



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS
APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL**

IULIANA MARJORY MARTINS RIBEIRO

**LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (*Anarcadium occidentale* L.) (LCC)
E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUENTES: ATIVIDADES ANTI-*Leishmania*,
TOXICOLÓGICA E IMUNOMODULADORA**

Teresina-PI

2021

IULIANA MARJORY MARTINS RIBEIRO

**LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (*Anarcadium occidentale* L.) (LCC)
E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES: ATIVIDADES ANTI-*Leishmania*,
TOXICOLÓGICA E IMUNOMODULADORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção de Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves

Teresina

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processos Técnicos

R484L Ribeiro, Iuliana Marjory Martins.
Líquido da casca da castanha do caju (*Anacardium occidentale*
L.) (LCC) e seus principais constituintes : atividades anti-
Leishmania, toxicológica e imunomoduladora / Iuliana Marjory
Martins Ribeiro. -- 2021.
91 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias
Aplicadas a Animais de Interesse Regional, Teresina, 2021.

“Orientador: Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça.”

“Co-orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves.”

1. Leishmaniose - Tratamento. 2. *Anacardium occidentale* L.
3. Produtos naturais. 4. Citotoxicidade. 5. Imunomodulação.
I. Mendonça, Ivete Lopes de. II. Alves, Michel Muálem de Moraes.
III. Título.

CDD 616.96

IULIANA MARJORY MARTINS RIBEIRO

**LÍQUIDO DA CASCA DA CASTANHA DO CAJU (*Anarcadium occidentale* L.) (LCC)
E SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES: ATIVIDADES ANTI-*Leishmania*,
TOXICOLÓGICA E IMUNOMODULADORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção de Mestre em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça (Presidente)
Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves (Membro interno)
Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos (Membro interno)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues (Membro externo)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

A Deus, autor da minha vida e da minha fé, à memória do meu pai José Ribamar e à minha mãe Maria de Lourdes, dedico.

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão ao meu DEUS, o autor da vida, minha fortaleza, refrigério na hora da angústia, a quem devo tudo o que tenho e tudo o que sou, razão que me fez chegar até aqui, e o único que é digno de receber toda honra, todo louvor e toda a glória. Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente (Romanos 11:36).

Aos meus amados pais José Ribamar (*in memoriam*) e Maria de Lourdes, minha maior inspiração, por tanto amor e zelo dedicados a mim, por todos os ensinamentos e por serem sempre meu suporte e apoio em todas as minhas escolhas. Vocês sempre serão meu exemplo e referência.

Aos meus irmãos Iury Wallace e Dirley Iuran, pelo amor, amizade e cuidado, por estarem sempre torcendo por mim e pelo apoio em todas as áreas da minha vida.

Ao meu melhor amigo e amor Abimael Bezerra, por fazer parte da minha vida nesse momento tão importante, orando por mim, dando toda força e apoio que precisei nas etapas finais deste trabalho. Você foi peça fundamental para minha vitória, e essa foi apenas a primeira de muitas que compartilharei com você.

À minha família e amigos por sempre torcerem por mim e se alegrarem comigo em cada conquista.

À minha orientadora Profa. Dra. Ivete Lopes de Mendonça, pela confiança a mim dispensada, pela sua amizade, pela força, compreensão e auxílio nos momentos difíceis que enfrentei, por ensinar quando erro e elogiar quando acerto, e por todo o conhecimento a mim repassado ao longo desses 8 anos entre monitoria, ICV, estágio, residência e mestrado, que contribuíram grandemente para minha capacitação profissional.

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves, pela sua amizade e apoio, pela dedicação e paciência em me ensinar os fundamentos dos protocolos, desde os cálculos até a execução dos mesmos, desafiando-me a ampliar meus horizontes e conhecimentos como pesquisadora. Muita gratidão pela sua brilhante contribuição desde a proposta do projeto da pesquisa até as longas horas dedicadas a favor da continuidade e término desse trabalho, sendo minhas mãos e meus pés quando precisei me ausentar, e por não me deixar desistir.

À Universidade Federal do Piauí - UFPI e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional - PPGTAIR, pela oportunidade da realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no segundo ano do curso de mestrado.

Aos membros da banca, Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos e Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues, por terem aceitado o convite e de forma brilhante terem contribuído para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, grande exemplo de pesquisador, pela recepção admirável em seu laboratório, por disponibilizar com plena confiança os equipamentos e o material necessário ao trabalho, pelo incentivo, amizade, apoio e parceria enquanto estivemos trabalhando juntos. Foi um prazer imensurável trabalhar com a sua equipe.

À Profa. Dra. Maria das Graças Lopes Citó, que gentilmente cedeu as substâncias que foram testadas na pesquisa.

À equipe do Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da UFPI pela parceria, colaboração, por todos os conhecimentos compartilhados e por todos os momentos de pausa para o café durante esse tempo de convivência: Rebeca, Laíz, Arimatéia, Maísa, Daniela e principalmente a Valéria e Rita, amigas tão especiais que ganhei e vou levar sempre comigo, sem palavras para expressar a minha eterna gratidão a vocês. Além de me ensinarem “do zero” cada passo na execução dos protocolos e também terem sido minhas mãos e pés quando tive que me mudar de cidade, foram meu suporte em todos os momentos, sempre se alegrando com minhas vitórias, me apoiando e dando forças nos momentos difíceis, pela troca de experiências vividas, “perrengues” compartilhados, enfim, momentos que sempre ficarão guardados no meu coração, sem vocês eu não teria conseguido. Gratidão aos colaboradores Josi Albuquerque e Patrícia Portela pelo carinho, presteza, conversas e momentos de descontração do dia-a-dia e ao Sr. Carlos e Dona Kaline por toda dedicação e cuidado aos animais do Biotério.

Aos meus amigos do Setor de Doenças Parasitárias do Laboratório de Sanidade Animal – LASAN, por todo o carinho, amizade, colaboração, conhecimentos compartilhados e convivência ao longo desses anos: Fernanda, Joilson, Leidiane, Amanda, Tairine, Daniele, Kayo, Diana, Richard e Thiago.

