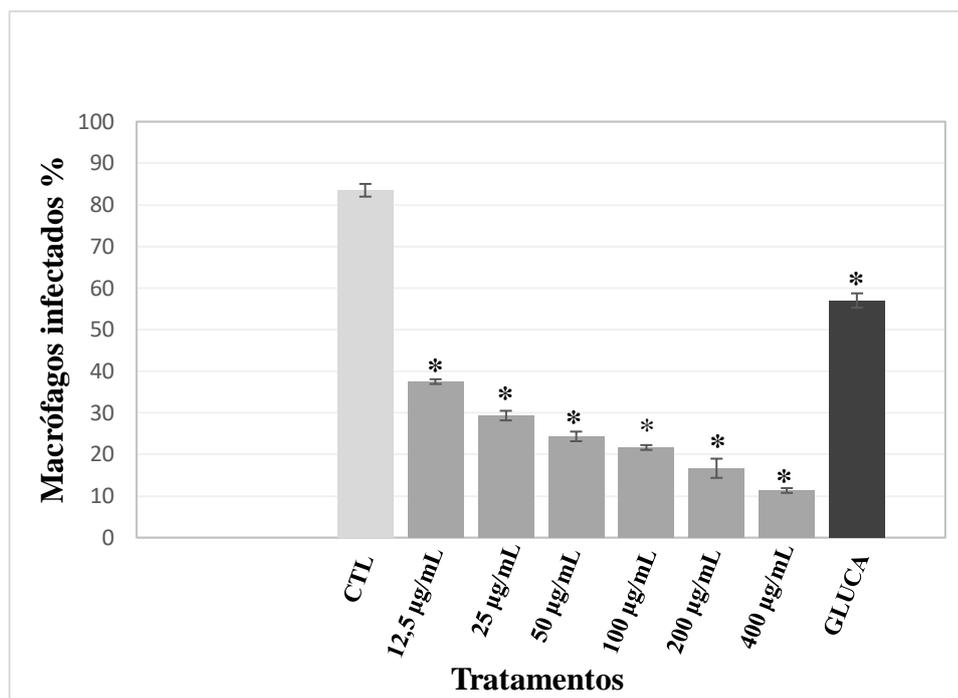


Figura 3: Taxa de infecção dos macrófagos peritoneais submetidos a tratamento com nerol e grupos controle negativo (CTL- Controle sem tratamento) e positivo (com GLUCA- Glucantime ®). Os resultados apresentados estão expressos em Média ± DP. (Análise de Variância (Anova) seguido do teste de Dunnett). O grau de significância da diferença entre o tratamento é mostrado na figura quando * $p < 0,05$.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Porcentagem de macrófagos infectados após o tratamento(%)	Número de amastigotas por macrófago após tratamento	Redução da taxa de infecção em relação ao grupo controle sem tratamento (%)
NEROL	12,5	37,5 ± 0,577	1,75 ± 0,055	46
NEROL	25	29,3 ± 1,154	1,49 ± 0,035	54,2
NEROL	50	24,3 ± 1,54	1,51 ± 0,045	59,2
NEROL	100	21,6 ± 0,577	1,6 ± 0,200	61,9
NEROL	200	16,6 ± 2,309	1,80 ± 0,040	66,9
NEROL	400	11,3 ± 0,577	1,47 ± 0,021	72,2
GLUCANTIME	300	57 ± 1,732	3,37 ± 0,335	26,5
CONTROLE NEGATIVO(SEM TRATAMENTO)	-	83,5 ± 1,527	3,19 ± 0,045	-

TABELA 2. Taxa de infecção diminuída após tratamento com nerol e com controle positivo, carga parasitária (número de amastigotas por célula após 24 horas de tratamento) e redução da quantidade de parasitas dentro da célula após tratamento com

nerol e Glucantime ®. Os resultados, a exceção da redução da taxa de infecção em relação ao grupo controle, estão expressos Média \pm DP. (Análise de Variância (Anova) seguido do teste de Dunnett).

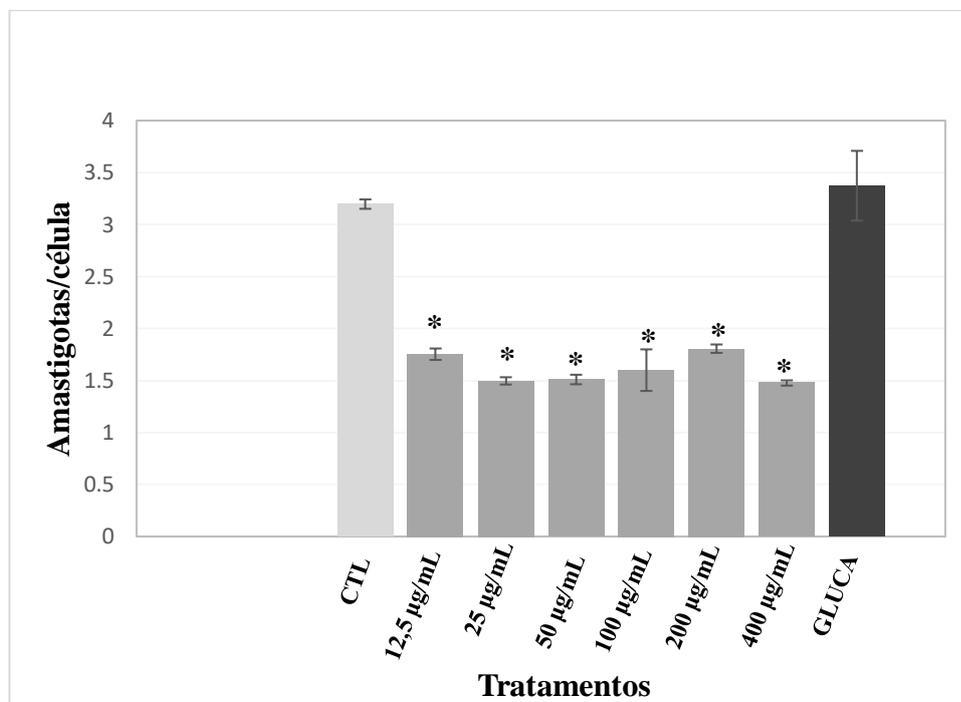


Figura 4. Carga parasitária demonstrando a quantidade média de amastigotas por célula de macrófagos infectados. Notar diferença significativa entre os tratamentos com nerol e os grupos controles. Os resultados estão expressos Média \pm DP. (Análise de Variância (Anova) seguido do teste de Dunnett). O grau de significância da diferença entre o tratamento é mostrado na figura quando * $p < 0,05$.

Com a boa relação concentração-dependente do nerol em infecção de *L. amazonensis*, o próximo passo foi a análise da carga parasitária, isto é, quantas amastigotas estão presentes em cada célula fagocítica, sendo um importante determinante para se mensurar a ação leishmanicida de uma droga nos modelos *in vitro* aqui testados. No delineado experimental, no grupo controle negativo, foi evidenciada uma proporção de 3,19 amastigotas por célula. Nos tratamentos com a droga nerol, na menor concentração testada, a de 12 $\mu\text{g/mL}$, apresentou 1,75 formas amastigotas para cada uma célula, ao passo que quando se dobrou essa concentração, obteve-se uma proporção de 1,49 amastigotas por célula, diminuindo a carga. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, quase a mesma proporção foi encontrada, cerca de 1,5 amastigotas por célula, mostrando então uma manutenção da carga. Quando se dobrou a

concentração, na de 100 µg/mL, um ligeiro aumento na carga parasitária: 1,6 amastigotas por célula. Nas maiores concentrações, de 200 e 400 µg/mL, foram observadas, respectivamente, as proporções de 1,81 e 1,5 amastigotas por célula. Um fato digno de nota, foi que o grupo controle positivo, com o Glucantime®, apresentou, dentre todas as variáveis de tratamento (inclusive o grupo controle negativo), aquela com a maior carga parasitária, com cerca de 3,4 amastigotas por célula. Esses elementos resultantes nos mostram que a carga parasitária, nesse caso, não está acompanhada necessariamente da redução de células infectadas (Figura 4).

4.3 Avaliação da citotoxicidade do nerol em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c através do ensaio colorimétrico de MTT

Com um bom índice de redução de infecção e da carga parasitária, foram testados os tratamentos com as variadas concentrações do nerol, a fim de avaliar se o óleo seria tóxico para as células de mamíferos, e a citotoxicidade foi analisada com a utilização do método de viabilidade celular colorimétrico usando o MTT, nas diferentes concentrações apresentadas.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Viabilidade (%) com desvio padrão(±)
NEROL	3,125	90,4346 ± 0,74
NEROL	6,25	94,1766 ± 0,98806
NEROL	12,5	90,7903 ± 0,5209
NEROL	25	88,2424 ± 0,053
NEROL	50	88,0513 ± 0,3516
NEROL	100	90,7613 ± 0,50045
NEROL	200	90,4237 ± 0,75709
NEROL	400	85,4804 ± 0,86488
CONTROLE NEGATIVO(NÃO TRATADO)	-	100

TABELA 3. Atividade citotóxica do nerol em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os resultados estão expressos em porcentagem com desvio padrão ± dos valores.

Foi considerado como viabilidade celular de 100% o grupo controle negativo. A viabilidade do Glucantime[®], uma droga muito utilizada como controle positivo, já teve sua viabilidade celular testada em macrófagos peritoneais murinos não infectados, apresentando uma viabilidade de 87,45 %, na concentração padrão de 300 µg/mL, após 24 horas de exposição ao Glucantime[®] (PRITSCH, 2015). Para análise da citotoxicidade, nosso grupo de pesquisa estabeleceu parâmetro de classificação segundo RODRIGUES et.al. (2014), tendo grupos de viabilidade considerados: com atividade (variando de 95 a 100% de viabilidade), atividade considerada moderada (70 a 90% de viabilidade), e sem atividade quando a viabilidade for menor que 50%. Dessa forma, ao analisarmos os resultados dos testes de citotoxicidade celular com o nerol, observamos que a maioria das concentrações é considerada com atividade dita moderada, apresentando cerca de 90% de viabilidade celular, ao passo que 3(três) concentrações, as de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 400 µg/mL, tiveram valores de viabilidade menores que 90%, mas continuam também classificados com atividade moderada, ou seja, ainda com relevância no contexto de análise citotóxica celular. Todavia, podemos notar um dado interessante, que, as concentrações maiores não necessariamente apresentaram valores de viabilidade celular menores que as doses menos elevadas utilizadas, mantendo-se ainda assim com valores biologicamente interessantes, porém com atividade de viabilidade moderada.

5. DISCUSSÃO

A melhora da terapêutica de implementação para pacientes com leishmaniose tem ganhado destaque em virtude, dentre outros fatores, da ineficiência dos tratamentos atuais, altos custos, alta toxicidade, além da especificidade da espécie do parasita (MUNIZ, 2017; BURZA et. al., 2018). Os esforços têm sido direcionados em desenvolver novas ferramentas de alternativas de tratamento para melhorar a acessibilidade à droga e minimizar os efeitos adversos. O emprego de tratamentos alternativos é realizado através de experimentos envolvendo metais, semi-metais, além de extratos de plantas medicinais, sendo a utilização de produtos naturais para fins medicinais uma técnica utilizada há mais de 3000 anos, tendo sido empregado inicialmente no Egito antigo. Dentre os compostos derivados de produtos naturais, estão os óleos essenciais, como os monoterpenos, e destacam-se como alguns dos mais utilizados. Esse grupo de terpenos possuem 10 moléculas de carbono em sua composição química, e tem sido frequentemente usado em estudos que ratificaram diversas ações biológicas relevantes, como anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antifúngica, cardioprotetora, ansiolítica, antitumoral e antileishmania (LEAL-CARDOSO et. al, 1999; KALEMBA et. al., 2003; HAMID et.al., 2011; ROMERO E ROMERO, 2014; SANTOS, 2019; MEI-YAN BAI et. al., 2022).

Na classe dos monoterpenos, o nerol (cis 3-7-Dimethyl-2-6-octadien-1-ol) é um monoterpeno com algumas propriedades biológicas importantes e com aplicações relevantes, como metabólito secundário obtido de diversas plantas, como *Lippia alba* (erva cidreira), *Rosa dasmascena* (rosa-chá), *Citrus aurantium* (Laranja-da-terra) (INOUYE et al., 2001; PIMENTEL et. al., 2007; BORBA et. al., 2021). Dessa forma, nosso trabalho avaliou a atividade do nerol frente à *Leishmania amazonensis*, nas variáveis aplicáveis de viabilidade em formas promastigotas do parasita, a taxa de infecção em macrófagos de mamífero, assim como testamos o nível de toxicidade celular e viabilidade da droga.