À minha turma de mestrado, juntamente com a turma de doutorado (2019-2021), pelo privilégio de sermos os primeiros alunos do PPGTAIR, e pelo prazer em conviver e aprender com pessoas tão competentes, pelos momentos de descontração nas aulas, pelas conversas e risadas nos intervalos, pela ajuda mútua nos momentos de dificuldade. Pelas amizades que surgiram e outras que se fortaleceram, em especial à minha amiga e companheira de lutas e vitórias Fabiane, por todo o carinho, apoio, pelas conversas, por toda a força que me deu nos muitos momentos em que achei que não conseguiria continuar e pensei em desistir do mestrado, minha eterna gratidão a você.

A todos os que me ajudaram direta e indiretamente durante todo o meu percurso até aqui, e a todos os que me apoiam, oram e torcem por mim, vibram com minhas vitórias, sonham meus sonhos comigo, são ombro quando preciso de apoio e me ajudam a jamais desistir. Meu muito obrigada!

“Sola Fide, Sola Scriptura, Solus Christus, Sola Gratia, Soli Deo Gloria”.

Martinho Lutero

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas endêmicas em 98 países, constituindo um grande problema de saúde pública devido à sua alta incidência e letalidade. Estima-se que ocorram entre 700.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea e 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral em todo o mundo a cada ano. Tem como agente etiológico mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, transmitidas por espécies diferentes de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. Os tratamentos convencionais causam efeitos adversos graves, baixa tolerância, desenvolvimento de cepas resistentes, além de serem onerosos. Nesse contexto, os produtos naturais têm sido investigados na busca por novas alternativas terapêuticas. O líquido da casca da castanha do caju (LCC), um dos principais subprodutos do cajueiro, é uma fonte natural de compostos fenólicos, como ácido anacárdico (AA), cardanol (CN) e cardol (CD), e apresenta atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas, antitumorais, larvicidas e inseticidas. Seus derivados também são amplamente explorados isoladamente, principalmente quanto às suas propriedades como antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antitumorais, entre outras. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades anti-*Leishmania*, citotóxica e imunomoduladora do LCC, AA, CN e CD. Para tanto, foram realizados protocolos de atividade anti-*Leishmania* sobre formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major*, citotoxicidade sobre macrófagos murinos, bem como avaliação de macrófagos infectados com *L. infantum*. Ainda foram realizados ensaios de imunomodulação como atividade lisossomal, capacidade fagocítica e avaliação da indução na produção de óxido nítrico em macrófagos, bem como avaliação da toxicidade aguda sobre *Tenebrio molitor*. As substâncias testadas demonstraram potencial anti-*Leishmania*, e os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) do LCC, AA, CN e CD contra *L. infantum* foram: 148,12; 106,45; 56,74 e 154,32 µg/mL, contra *L. braziliensis* foram: 85,71; 50,83; 64,28 e 137,05 µg/mL, e contra *L. major* foram: 153,56; >800; 122,31 e 112,50 µg/mL, respectivamente. Na ação sobre os macrófagos, as concentrações médias de citotoxicidade (CC₅₀) do LCC, AA, CN e CD foram 37,51; 12,59; 31,44 e 40,53 µg/mL, respectivamente. Na avaliação do LCC e CN contra formas amastigotas intracelulares, houve uma redução significativa no percentual de macrófagos infectados e no índice de sobrevivência das formas amastigotas internalizadas, com índice de seletividade (IS) significativo para ambas as substâncias, apresentando CI₅₀ de 4,63 e 1,42 µg/ml, respectivamente. LCC, AA, CN e CD apresentaram atividade imunomoduladora, atuando sobre parâmetros de ativação de macrófagos, demonstrado pelo aumento de sua capacidade fagocítica e volume lisossomal, contudo não exibiram indução significativa da síntese de NO. Quanto à toxicidade aguda, as taxas de sobrevivência das larvas de *T. molitor* foram: 85%, 75% e 60% em contato com LCC e 85%, 60% e 40% em contato com CN, ambas as substâncias nas doses de 3; 30 e 300 mg/Kg. Houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência das larvas em contato com CN, demonstrando-se toxicidade aguda significativa para esta substância. Os resultados deste estudo são promissores e servem como ponto de partida para a realização de pesquisas posteriores que visem a avaliação do potencial leishmanicida *in vivo*.

Palavras-chave: Produtos naturais. Atividade anti-*Leishmania*. Citotoxicidade. Imunomodulação.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected endemic disease in 98 countries, constituting a major public health problem due to its high incidence and lethality. It is estimated that between 700,000 to 1 million new cases of cutaneous leishmaniasis and 50,000 to 90,000 new cases of visceral leishmaniasis occur worldwide each year. Its etiological agent is more than 20 species of the genus *Leishmania*, transmitted by different species of sandflies of the genus *Lutzomyia* and *Phlebotomus*. Conventional treatments cause serious adverse effects, low tolerance, development of resistant strains, in addition to being costly. In this context, natural products have been investigated in the search for new therapeutic alternatives. Cashew nut shell liquid (CNSL), one of the main cashew by-products, is a natural source of phenolic compounds such as anacardic acid (AA), cardanol (CN) and cardol (CD), and has antioxidant, anti-inflammatory activities, antimicrobials, antitumors, larvicides and insecticides. Its derivatives are also widely explored in isolation, mainly regarding their properties as antibacterial, antioxidant, antifungal, antitumor, among others. The aim of this study was to evaluate the anti-*Leishmania*, cytotoxic and immunomodulatory activities of CNSL, AA, CN and CD. For that, protocols of anti-*Leishmania* activity were carried out on promastigote forms of *L. infantum*, *L. braziliensis* and *L. major*, cytotoxicity on murine macrophages, as well as evaluation of macrophages infected with *L. infantum*. Immunomodulation assays such as lysosomal activity, phagocytic capacity and evaluation of the induction of nitric oxide production in macrophages, as well as evaluation of acute toxicity on *Tenebrio molitor*, were also carried out. The tested substances showed anti-*Leishmania* potential, and the mean inhibitory concentration (IC₅₀) values of CNSL, AA, CN and CD against *L. infantum* were: 148.12; 106.45; 56.74 and 154.32 µg / mL, against *L. braziliensis* were: 85.71; 50.83; 64.28 and 137.05 µg / mL, and against *L. major* were: 153.56; >800; 122.31 and 112.50 µg/ml, respectively. In the action on macrophages, the mean concentrations of cytotoxicity (CC₅₀) of CNSL, AA, CN and CD were 37.51; 12.59; 31.44 and 40.53 µg/ml, respectively. In the evaluation of LCC and CN against intracellular amastigotes, there was a significant reduction in the percentage of infected macrophages and in the survival rate of internalized amastigotes, with a significant selectivity index (SI) for both substances, with an IC₅₀ of 4.63 and 1.42 µg/ml, respectively. CNSL, AA, CN and CD showed immunomodulatory activity, acting on macrophage activation parameters, demonstrated by the increase in their phagocytic capacity and lysosomal volume, however they did not exhibit significant induction of NO synthesis. As for acute toxicity, the survival rates of *T. molitor* larvae were: 85%, 75% and 60% in contact with LCC and 85%, 60% and 40% in contact with CN, both substances at doses of 3; 30 and 300 mg/kg. The results of this study are promising and serve as starting points for further research aimed at evaluating the potential leishmanicidal in vivo.