Terpenos já tiveram efeitos anti-leishmania testados tanto na forma amastigota do parasito como na sua forma flagelar (promastigota) (LIMA et.al, 2015). No entanto, nenhum trabalho havia mostrado o efeito de nerol no modelo experimental das leishmanioses. O primeiro quesito avaliado então foi a viabilidade em formas promastigotas do parasita, e nossos resultados apontaram uma IC50 em culturas de promastigotas de 22 µg/mL, apresentando resultados próximos aos já descritos na literatura com outros terpenos, como os de MONDEGO-OLIVEIRA et. al. (2021), utilizando como compostos majoritários

sesquiterpenos B-caryophyllene, Germacrene D, Caryophyllene oxide, α -humelene e α -copaene, e observaram atividade leishmanicida com IC50 de 39 $\mu\text{g/mL}$, frente a promastigotas de *L. infantum*. Nos testes de viabilidade celular com promastigotas verificou-se, a partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, uma redução de mais de 50% da viabilidade, corroborando com os achados de LIMA et. al. (2015).

Nossos resultados aplicando desafio terapêutico em promastigotas também se assemelham aos de SANTANA et. al. (2020), que, trabalhando com óleos essenciais de duas espécies de plantas amazônicas *Protium altosnii* (PaEO) e *Protium hebetatum* (PhEO), contendo como constituintes majoritários compostos monoterpênicos 1,8- cineole, α -pinene e p-cymene, observaram redução da inibição das formas flageladas de *L. amazonensis* à medida em que a concentração da droga era aumentada, demonstrando efeito também concentração-dependente.

Esse efeito concentração-dependente já havia sido notado por ARRUDA et. al. (2005), analisando atividade do terpeno nerolidol em cultura de promastigotas de *L. amazonensis* quando um efeito dependente da concentração da droga já foi percebido com apenas decorridas duas horas de experimento, tendo se intensificado o efeito após 24 horas de incubação das culturas, sobretudo nas concentrações mais inferiores. A IC50 do nerolidol para promastigotas de *L. amazonensis* foi de $85,22 \pm 5,45 \mu\text{g/mL}$. A atividade do nerolidol ainda foi testada contra duas outras espécies de *Leishmania sp.*, com uma IC50 para promastigotas de *L. brasiliensis* de $74,15 \pm 10,51 \mu\text{g/mL}$, e para formas flageladas da *L. chagasi* um valor de $75,10 \pm 22,9 \mu\text{g/mL}$, indicando uma ampla susceptibilidade *in vitro* dentro do gênero *Leishmania sp.* A potência então da droga utilizada no nosso experimento, parece ser superior ao do nerolidol para formas promastigotas (ARRUDA et. al., 2005).

Analisando a atividade leishmanicida *in vitro* de extratos de *Croton blanchetianus* (EECB), conhecido popularmente como Marmeleiro-da-caatinga, ricos em terpenos, PEREIRA et. al. (2020) observaram que, embora tivesse sido encontrada uma diferença significativa entre a IC50 para promastigotas de *L. amazonensis* e a IC50 para *L. infantum* (considerando que a IC50 da *L. amazonensis* foi três vezes menor que a de *L. infantum*), foi observado que na menor concentração testada, a de 100 $\mu\text{g/mL}$, houve redução de cerca de 70% na sobrevivência de promastigotas de *L. amazonensis* e esse mesmo índice de redução só foi encontrado nos testes com *L. infantum* utilizando uma dose três vezes maior. Nossos resultados também evidenciaram redução significativa, de mais de 95% na sobrevivência nessa mesma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, pelo período de 24 horas de experimento. É

importante salientar que esse resultado nos mostra a relevância que a espécie do parasita incriminada na infecção tem sobre determinantes de índices e variáveis de mensuração biológica, como a IC50 (PEREIRA et.al., 2020).

Tendo obtido bons resultados na avaliação da viabilidade com promastigotas, avaliamos então a taxa de infecção em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*. Como esperado, macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* sem tratamento (controle negativo) mostraram altos níveis de células parasitadas (figura 3), 83,5%. Semelhante taxa de infecção foi observada por MARQUES et. al. (2021), que obtiveram porcentagem de infecção superior a 80%. SOUZA et.al. (2018) também evidenciaram que macrófagos sem tratamento apresentaram índice de infecção em torno de 80%, quando infectados com *L. amazonensis*. Já a condição experimental, no controle positivo usado nesse trabalho, Glucantime®, obteve 57% de células infectadas, e 25% de redução em relação ao grupo controle, resultado menor que o achado por GÉLVEZ et. al. (2021), que obtiveram mais de 50% de redução com a utilização do Glucantime® como tratamento positivo em relação ao grupo sem tratamento.

No presente experimento, notou-se que a concentração de 25 µg/mL já se mostrou capaz de reduzir em mais de 50% a infecção se comparado ao controle negativo, ao passo que o nosso controle positivo reduziu aproximadamente metade dessa quantidade (Tabela 2).

ARRUDA et. al. (2009) no ensaio de tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, submetidas a tratamento com monoterpeno limoneno na concentração de 300 µg/mL, obtiveram 78% de redução na taxa de infecção, resultado semelhante aos do nosso experimento, que foi de aproximadamente 67% de redução em relação ao grupo sem tratamento, porém numa concentração inferior, que foi de 200 µg/mL, por um período de 24 horas.

Nos testes de infecção com a droga nerol, pode-se perceber uma redução da taxa de infecção proporcional ao aumento da concentração da droga, isto é, um efeito dose dependente. WANG et. al. (2020), também verificaram que o nerol poderia ter maior efeito deletério na membrana do fungo *Candida albicans* à medida que se aumentava a dose empregada. ALBUQUERQUE et. al. (2020) também sugeriram que quando se emprega o uso de tratamentos com monoterpenos em infecções leishmanióticas, nota-se uma redução significativa da infecção em concentrações elevadas.

Nossos dados também sugeriram que o tratamento com nerol foi capaz de reduzir o número de amastigotas por macrófago (Figura 4) em cerca de 40%, em concordância com

SANTANA et. al. (2020), que observaram uma redução da carga parasitária em torno de 50 a 60% com o tratamento à base majoritariamente dos monoterpenos 1,8- cineole, α -pinene e p-cymene, em macrófagos infectados em relação ao grupo infectado não tratado. No entanto, não houve um efeito concentração-dependente, visto que em todas as concentrações testadas a redução na carga parasitária intracelular se manteve estável. SALAMA et.al. (2017), obtiveram resultados similares ao presente trabalho, ao tratar cultura de macrófagos com boldina, substância derivada do boldo (*Peumus boldus Molina*) foi capaz de reduzir o número de amastigotas por célula, mas sem efeito diretamente proporcional ao aumento da concentração. Para PEREIRA et. al. (2017), a carga parasitária por si só não parece ser um bom preditor de progressão da doença e que, muitas vezes, a infecção depende do sistema imunológico do hospedeiro e da resposta individual.