Keywords: Natural products. Anti-*Leishmania* activity. Cytotoxicity. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de casos de leishmaniose visceral no mundo em 2020	18
Figura 2. Distribuição de casos de leishmaniose cutânea no mundo em 2020	19
Figura 3. Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 4. Insetos vetores da Leishmaniose	22
Figura 5. Representação do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	24
Figura 6. <i>A. occidentale</i> (cajueiro)	29
Figura 7. Cajueiro, caju, castanha e o LCC	32
Figura 8. Estruturas químicas dos principais constituintes do LCC	33
Figura 9. Processo de descarboxilação do AA	34
Figura 10. Principais sítios reacionais da molécula do CN	35
Figura 11. Fases do desenvolvimento morfológico do <i>T. molitor</i>	37

CAPÍTULO I

Fig. 1 Efeitos citotóxicos de LCC (a), AA (b), CN (c) e CD (d) contra macrófagos peritoneais murinos	48
Fig. 2 Macrófagos experimentalmente infectados por <i>L. infantum</i>	50
Fig. 3 Efeitos de LCC, CN e Anf B (como controle positivo), para avaliar o percentual de macrófagos infectados (a) e o índice de sobrevivência (b) no tratamento de macrófagos murinos infectados por <i>L. infantum</i> , considerando o controle 87% de infecção	50
Fig. 4 A influência de LCC, AA, CN e CD sobre a atividade lisossomal (a) e atividade fagocítica (b)	52
Fig. 5 Produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos tratados com LCC, AA, CN e CD na ausência (-) (a), e tratados com LCC e CN na presença (+) (b) de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> , por 24 h	52
Fig. 6 Viabilidade das larvas de <i>T. molitor</i>	53
Fig. 7 Percentual de sobrevivência da larva <i>T. molitor</i> exposta ao LCC e CN	54

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 2. Formas de manifestação da doença e espécies de protozoários relacionadas	23
Tabela 1. Efeitos farmacológicos das espécies de <i>Anacardium occidentale</i> L.	32
Tabela 2. Composição química do LCC natural e LCC técnico	34

CAPÍTULO I

Tabela 1 Atividade anti- <i>Leishmania</i> de LCC e seus principais constituintes AA, CN e CD	47
Tabela 2 Efeito citotóxico sobre células de mamíferos e valores de índice de seletividade calculados para LCC e seus principais constituintes AA, CN e CD	51

LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido anacárdico
Anf B	Anfotericina B
APC	Célula apresentadora de antígeno
ANOVA	Análise de variância
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC₅₀	Concentração citotóxica média
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CD	Cardol
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CI₅₀	Concentração inibitória média
CL₅₀	Concentração letal média
CN	Cardanol
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
LAA	Laboratório de Atividade Anti- <i>Leishmania</i>
LAGO	Laboratório de Geoquímica Orgânica
LCC	Líquido da casca da castanha do caju
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LDPC	Leishmaniose dérmica pós calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose Visceral

MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NPs	Nanopartículas
NPPM	Nucleo de Pesquisas em plantas Medicinais
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i> - Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - Salina tamponada com fosfato
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PKC	Proteína quinase C
PKDL	<i>Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis</i> - Leishmaniose dérmica pós-calazar
PPRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
QUIMEBIO	Grupo de Pesquisa em Química Medicinal e Biotecnologia
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> - Raíz quadrática do desvio quadrado médio
Sb⁵⁺	Antimoniais pentavalentes
SDS	<i>Safety Data Sheet</i> - Ficha de Dados de Segurança
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema mononuclear fagocitário
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TNFα	<i>Tumor necrosis factors</i> - Fator de necrose tumoral alfa
UFPI	Universidade Federal do Piauí
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Leishmanioses	16
2.1.1 Epidemiologia	17
2.1.2 Agente etiológico	20
2.1.3 Vetores	21
2.1.4 Reservatórios	22
2.1.5 Ciclo biológico.....	23
2.1.6 Resposta imune à infecção por <i>Leishmania</i>	24
2.1.7 Tratamento	25
2.2 Plantas medicinais e produtos naturais	27
2.2.1 <i>Anacardium occidentale</i> L.	29
2.2.2 Líquido da casca da castanha do caju (LCC)	32
2.2.2.1 Ácido anacárdico	34
2.2.2.2 Cardanol	34
2.2.2.3 Cardol	36
2.3 <i>Tenebrio molitor</i>	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 CAPÍTULO I – Potencial anti-<i>Leishmania</i> e imunomodulador do líquido da casca da castanha do caju (LCC), ácido anacárdico, cardanol e cardol	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	72
7 ANEXOS	90
7.1 Anexo I - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal	90

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, constituindo um grande problema de saúde pública devido à sua alta incidência e letalidade (ALVAR *et al.*, 2012; BENITEZ *et al.*, 2018). No ano de 2020, as leishmanioses foram endêmicas em 98 dos 200 países e territórios que a reportaram à OMS. Estima-se que ocorram entre 700.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea e 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral em todo o mundo a cada ano (WHO, 2021). Apesar do número de casos de leishmaniose nas Américas ter reduzido nos últimos anos, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil o total de notificações permanecem elevados. Entre os anos 2003 e 2018 mais de 300.000 casos da doença foram registrados, com média de 21.158 casos anualmente no país (BRASIL, 2019).

As espécies do gênero *Leishmania*, classificadas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, são transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (CARVALHO; FERREIRA, 2001). No Velho Mundo, os flebotomíneos pertencem ao gênero *Phlebotomus* (42 espécies são relatadas como comprovadas), e no Novo Mundo ao gênero *Lutzomyia* (56 espécies são relatadas como comprovadas) (CARVALHO; FERREIRA, 2001; GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2015; MAROLI *et al.*, 2013; STEVERDING, 2017). As leishmanioses exibem uma variedade de manifestações clínicas, sendo as duas principais a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), e esta, por sua vez, é dividida em quatro subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD) (GOTO; LINDOSO, 2012).