Com atividades do potencial do nerol obtendo índices interessantes de redução da infecção, passamos então à análise da sua citotoxicidade frente a células de mamífero. Como esperado, a maior concentração do nerol (400 $\mu\text{g/mL}$), apresentou a mais elevada citotoxicidade e conseqüente menor viabilidade celular, com cerca de 85 % de viabilidade, sendo considerada uma viabilidade moderada, segundo classificação proposta por RODRIGUES et.al. (2014). A concentração que apresentou melhor viabilidade foi a de 6,125 $\mu\text{g/mL}$, considerada boa viabilidade com 94% de células viáveis após 24 horas de tratamento (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por SANTANA et.al. (2020), quando após análise de citotoxicidade obtiveram viabilidade variando entre 85 a 98%, utilizando monoterpeno α -Pineno frente à macrófagos de mamífero. Podemos considerar que esses efeitos podem estar associados a uma boa seletividade da droga contra *Leishmania amazonensis*, podendo esses mesmos efeitos estarem vinculados a danos mitocondriais, prejudicando, portanto, a divisão do citoplasma em novas células, acarretando na redução da taxa de multiplicação do agente parasitário (PEREIRA et. al., 2020).

SILVA et. al. (2021) observaram uma diminuição significativa na viabilidade celular apenas com a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de nerol, utilizando células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), ao passo que, nesse mesmo estudo, dessa vez utilizando células de hepatomas HepG2/C3A, após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de nerol, foi observada diminuição significativa de viabilidade celular a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a viabilidade celular, mesmo na maior concentração testada em células de hepatomas, manteve-se superior a 70%.

COELHO et.al. (2022) relataram efeitos citotóxicos significativos do nerol em ensaios com eritrócitos de camundongos e também *in vivo* utilizando o fungo *Saccharomyces cerevisiae* em todas as concentrações da droga testadas, divergindo dos resultados encontrados em nosso trabalho. Com o nerol possuindo, dentre os compostos avaliados, o maior potencial de produzir hemólise de forma concentração-dependente e mostrando também ação antirradical livre proeminente nos ensaios no respectivo experimento.

Embora saibamos que a atividade de compostos testados *in vitro* não seja equivalente à atividade de tratamentos com drogas já usualmente prescritos na terapêutica, os monoterpenos tem apresentado uma toxicidade contra os parasitas de 200 a 500 vezes maior do que para células humanas, por exemplo, acarretando num bom índice de seletividade dessas drogas para células do homem, despertando interesse no aprofundamento de avaliações envolvendo essa classe de terpenos (SOARES PETRI et. al., 2016; YALLUF et. al., 2016).

Os resultados de citotoxicidade em macrófagos murinos do nosso estudo tornam-se também importantes pois se sabe que, apesar de algumas drogas possuírem boa aplicabilidade leishmanicida em formas amastigotas, por outro lado isso costuma estar concomitantemente associado a elevados índices de toxicidade para células de mamíferos, o que não ocorreu no nosso trabalho (PEREIRA et.al., 2020). Interessante notar também que a citotoxicidade envolvendo terpenos é semelhante, *in vitro*, com a citotoxicidade de drogas já utilizadas amplamente como alternativa terapêutica para o tratamento das leishmanioses, como a miltefosina (CAMARGOS et. al., 2014).

Apesar de um dos mecanismos de ação leishmanicida dos derivados metabólicos dos óleos essenciais mais aceito ser o dano gerado à membrana celular, considerada a característica de hidrofobicidade dos compostos monoterpênicos, pesquisas mais recentes apontam para múltiplos fatores envolvidos na ação microbicida desses derivados dos óleos essenciais (DI PASQUA et. al., 2007; HYLDGAARD et. al., 2012; YALLUF et. al., 2017).

ROTTINI et. al. (2015), realizando estudo ultra-estrutural, verificaram danos gerados na membrana mitocondrial com a IC50 do terpeno testado, sugerindo inibição metabólica do parasita. WANG et. al. (2015), concluíram que o tratamento utilizando nerol frente ao fungo *Aspergillus niger* foi eficiente pois o nerol propiciou mudanças na permeabilidade da membrana, inibindo o microorganismo. O nerol também parece ter como alvo a inibição da biossíntese de ergosterol, inibindo o crescimento do patógeno, levando à ruptura da membrana do agente etiológico; um mecanismo de ação semelhante ao de uma das principais

drogas leishmanicidas utilizadas, a Anfotericina B, colocando então o nerol como promissor em terapêuticas leishmanicidas (WANG et. al., 2015).

6. CONCLUSÕES

- O nerol foi eficiente na redução da viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis*.
- O tratamento com nerol reduziu a infecção de macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.
- O nerol apresentou atividade citotóxica moderada sobre células de mamíferos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, R.D.D.G., OLIVEIRA, A.P., FERREIRA, C., PASSOS, C.L.A., FIALHO, E., SOARES, D.C., AMARAL, V.F., BEZERRA, G.B., ESTEVES, R.S., SANTOS, M.G., ALBERT, A.L.M., ROCHA, L. Anti-Leishmania amazonensis activity of the terpenoid fraction from Eugenia pruniformis leaves. **An Acad Bras Cienc.** 2020 Dec 7;92(4):e20201181

ALMEIDA, A.A.C, et al. Potenciais efeitos antioxidantes e ansiolíticos do epóxido de (+)-limoneno em camundongos após teste de enterrar bolinhas de gude. **Pharmacol Biochem Behav** 2014; 118: 69-78

ALTMAN, F.P. Studies on the reduction of tetrazolium salts. **Histochemistry Journal**, v. 38, p.155-171, 1974.

ARAÚJO, I.A.C.; DE PAULA, R.C.; ALVES,C.L.; FARIA, K.F.; OLIVEIRA, M.M.; TAKARADA, G.G.M.; DIAS, E.M.F.A.; OLIVEIRA, A.B.; SILVA, S.M. In vitro efficacy of isoflavonoids and terpenes against Leishmania (Leishmania) infantum and L. amazonensis, **Experimental Parasitology**, Volume 242, 2022, 108383, ISSN 0014-4894

ARMITAGE EG, GODZIEN J, ALONSO-HERRANZ V, LÓPEZ-GONZÁLVEZ Á, BARBAS C, PEÑA I, et al. Interação complexa entre o metabolismo de esfingolípídios e esteróis revelada por perturbações no metaboloma de Leishmania causadas por miltefosina . Antimicrobiano . Agentes . **Chemother** . 2018; 62 (5):1–12

ARRAIS-SILVA, W. W. ; COLHONE, M. C. ; AYRES, D. C. ; SOUTO, P.C. S. ; GIORGIO, S. **Effects of hyperbaric oxygen on Leishmania amazonensis promastigotes and amastigotes. Parasitology International**, v. 54, p. 1-7, 2005.

ARRAIS-SILVA, W. W. ; Pinto EF ; Rossi-Bergmann B ; GIORGIO, S. . Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of Leishmania amazonensis-induced soft tissue lesions in mice. **Acta Tropica** , Holanda, v. 98, n.(no prelo), p. 130-136, 2006.

ARRAIS-SILVA, W.W. **Efeitos da hipóxia e do oxigênio hiperbárico nos modelos in vitro e in vivo da leishmaniose.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. 63f. 2003.

ARRAIS-SILVA, W.W.;NUNES, P.S.G. ; CARVALHO, J.D. ; BRUNE, M.W. ;ARRAIS-LIMA, C. ;BATALINI, C. . Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of *Pterodonpudescens*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 561-565, 2014.

ARRUDA DC, MIGUEL DC, YOKOYAMA-YASUNAKA JK, KATZIN AM, ULIANA SR. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. **Biomed Pharmacother**. 2009 Nov;63(9):643-9.

ARRUDA, D.C., D'ALEXANDRI, F.L., KATZIN, A.M., ULIANA, S.R. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**. 2005 May;49(5):1679-87.

AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*.**Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v 102. P. 215-20. 2007

BASTOS, T.S.A.; MADRID, D.M.C.; LINHARES, G.F.C. Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015 293

BATES, P.A. Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nat Microbiol**. 2018 May;3(5):529-530.

BORBA, C. A.; FERNANDES, G. V. .; CAMPOS, J. C. .; SILVA, T. B. da .; GONZAGA, R. V. . Potential action on the central nervous system of neroli oil extracted from *Citrus aurantium*. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e418101321447, 2021.

BORGES, J.C.; RAMOS, A.S.; SANTANA, L.M.B.; SILVA, G.C.L. **Potencial terapêutico leishmanicida de produtos naturais contra *Leishmania Amazonensis*.** II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde. Editora Realize. 2017.

BRASIL. **Leishmaniose Visceral Canina, Um Manual para o clínico veterinário**, WSPA, 2011. http://www.wspabrasil.org/Images/Manual-Leishmaniose-WSPA-Brasil-2011_tcm28-24593.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em saúde**, Brasília, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2.ed.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRITO, A. M. G. **Atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf e Citral contra leishmaniose visceral**. Tese de Doutorado, 88 páginas, AracajuSE, 2013.

BURZA, S., CROFT, S.L. and BOELAERT, M., 2018. Leishmaniasis. **Lancet**, vol. 392, no. 10151, pp. 951-970. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2) PMID:30126638.

CAMARGOS, H.S., MOREIRA, R.A., MENDANHA, S.A., FERNANDES, K.S., DORTA, M.L., ALONSO, A. Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. **PLoS One**. 2014 Aug 7;9(8):e104429

CAMPOS, JACKSANDRA FARIAS DE FRANÇA. **Ação leishmanicida in vitro da miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo in vivo de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

COELHO JÚNIOR, L. G.; RODRIGUES, L. C. B.; MACHADO, G. B.; DE FIGUEIREDO, E. T.; DOS REIS, F. T. M.; MONTEIRO, M. L. G. dos R.; FAVALI, C. B. F.; DE LIMA, B.

D. Coinfecção por leishmaniose visceral e vírus da imunodeficiência humana: uma evolução clínica desfavorável. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, Goiânia, v. 45, n. 2, p. 233–240, 2016.

COÊLHO, M.L., ISLAM, M.T., LAYLSON DA SILVA OLIVEIRA, G., OLIVEIRA BARROS DE ALENCAR, M.V., VICTOR DE OLIVEIRA SANTOS, J., CAMPINHO DOS REIS, A., OLIVEIRA FERREIRA DA MATA, A.M., CORREIA JARDIM PAZ, M.F., DOCEA, A.O., CALINA, D., SHARIFI-RAD, J., AMÉLIA DE CARVALHO MELO-CAVALCANTE, A. Cytotoxic and Antioxidant Properties of Natural Bioactive Monoterpenes Nerol, Estragole, and 3,7-Dimethyl-1-Octanol. **Adv Pharmacol Pharm Sci**. 2022

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (orgs.). **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. E-book.

COSSOLOSO, D.S. **Atividades leishmanicida e antioxidante dos óleos essenciais de plantas encontradas no nordeste brasileiro**. Tese (Doutorado). 2013.

COSTA JP, et al. Efeitos ansiolíticos do fitol: Possível envolvimento da transmissão GABAérgica. **Cérebro Res** 2014; 547 34-42.

DAGA, M.K, ROHATGI I., MISHRA R. Leishmaniasis. **Indian J Crit Care Med**. 2021 May;25(Suppl 2):S166-S170.

DANTAS-TORRES, F., MIRÓ, G., BANETH, G., BOURDEAU, P., BREITSCHWERDT, E., CAPELLI, G., ET AL. Controle da leishmaniose canina no contexto da One Health. **Emerg Infect Dis**. Dezembro de 2019 link: <https://doi.org/10.3201/eid2512.190164>

DANTAS-TORRES, F., MIRÓ, G., BOWMAN, DD., GRADONI, L., OTRANTO, D. Cães de descarte para controle da leishmaniose visceral zoonótica: o vento da mudança. **Tendências Parasitol** . 2019; 35 :97-101. 10.1016/j.pt.2018.11.005

DANTAS-TORRES, F.. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.40, n.3, p.537-541, 2006.

DE OLIVEIRA, B. C., DUTHIE, M.S., ALVES PEREIRA, V.R. Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. **Hum Vaccin Immunother.** 2020 Apr 2;16(4):919-930

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DI PASQUA, R., BETTS, G., HOSKINS, N., EDWARDS, M., ERCOLINI, D., MAURIELLO, G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. **J. Agric. Food Chem.** 55, 4863–4870. 2007.

DRUMOND, K.O. COSTA, F.A.L. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** São Paulo, v. 53, n. 1, Feb. 2011

ELMAHALLAWY, E.K., SAMPEDRO MARTINEZ, A., RODRIGUEZ-GRANGER, J., HOYOS-MALLECOT, Y., AGIL, A., NAVARRO MARI, J.M., GUTIERREZ FERNANDEZ, J. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries.** 2014 Aug 13;8(8):961-72.

ESSID, R., FATMA ZAHRA RAHALI, KAMEL MSAADA, INES SGHAIR, MAJDI HAMMAMI, AIDA BOURATBINE, KARIM AOUN, FERID LIMAM, Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia, **Industrial Crops and Products**, Volume 77, 2015, Pages 795-802.