A forma visceral, considerada a forma mais grave da doença (STEVERDING, 2017), afeta os órgãos internos, particularmente o baço, o fígado e a medula óssea, que pode ser fatal se não for tratada, à medida em que as vítimas evoluem com febre, mal-estar e perda de peso associadas a anemia, hepatomegalia e esplenomegalia (AKHOUNDI *et al.*, 2016; CLABORN, 2010). A LT, espectral da pele e das mucosas, não contagiosa, é caracterizada por lesões na pele, com evolução que podem ir da auto-cura à cronicidade causada por diferentes espécies de *Leishmania*, afetando além do homem outros animais silvestres e domésticos (BARBOSA *et al.*, 2011; BEKHIT *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2014).

O tratamento da leishmaniose é realizado com antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, miltefosina, estibogluconato de sódio, antimoniato de meglumina e pentamidina (KEVRIC *et al.*, 2015; BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). No entanto, o uso desses fármacos requer longos períodos de administração, resultando em efeitos adversos

graves, baixa tolerância e desenvolvimento de cepas resistentes ao tratamento, contribuindo para a ineficácia dos regimes terapêuticos, além de apresentarem custos elevados (SOUZA-SILVA *et al.*, 2015; BAPELA; KAISER; MEYER, 2017).

Diante deste cenário, torna-se necessária a busca de novos compostos bioativos que sejam eficazes no tratamento das leishmanioses, bem como apresentem menor toxicidade em relação aos fármacos convencionais. Com isso, o interesse nas pesquisas com compostos e metabólitos secundários de plantas medicinais tem aumentado, na busca de novos tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos para inúmeras doenças como a leishmaniose. As plantas medicinais de uso popular são uma fonte de substâncias potencialmente úteis para o desenvolvimento (HUBERT *et al.*, 2013; OLIVEIRA; FERREIRA; BARROSO, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

As plantas são consideradas uma importante fonte de produtos naturais que podem ser explorados com sucesso para o desenvolvimento novos fármacos com atividade anti-*Leishmania* (FUNARI *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-COLOMA *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2014; MANSOUR *et al.*, 2013; TORRES *et al.*, 2014). Compostos como os alcaloides, fenólicos, terpenoides e flavonoides têm sido bastante estudados quanto à sua potencial atividade anti-*Leishmania* (OLIVEIRA; FERREIRA; BARROSO, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

Dentre as plantas medicinais amplamente utilizadas, destaca-se o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), nativo do Brasil e amplamente disponível na região costeira, que se estende da Amazônia ao Nordeste, apresentando uma maior concentração nesta região, principalmente no litoral. No Brasil, o cajueiro é utilizado na medicina popular para diversas aplicações como líquido para higiene bucal, analgésico, diurético, tratamento de astenia, problemas respiratórios como gripe, bronquite, e tosse, infecções genitais, escorbuto infantil, doenças de pele como eczema, sarna, verrugas e feridas (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009), dor de garganta, aftas, diabetes, cólicas intestinais e debilidade muscular (BOSCOLO; SENNAVALLE, 2008).

Um dos subprodutos do *A. occidentale*, o líquido da casca da castanha do caju (LCC) tem sido utilizado há décadas na medicina tradicional em países da América do Sul, África e Ásia (AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2009; DA SILVA *et al.*, 2018; KUDI *et al.*, 1999), sendo um produto com pouco valor a nível comercial, porém com alto potencial tecnológico em virtude de sua constituição fenólica e de suas várias características biológicas, como atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, larvicidas e inseticidas, exibindo grande potencial terapêutico (KUBO *et al.*, 1993a; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2011).

O LCC constitui uma fonte natural de compostos fenólicos, como o ácido anacárdico (AA), cardanol (CN), cardol (CD) e 2-metilcardol (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009). Os seus derivados também são amplamente explorados isoladamente, principalmente quanto às suas propriedades como, antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antitumorais, entre outros (AMORATI *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 1998; HEMSHEKHAR *et al.*, 2012; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; MUROI; KUBO, 1996).

Torna-se evidente que *A. occidentale* apresenta-se como uma planta medicinal com ampla utilidade para a farmacologia, e com isso são necessários estudos mais aprofundados dos seus subprodutos e metabólitos isolados, seus mecanismos de ação, bem como aspectos toxicológicos (ARAÚJO *et al.*, 2020). Os compostos com atividade anti-*Leishmania* provenientes de plantas nativas de uma região podem ser mais viáveis em custo que as drogas químicas, se puderem ser encontradas em abundância localmente, podendo ser mais favorável para os países em desenvolvimento, onde a leishmaniose é comum (BEKHIT *et al.*, 2018).

Diante do exposto, considerando-se o impacto da leishmaniose principalmente em países em desenvolvimento, a urgência por compostos mais eficazes e com menores efeitos adversos, e o amplo potencial terapêutico de *A. occidentale*, é estratégico investir na busca de novas propriedades farmacológicas desta espécie e seus subprodutos, como fonte em potencial de medicamentos para o tratamento da leishmaniose. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar as atividades imunomoduladora e anti-*Leishmania* do LCC e seus principais constituintes: AA, CN e CD, a fim de propor uma busca referente a uma nova estratégia terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

A leishmaniose é classificada como doença tropical negligenciada e representa um grande problema de saúde pública tanto em países tropicais como subtropicais, acometendo populações mais vulneráveis com acesso aos serviços de saúde limitados, ocorrendo principalmente na África, Ásia e América Latina. A epidemiologia da doença é diretamente influenciada por fatores sociais, ambientais e climáticos, e está associada à pobreza, migração populacional e deficiências imunológicas (WHO, 2017).

O que determina qual manifestação clínica da doença irá se apresentar é a espécie do parasito e o estado imunológico do hospedeiro, de forma que pacientes imunossuprimidos,

crianças e idosos são mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença e a serem afetados de maneira mais intensa (STEBUT, 2014). As leishmanioses podem se apresentar sob duas formas principais: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LT, forma mais comum da doença, é causada por espécies de parasito que não possuem tropismo por órgãos, mas que estão relacionadas com o desenvolvimento de lesões na pele e/ou mucosas, enquanto que a LV, considerada a forma mais grave da doença (STEVERDING, 2017), é causada por espécies que afetam o sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço e medula óssea, com consequente comprometimento desses órgãos (NEVES, 2011).