FÓRMULA ESTRUTURAL DO NEROL, disponível em: www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sid/50949, acesso em 14/11/22.

FREITAS, José CC; PINHEIRO, Diana CSN. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências veterinárias**, v.109, n.55, p. 11-20, 2010.

GALVÃO, Juliana Gouveia. **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados para o encapsulamento de carvacrol: uma formulação promissora para o tratamento de leishmanioses.** 2019. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2019.

GÉLVEZ, A.P.C., DINIZ JUNIOR, J.A.P., BRÍGIDA, R.T.S.S. *et al.* AgNP-PVP-meglumine antimoniate nanocomposite reduces *Leishmania amazonensis* infection in macrophages. **BMC Microbiol** **21**, 211 (2021).

GHORBANI, M., FARHOUDI, R. Leishmaniose em humanos: terapia medicamentosa ou vacinal? **Drug Des Devel Ther.** 2018; 12 :25–40. doi: 10.2147/DDDT.S146521.

GOMES, RODRIGO SAAR. **E-NTPDase-2 de Leishmania amazonensis é importante na adesão do parasito ao macrófago e participa da modulação da resposta inflamatória, de forma dependente e independente da atividade ectonucleotidás.** 2015. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

HAFIZ, S., KYRIAKOPOULOS, C. Pentamidine. 2022 May 8. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022

HAMID, A.A, AIYELAAGBE, O.O, USMAN, L.A. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. **Int J Curr Res** 2011;3(2):86-98.

HARKINS, K. M.; SCHWARTZ, R. S.; CARTWRIGHT, R. A.; STONE, A. C. Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for *Leishmania*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 38, p. 101–109, 2016

HENDRICKX, S., CALJON, G., & MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. **Parasitology Research.** 2019.

HYLDGAARD, M., MYGIND, T., MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front. Microbiol.** 3, 1–24. 2012.

INOUE, S.; TAKISAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 565-573, 2001.

JAIME, A. SOTO., JONATHAN, D. BERMAN., Miltefosine Treatment of Cutaneous Leishmaniasis, **Clinical Infectious Diseases** , Volume 73, Edição 7, 1º de outubro de 2021, Páginas e2463–e2464,

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Curr Med Chem.** 2003 May;10(10):813-29.

KERR, S.F. Origem paleártica da *Leishmania* . **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2000; **95** :75–80.

KUMAR, R., S. SHARMA, S. SOOD, AND V. K. AGNIHOTRI. 2013. Agronomic interventions for the improvement of essential oil content and composition of damask rose (*Rosa damascena* Mill.) under western Himalayas. **Ind. Crop. Prod** 48:171–77.

KUMARI, S.; KUMAR, V; TIWARI, R.K.; RAVIDAS, V.; PANDEY, K; KUMAR, A. Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica.** 2022

LEAL-CARDOSO, J.H, FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An Acad Bras Ci** 1999;71(2):207-13.

LIMA, B. J. S.; SANDES, M. F.; ARAGÃO, M. T.; BATISTA, G. C.; ARAÚJO, D. C.; SANTOS, J. A. S.; REZENDE, M. L.; GONÇALVES, H. S.; MELO, L. S.; VIEIRA, C. C.. HIV e Leishmaniose tegumentar americana no estado de Sergipe: um estudo do espectro disseminado da coinfeção. **Scire Salutis**, v.11, n.3, p.126-129, 2021.

LIMA, G.S, CASTRO-PINTO, D.B., MACHADO, G.C., MACIE, L. M.A., ECHEVARRIA, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**. 2015 Nov 15;22(12):1133-7.

M. MOKNI. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, Volume 146, Issue 3, 2019, Pages 232-246,

MACHADO, C. A. L.; SEVÁ, A. P.; DANTAS-TORRES, F.; HORTA, M. C. Spatial analysis and epidemiological profile of visceral leishmaniasis, northeastern Brazil: A cross-sectional study. **Acta Tropica**, 208 (2020) 105520. 2020

MARCHI, M. N. A. DE, CALDART, E. T., MARTINS, F. D. C., & FREIRE, R. L. Spatial analysis of leishmaniasis in Brazil: a systematized review. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, 61, e68.2019

MARQUES, P.S.; FONSECA-MARTINS, A.M.; CARNEIRO, M.P.D.; AMORIM, N.R.T.; PÃO, C.R.R.; CANETTI, C; DIAZ, B.L. GUEDES, H.L.M.; MELO, C.B. Eosinophils increase macrophage ability to control intracellular *Leishmania amazonensis* infection via PGD₂ paracrine activity in vitro. **Cell Immunol**. 2021 May;363:104316.

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

MEI-YAN BAI, QI ZHOU, JIE ZHANG, TING LI, JUN CHENG, QUN LIU, WEN-RONG XU, YU-CANG ZHANG, Antioxidant and antibacterial properties of essential oils-loaded β -cyclodextrin-epichlorohydrin oligomer and chitosan composite films, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Volume 215, 2022, 112504.

MENEZES-FILHO, José Evaldo Rodrigues de et al. Nerol Attenuates Ouabain-Induced Arrhythmias. *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, [s.l.], v. 2019, p.1-9, 7 mar. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020. SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltase.def>.

MONDÊGO-OLIVEIRA, RENATA ET AL. Vernonia brasiliiana (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of Leishmania infantum promastigotes. **Biomedicine & Pharmacology**, v. 133, 111025, p. 1-12, 2021.

MONGE-MAILLO, B., LÓPEZ-VÉLEZ, R. Anfotericina B liposomal en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. **Rev Iberoam Micol.** 2021 Apr-Jun;38(2):101-104.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MS. Ministério da Saúde. 2021 Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l> , acesso em 22/11/22.

MSAADA, K., N. SALEM, S. TAMMAR, M. HAMMAMI, M. J. SAHARKHIZ, N. DEBICHE, F. F. LIMAM, AND B. MARZOUK. 2012. Essential oil composition of Lavandula dentata, L. stoechas and L. multifida cultivated in Tunisia. **J. Essent. Oil-Bear. Plants** 15:1030–39.

MUNIZ, A.C. **Marcadores imunológicos de proteção na infecção por Leishmania braziliensis: Um estudo de coorte.** Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. UFBA. Salvador/BA. 2017.

NAGLE, A. S; KHARE, S; KUMAR, A. B; SUPEK, F; BUCHYNSKY, A; MATHISON, C. J; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **American Chemical Society**, v. 114, n. 22, p. 11305–47, 2014.

NEVES, David Pereira et. al. **Parasitologia humana.** 14 ed. São Paulo: Atheneu, 2022

NOGUEIRA NETO, J.D., et al. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do nerolidol. **J Pharmaceut Sci Basic Appl** 2013; 34: 125—130

NOYES, H. Implicação de uma origem Neotropical do gênero *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93 :657–61

OLIVEIRA A. R.; FERNANDES, C. A. Focos e fatores associados ao aparecimento de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV) no Cariri Cearense. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 2, n. 5, [s.p], 2014

OLIVEIRA, L.F., GILBERT, B., VILLAS BÔAS, G.K. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Fitos** [Internet].2013 [cited 2020 Feb 9];8(1):1-72.

PEREIRA, K. L. G.; SCHER, R. **Atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Bail.** (Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária), 2014

PEREIRA, K..LG., VASCONCELOS, N.B.R., BRAZ, J.V.C., INÁCIO, J.D.F., ESTEVAM, C.S., CORREA, C.B., FERNANDES, R.P.M., ALMEIDA-AMARAL, E.E., SCHER, R. Ethanolic extract of *Croton blanchetianus* Ball induces mitochondrial defects in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **An Acad Bras Cienc**. 2020 Oct 28;92(suppl 2):e20180968

PEREIRA, LUIZA DE OLIVEIRA RAMOS; et al. Is *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis?. **International Journal of Infectious Diseases**, v.57, p.132–137, 2017.

PIMENTEL, M.C.P., BARROS, M.J., CIRNE, P., MATTOS, E.A., OLIVEIRA, R.C., PEREIRA, M.C.A., SCARANO, F.R., ZALUAR, H.L.T. & ARAUJO, D.S.D. Spatial variation in the structure and floristic composition of "restinga" vegetation in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 30:543-551. 2007.

PIRAJÁ, G.V., LUCHEIS, S.B. A VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE FLEBOTOMÍNEOS COMO PLANEJAMENTO E AÇÕES DE CONTROLE NAS LEISHMANIOSES. **RVZ** [Internet].;21(4):503-15. 2014.

PRITSCH, IZANARA CRISTINE. **Avaliação *in vitro* da exposição do Glucantime® em macrófagos não infectados e infectados com *leishmania (viannia) braziliensis, vianna (1911)***. Dissertação de mestrado do programa de pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná. 71 f. Curitiba. 2015

QUEIROZ, M.J.A.; ALVES, J.G.B.; CORREIA, J.B. Leishmaniose Visceral: característica clínica-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**. 2004.

RICCI, H.A. **Atividade Anti Leishmania de Compostos Cumarínicos Complexados com Metais**. Dissertação apresentada à Universidade Anhanguera de São Paulo, como exigência do programa de pós-graduação do mestrado profissional em farmácia. 2015.

ROATT, B.M., DE OLIVEIRA CARDOSO, J.M., DE BRITO, R.C.F., COURA-VITAL, W., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R.D., REIS, A.B. Avanços recentes e novas estratégias no tratamento da leishmaniose. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2020

RODRIGUES, F.A; BOMFIM, I.D.A.S; CAVALCANTI, B.C; PESSOA, C; GONCALVES, R.S; WARDELL, J.L; WARDELL, S.M; DE SOUZA, M.V. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chem Biol Drug Des**, v. 83(1), p.126-31, 2014.

RODRIGUES, K.A., AMORIM, L.V., DIAS, C.N., MORAES, D.F., CARNEIRO, S.M., CARVALHO, F.A., 2015. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent -pinene exhibit antileishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **J. Ethnopharmacol**. 3 (160), 32–40

RODRIGUES, VASCO ET AL. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & vectors**, v. 9, n.1, p.118, 2016.

ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L. Inibição de Ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX2) por Monoterpenos: um Estudo *in Silico*. UNOPAR **Cient Ciênc Biol Saúde**. [s.l: s.n.]. 2014.

ROSS, R. Mais notas sobre os corpos de Leishman. **Br Med J**. 1903; **2** :1401

ROTTINI, M.M., AMARAL, A.C., FERREIRA, J.L., SILVA, J.R., TANIWAKI, N.N., SOUZA, C.D.A S., D'ESCOFFIER, L.N., ALMEIDA-SOUZA, F., HARDOIM, DDE. J., GONÇALVES DA COSTA, S.C., CALABRESE, K.D.A S. In vitro evaluation of (-) α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Exp Parasitol.** 2015 Jan;148:66-72.

SALAMA, I. C. C. A. **Análise biológica dos compostos rutênio, lupeol e boldina no modelo experimental das leishmanioses.** 2013. 67 p. Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas) – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO, BARRA DO GARÇAS - MT, 2013.

SALAMA, O.; EL-ZALABANI, S.; BISHR, H.; FEKRY, M.; KHALIL, N. Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. **Plant Physiology and Biochemistry.** 65-74. 2017.

SALAMA, I.C., ARRAIS-LIMA, C., ARRAIS-SILVA, W.W. Evaluation of Boldine Activity against Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Korean J Parasitol.** 2017 Jun;55(3):337-340.

SANCHITA , A. SHARMA . Gene Expression Analysis in Medicinal Plants Under Abiotic Stress Conditions. **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress** (2018) , pp . 407-414

SANTANA, R.C.; ROSA, A.S.; MATEUS, M.H.S.; SOARES, D.C.; ATELLA, G.; GUIMARÃES, A.C.; SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; SARAIVA, E.M; PINTO-DA-SILVA, L.H. In vitro leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of Protium (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*, **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 259, 2020, 112981, ISSN 0378-8741

SANTOS, E.M.S. **Avaliação clínica e diagnóstico da infecção por Leishmania (Leishmania) infantum chagasi, Toxoplasma gondii, Neospora caninum e presença de ectoparasitismo em cachorro-do-mato (Cercocyon thous) no Estado de Pernambuco, Brasil** Tese (Doutorado em Biociência Animal). Recife, Pernambuco. 68 folhas. 2015.

SANTOS, ERIC FABRÍCIO MARIALVA DOS. **Bionomia de *Migonemyia migonei* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) em condições experimentais.** / Eric Fabrício Marialva dos Santos. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno- Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

SANTOS, Matheus de Albuquerque et al. Leishmaniose Visceral: Características clínico-epidemiológicas de casos e óbitos no estado de Sergipe. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 4, out. 2018. ISSN 2238-3360.

SANTOS, N.O.D, PASCON, R.C., VALLIM, M.A., FIGUEIREDO, C.R, SOARES, M.G., LAGO, J.H.G., SARTORELLI, P. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines (Basel)**. 2016 Aug 12;3(3):22

SANTOS, NARA OSHIRO DOS. **Avaliação da atividade biológica de metabólitos de *lippia alba* (verbenaceae), *plectranthus amboinicus* e *plectranthus barbatus* (lamiaceae).** 2016. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Diadema, 2016.