A LT é dividida em quatro subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD) (GOTO; LINDOSO, 2012). Apesar dessas variações nas manifestações clínicas da LC, cerca de 75% dos pacientes desenvolvem um quadro típico, com lesão única inicialmente, caracterizada por úlcera circular que possui borda elevada e um centro necrótico (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Pacientes com LV podem apresentar sequelas, desenvolvendo a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), que se manifesta através de erupções maculares, papulares ou nodulares, geralmente na face, braços, tronco e outras partes do corpo. Ocorre principalmente na África Oriental e no subcontinente indiano, onde 5-10% dos pacientes com LV apresentam a doença. Em geral, a PKDL surge de 6 meses a 1 ou mais anos após a cura do calazar, porém pode ocorrer antes desse período (WHO, 2021).

2.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose é caracterizada como um problema de saúde pública e social negligenciado em vários países (BORGHI *et al.*, 2017). Tal enfermidade tem evidenciado alterações quanto ao perfil epidemiológico nas últimas décadas, o qual vem experienciando um processo de urbanização. Diversos fatores estão envolvidos nesse transcurso, como as alterações ambientais ocasionadas por práticas antrópicas, e, por consequência disso, uma rápida migração e adaptação dos vetores aos centros urbanos. Além desses fatores, pode-se ressaltar a maior susceptibilidade e disponibilidade de reservatórios nesse perímetro (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

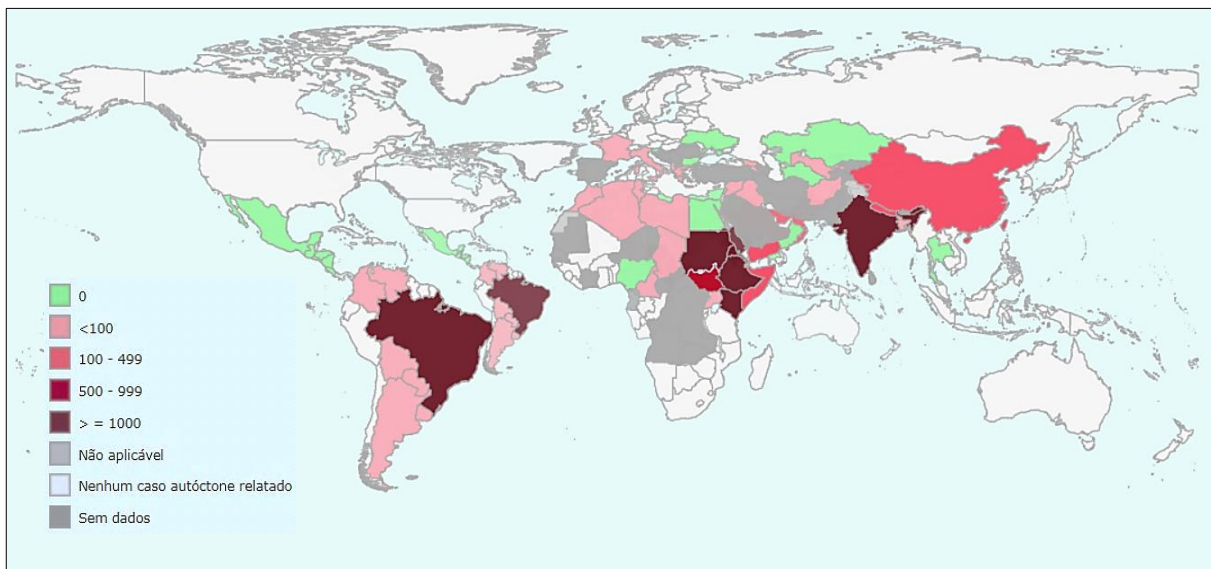
Segundo dados do programa de Leishmaniose Global da OMS para o ano de 2020, cerca de 87% dos casos globais de LV foram relatados em oito países: Brasil, Eritreia, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Em sete países foram relatados mais de 5.000 casos

de CL: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão e República Árabe Síria, que juntos englobam 80% da incidência global de LT relatada. No mesmo ano, 880 casos importados de LT e 99 casos importados de LV foram notificados globalmente (WHO, 2021).

Dados do relatório epidemiológico mais recente publicado pela OMS demonstram que a maioria dos casos da LV ocorre no Brasil, África Oriental e na Índia. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos da doença ocorram em todo o mundo anualmente, com apenas 25% a 45% relatados à OMS (WHO, 2021). A LV continua sendo caracterizada como uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade. No ano de 2019, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (**Figura 1**) (WHO, 2021).

A LV é endêmica em 13 países das Américas, nos quais foram registrados 65.934 casos novos entre 2001 a 2019, com uma média de 3.470 casos por ano. Em 2019, 97% (2.529 casos) do total de casos foram notificados no Brasil, com uma taxa de incidência de 1,2 casos a cada 100 mil habitantes. Os demais foram registrados na Argentina, Bolívia (Estado Plurinacional), Guatemala, Colômbia, Honduras, Paraguai, México, Venezuela (República Bolivariana) e Uruguai.

Figura 1. Distribuição de casos de leishmaniose visceral no mundo em 2020.



Fonte: Adaptado de WHO, 2021a.