SANTOS, VINÍCIUS CISNEIROS DE OLIVEIRA. **Avaliação do efeito cardioprotetor do nerol em modelo de hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol.** 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2019.

SILVA ANR, PEREIRA AM JR, DE PAULO PFM, DA SILVA MS, CASTRO TS, COSTA GDS, et al. Detection of *Leishmania* species (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Porto Velho, Northern Brazil. **Acta Trop** 2021; 213: 105757

SILVA DA, MADEIRA, M.F, TEIXEIRA, A.C, DE SOUZA C.M, FIGUEIREDO FB. Exames laboratoriais realizados em cães sororreativos para *Leishmania* eutanasiados pelo programa de controle da leishmaniose. **Veterinário Parasitol** . 2011; 179 :257-61. 10.1016/j.vetpar.2011.01.048

SILVA, A.A.S. et al. Estudo fitoquímico e atividades biológicas do limãozinho *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Ceará, v. 8, n. 2, p. 37-53, jan-mar. 2014.

SILVA, BRIAN OGUSHI; ORLANDO, JULIANA BOTINHON; PIRES, CAMILA LEHNHARDT; HIRUMA-LIMA, CLÉLIA AKIKO; DE MASCARENHAS GAIVÃO, ISABEL; FABIO FERREIRA PERAZZO; EDSON LUIS MAISTRO. Genotoxicity induced by nerol, an essential oil present in citric plants using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and HepG2/C3A cells as a model. **JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH-PART A-CURRENT ISSUES** , v. 84 , p. 518 2021

SILVA, J. M. S. DA. **Encapsulamento do óleo essencial da *Lippia alba* em nanopartículas de poli-ε-caprolactona (PCL) para avaliação da estabilidade e atividade larvicida contra o *Aedes aegypti***. 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

SILVA, K. P. G; FRANÇA, D. C. H; DA SILVA HONORIO, M; BORGES, F. C; DE SILVA, M.P.N, OLIVEIRA, G.L., DE CARVALHO, R.B., DE SOUSA, D.P., FREITAS, R.M, PINTO, P.L, DE MORAES, J. Atividade antiesquistossomótica das moléculas de terpeno nerolidol. **Basileia Online** 2014; 19: 3793-3803

SILVA, S. C. “**Estudo comparativo de cepas de *Leishmania Infantum* – Avaliação da susceptibilidade a antimoniais e da expressão de micrornas em macrófagos J774.A1 e camundongos Balb/c experimentalmente infectados**”. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Rio Preto, Minas Gerais, 2017.

SOARES PETRI, S., PALACE-BERL, F., COSTA TAVARES, L., CASTRO SOARES, S., LAULETTA LINDOSO, J. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. **Exp Parasitol** 163, 68-75. 2016

SOUZA, M.A.A.; LORENA, V.M.B.; CORREIA, M.T.S.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. In vitro effect of Bothrops leucurus lectin (BLL) against Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis infection. **Int J Biol Macromol**. 2018 Dec;120(Pt A):431-439

SS/PR. Secretaria de Saúde. Vigilância epidemiológica da leishmaniose tegumentar americana no estado do Paraná. 2018, Paraná. **Nota técnica – nt 04**/sesa/ceva/dvdtv

SS/SE. Secretaria de Saúde do Estado de Sergipe. Disponível em: <https://www.saude.se.gov.br/?p=24906>, acesso em 08/09/2022.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors**. 2017 Feb 15;10(1):82.

TEIXEIRA, D.E., BENCHIMOL, M., RODRIGUES, J.C.F., CREPALDI, P.H., PIMENTA, P.F.P., SOUZA, W. DE. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathog** 2013;9(10):1-4

TEIXEIRA, R.R; SILVA, A.M.; SIQUEIRA, R.P.; GONÇALVES, V.H.; PEREIRA, H.S.; FERREIRA, R.S.; COSTA, A.V.; MELO, E.B.; PAULA, F.R.; FERREIRA, M.M.C.; BRESSAN, G.C. Synthesis of Nerol Derivatives containing a 1,2,3- Triazole Moiety and Evaluation of Their Activities against Cancer Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Vol 30. Pag. 541-561. 2019.

TELES, L. M. S.; ARRAIS DA SILVA, W. W. **Avaliação in vitro da atividade leishmanicida do carvacrol complexado à β -ciclodextrina**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PROBIO), 2022.

TIAN, J., ZENG, X., ZENG, H., FENG, Z., MIAO, X., PENG, X. Investigations on the antifungal effect of nerol against *Aspergillus flavus* causing food spoilage. **ScientificWorldJournal**. 2013 Dec 23;2013:230795.

TIWARI, N.,GEDDA, M. R.,TIWARI, V. K.,SINGH,S. P.,& SINGH, R. K. (2018). Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 1

VASCONCELOS, JAIRLA MARIA; GOMES, CAMILA GOES; SOUSA, ALLANY; TEIXEIRA, ANDRÉA BESSA; LIMA, JOCIVANIA MESQUITA. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Rev. bras. anal. clín** ; 50(3): 221-227, dez.16, 2018.

VIRMOND, M.C.L. Leishmaniose, Controle e educação em saúde. **Editorial UNISAGRADO**. V.30. pag 127 a 131. 2011.

WANG, Z., YANG, K., CHEN, L., YAN, R., QU, S., LI, Y.X., LIU, M., ZENG, H., TIAN, J. Inhibitory effect of nerol against *Aspergillus niger* on grapes through a membrane lesion mechanism. **Food Control**. Vol 55. Pag 54-61. 2015

WANG, Z., YANG, K., CHEN, L., YAN, R., QU, S., LI, Y.X., LIU, M., ZENG, H., TIAN, J. Activities of Nerol, a natural plant active ingredient, against *Candida albicans* in vitro and in vivo. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2020 Jun;104(11):5039-5052

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Países endêmicos 2021. https://apps.who.int/gho/athena/data/GHO/NTD_LEISHCEND.html?profile=ztable&filter=COUNTRY:*&ead=, acesso em 21 de novembro de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1-, acesso em 20 de novembro de 2022.

YALUFF, G., VEJA, C., ALVARENGA, N. In vitro antiprotozoal activity of (S)-cis-Verbenol against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**. 2017 Apr;168:41-44

ZHANG, B., ZHOU, Y.T., JIANG, S.X., ZHANG, Y.H., HUANG, K., LIU, Z.Q., ZHENG, Y.G. Amphotericin B biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: quantitative analysis of metabolism via LC-MS/MS based metabolomics for rational design. **Microb Cell Fact**. 2020