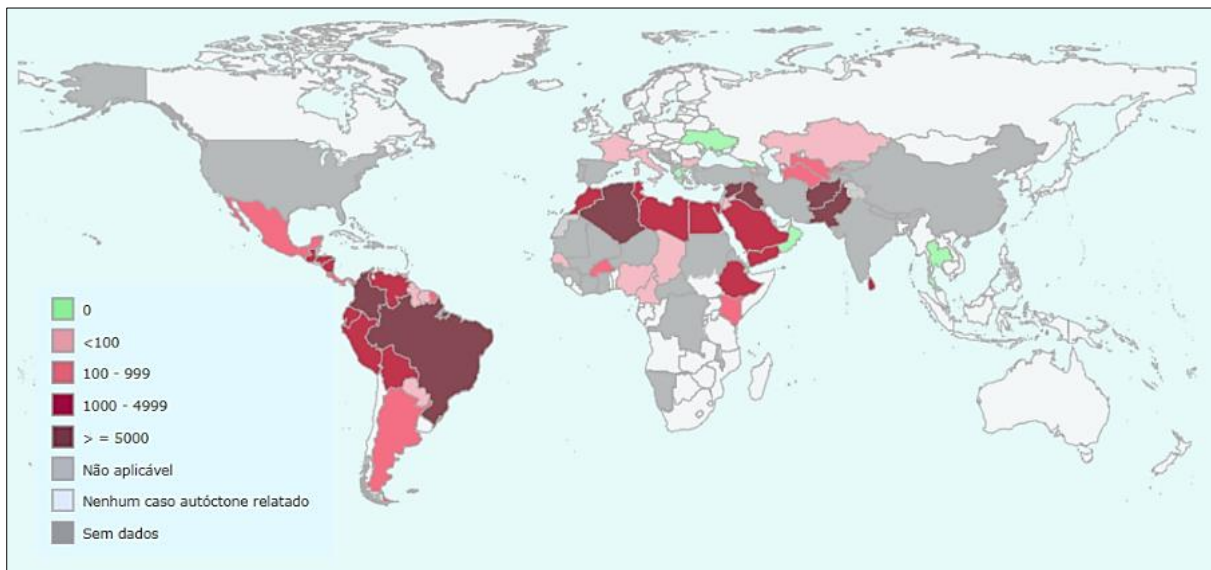
A nível nacional, a autoctonia da LV foi confirmada em 24 Unidades Federativas, com distribuição nas cinco regiões brasileiras, entre as quais a região Nordeste é responsável pelo maior registro de casos do país (49,1%). Os municípios que obtiveram o maior número de casos

em 2019 foram Fortaleza (CE) São Luís (MA), Campo Grande (MS), Belo Horizonte (MG), Teresina (PI), Marabá e Paraupébas (PA) e Araguaína (TO) (PAHO/WHO, 2020)

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, a maior incidência de LV registrados no Brasil encontra-se na região Nordeste, com um total de 1.241 casos notificados em 2019, sendo notificados no Piauí 146 casos da doença (BRASIL, 2020a), e destes, 130 registrados na sua capital, Teresina (BRASIL, 2020b). Já no ano de 2020, foram registrados 116 casos de LV no estado, sendo 35 casos na sua capital (BRASIL, 2021c).

No que diz respeito à LT, está amplamente distribuída, com incidência anual de aproximadamente 1,5 milhões de casos no mundo. A nível mundial, a maioria dos casos da doença encontra-se Países como Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Brasil, Colômbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e República Islâmica do Irã (**Figura 2**). A ocorrência de grandes surtos tem relação com áreas urbanas e periurbanas densamente povoadas. Quando se trata do Velho Mundo, estes surtos estão relacionados principalmente à local de conflitos, campos de refugiados e migração de pessoas em grande escala (PAHO/WHO, 2016a, 2016b).

Figura 2. Distribuição de casos de leishmaniose cutânea no mundo em 2020.



Fonte: Adaptado de WHO, 2021b.

Segundo dados do Ministério da Saúde, foram confirmados 15.484 novos casos de LT no Brasil em 2019, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a cada 100 mil habitantes. A doença possui distribuição em todo o território nacional, com a maioria dos casos registrados na região Norte (42,8%) (BRASIL, 2021a). São registrados cerca de 21.000 casos por ano em média, com coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes nos últimos 5 anos. A

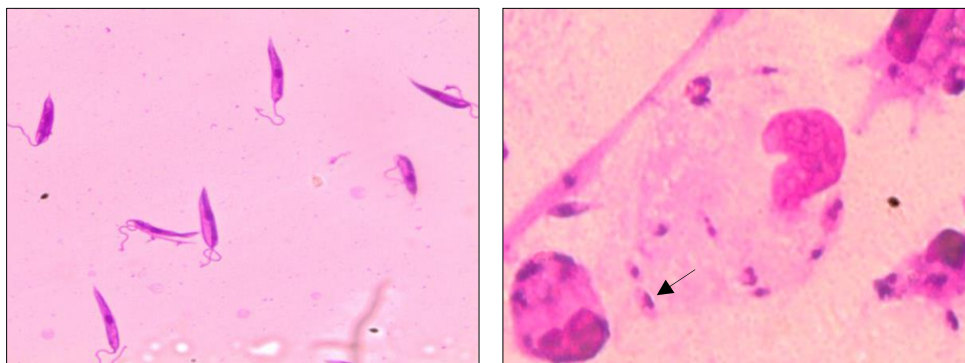
região Norte apresenta o maior coeficiente (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) (BRASIL, 2021b). De acordo com o SINAN, foram notificados na região Nordeste um total de 3.070 casos no ano de 2019, sendo notificados no Piauí 27 casos da doença (BRASIL, 2020c), dos quais 23 foram registrados na sua capital, Teresina (BRASIL, 2020d).

Diante do contexto histórico da leishmaniose, observa-se o aumento do número de casos nos últimos 25 anos em todo o mundo, e pode-se inferir que a evolução da doença está intimamente relacionada a vários fatores: a globalização, mudanças climáticas e fatores humanos como urbanização, desmatamento e migração, os quais contribuem para a disseminação da doença em áreas não endêmicas (STEVERDING, 2017).

2.1.2 Agente etiológico

As leishmanioses têm como agentes etiológicos protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, os quais pertencem à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (AKHOUNDI *et al.*, 2016; MAGILL *et al.*, 2010; STEVERDING, 2017). São causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania*, que são digenéticas e apresentam em duas formas evolutivas principais: promastigota, que apresenta flagelo alongado, se desenvolve no trato digestivo do vetor e é transmitida ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo; e a forma amastigota, arredondada, sem flagelo aparente, parasita intracelular obrigatório de células do SFM dos hospedeiros vertebrados (ALCOLEA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2014) (**Figura 3**).

Figura 3. Formas evolutivas de *Leishmania* spp.



A) Formas promastigotas coradas com panótico rápido®. B) Formas amastigotas internalizadas em macrófago de humano com leishmaniose visceral. Fonte: A) Carvalho *et al.* (2021); B) Arquivo pessoal.

O gênero *Leishmania* apresenta inicialmente uma classificação binomial de acordo com a distribuição geográfica, os aspectos epidemiológicos e manifestações clínicas da doença. As espécies são classificadas, em vista disso, em espécies causadoras de leishmaniose no Velho Mundo (sul da Europa, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia e África) e no Novo Mundo (América Latina) (MANSUETO *et al.*, 2014). A partir de 1970, esses protozoários vêm sendo classificados de acordo com suas características intrínsecas (bioquímicas, imunológicas e moleculares). Assim, foram divididos em dois subgêneros: *Leishmania* para a seção Suprarilyaria, cujo desenvolvimento ocorre no intestino médio do vetor e *Viannia* para a seção Peripylaria, que se desenvolve no intestino posterior do vetor (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

O gênero inclui muitas diversas espécies causadoras das leishmanioses, que divergem na distribuição geográfica, apresentação clínica, risco associado a complicações e resposta ao tratamento (BALASEGARAM *et al.*, 2012) (**Quadro 1**).

Quadro 1. Formas de manifestação da doença e espécies de protozoários relacionadas.

Forma de manifestação da doença	Espécies
Leishmaniose Visceral	<i>L.(L.) donovani</i> , <i>L.(L.) infantum chagasi</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L.(L.) major</i> , <i>L. (L.) tropica</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L.(L.) pifanol</i> , <i>L.(L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> e <i>L. (V.) peruviana</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L.(L.) aethiopica</i> , <i>L.(L.) mexicana</i> e <i>L.(L.) amazonensis</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L.(V.) panamensis</i>

Fonte: Adaptado de Kaye e Scott (2011).

2.1.3 Vetores

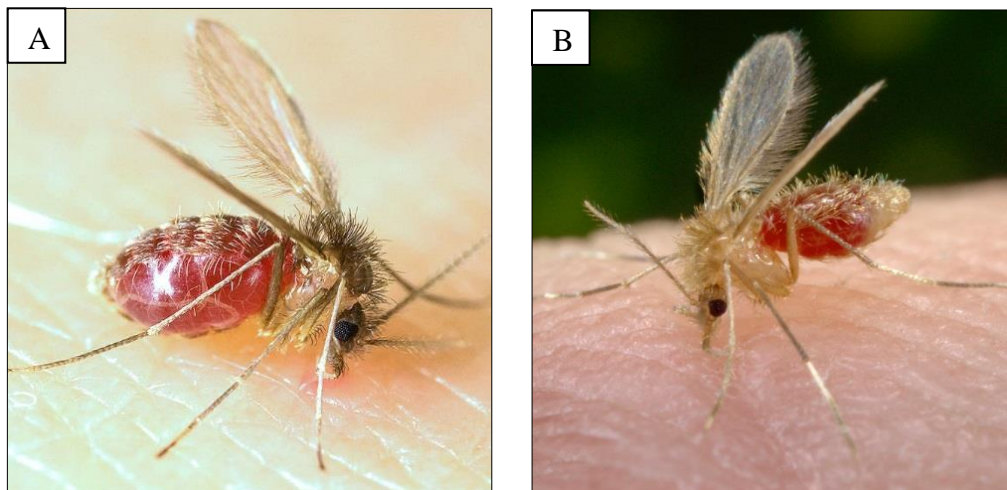
Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos, que pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Atualmente existem mais de 800 espécies de flebotomíneos classificadas, e destas, aproximadamente 375 espécies são encontradas no Velho Mundo e 464 no Novo Mundo. No Velho Mundo, os flebotomíneos pertencem ao gênero *Phlebotomus* (42 espécies são relatadas como comprovadas), e no Novo Mundo ao gênero *Lutzomyia* (56 espécies são relatadas como comprovadas) (CARVALHO; FERREIRA, 2001; GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2015; MAROLI *et al.*, 2013; STEVERDING, 2017). No Brasil, são popularmente

conhecidos como mosquito palha, birigui, tatuquira, entre outros, a depender da localização geográfica (BRASIL, 2019).

No transcurso do seu ciclo de vida, os flebotomíneos passam por quatro estágios de desenvolvimento: ovo, depositados pelas fêmeas adultas em um habitat adequado, rico em conteúdo orgânico, o que fornece às larvas recém-emergidas abrigo, nutrição e umidade; após a fase de larva, em seguida a pupa e por fim o flebotomíneo adulto (MAROLI *et al.*, 2013; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Os flebotomíneos adultos possuem tamanho pequeno, raramente excedendo 3,5 mm de comprimento, são cobertos de pelos densos, possuem pernas longas, variam quanto à coloração, e suas asas possuem forma de 'V' quando estão em repouso (**Figura 4**). Os machos se alimentam de seiva e néctar de plantas, bem como frutas maduras. Já as fêmeas são hematófagas e possuem um hábito alimentar diversificado, ingerindo sangue de seres humanos, cães, gatos e outros mamíferos. Ambos apresentam hábitos noturnos, iniciando-se no crepúsculo vespertino, e seu alcance de voo é curto, cerca de 300 metros. As atividades dos vetores adultos geralmente se restringem em torno dos locais de desenvolvimento das larvas (MARCONDES; ROSSI, 2013; MAROLI *et al.*, 2013; GEORGIADOU *et al.*, 2015).

Figura 4. Insetos vetores da Leishmaniose.



A) *Lutzomyia longipalpis*. B) *Phlebotomus papatasi*. Fêmeas de se alimentando de sangue em humano. Fonte: A) Wilson (2009); B) Gathany (2006).

2.1.4 Reservatórios

Anteriormente a transmissão das leishmanioses estava associada ao ambiente silvestre, porém, nas últimas décadas, a mesma tem sido associada também ao ambiente peridoméstico,

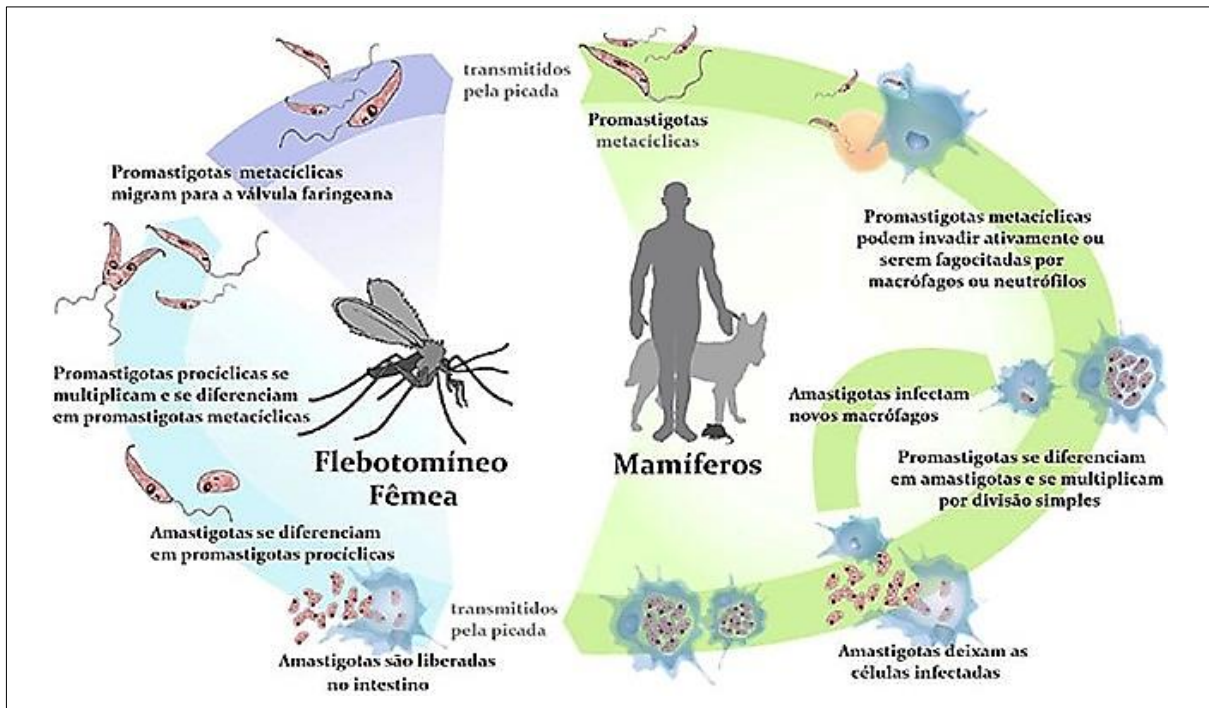
além de se propagar para áreas antes não endêmicas, em consequência da urbanização e desmatamento (REITHINGER *et al.*, 2007).

Dentre os reservatórios envolvidos na transmissão da LT, existem várias espécies de animais silvestres (roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres), sinantrópicos (roedores) e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Com relação a esses últimos, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi esclarecido (BRASIL, 2019). Quanto à transmissão da LV, a principal fonte de infecção na área urbana é o cão (*Canis familiaris*) (SOUZA *et al.*, 2008). Além de cães e outros possíveis reservatórios (roedores, gambás e raposas), foram demonstradas infecções em gatos domésticos (*Felis catus*) (Akhtardanesh *et al.*, 2017; Batista *et al.*, 2020; Benassi *et al.*, 2017; Otranto *et al.*, 2017) A ocorrência de casos humanos tem sido precedida pela enzootia canina, e a prevalência da infecção em cães tem sido maior que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas, marsupiais, roedores, edentados, primatas, entre outros (BRASIL, 2019).

2.1.5 Ciclo biológico

O ciclo se inicia após a fêmea do flebotomíneo realizar repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, onde mesma ingere pequena quantidade de sangue e linfa contendo macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania*. Após ingeridas, as formas amastigotas migram para o intestino médio do flebotomíneo, onde se diferenciam em promastigotas (procíclicas), passando por diferentes estágios de diferenciação morfológica (metaciclogênese), os quais ocorrem modificações na expressão gênica que as tornam infectivas (metacíclicas). Essas formas infectantes avançam para o trato digestivo anterior do inseto, e ao realizar o próximo repasto sanguíneo, o vetor então regurgita as formas metacíclicas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Uma vez na corrente sanguínea do mesmo, ocorre a fagocitose do parasito pelas células fagocíticas mononucleares (macrófagos). Uma vez que a *Leishmania* é resistente à ação microbicida das enzimas (hidrolases ácidas), consegue sobreviver e se multiplicar por divisão binária no interior dos macrófagos de maneira eficaz. Essas células podem sofrer lise, e os parasitos liberados podem se disseminar para novas células de diferentes órgãos, tais como baço, fígado e medula óssea, provocando lesões e destruição de tecidos (**Figura 5**) (KAYE; SCOTT, 2011; SINGH *et al.*, 2014).

Figura 5. Representação do ciclo de vida da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Harhay *et al.* (2011)

2.1.6 Resposta imune à infecção por *Leishmania*

A principal defesa contra *Leishmania* é a capacidade do hospedeiro vertebrado de regular a resposta imunológica mediada por célula, determinada pela proliferação de linfócitos e produção de níveis elevados de citocinas inflamatórias interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), somado ao controle de exacerbadas respostas inflamatórias, que a tornam capaz de controlar ou até mesmo eliminar o parasito (TEIXEIRA *et al.*, 2006; BACELLAR *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2007; SCHNORR *et al.*, 2012).

O controle da infecção se dá através de uma complexa cascata de sinalização na qual estão incluídas células do sistema imune inato como os macrófagos, monócitos, neutrófilos, além dos linfócitos T CD4⁺ da imunidade adaptativa, envolvendo seus subgrupos Th1 e Th2. O sistema imunológico pode operar de maneiras diferentes, a depender da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (BHOR; RAFATI; PAI, 2020; FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Após a entrada do parasito, o sistema imune inato do hospedeiro oferece duas respostas para combater o parasito. A primeira resposta do organismo tanto na LT quanto na LV se trata do confinamento do patógeno no ambiente da infecção, juntamente com o recrutamento das células inflamatórias no microambiente (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). A segunda resposta do organismo envolve o reconhecimento do patógeno pelos fagócitos, por

meio da interação entre os Receptores de Reconhecimento de Padrão (PPRs) com as proteínas Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs). Por conseguinte, ocorre a ativação de fatores de transcrição implicados na ativação de genes que agem codificando inúmeras citocinas nas células apresentadoras de antígenos (APCs), e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais que são capazes de provocar a morte do parasito (BHOR; RAFATI; PAI, 2020; FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Posteriormente à resposta inicial através do sistema imune inato, o parasito é captado pelas células dendríticas epidérmicas, que migram até os linfonodos regionais, diferenciando-se em células dendríticas apresentadoras de antígenos, originado então um antígeno específico. (SANTOS *et al.*, 2016). Essas células atuam tanto na apresentação desses antígenos aos linfócitos T virgens quanto na produção de Interleucina-12 (IL-12). A IL-12 age ativando as células Natural Killer (NK) e T CD8⁺, promovendo a diferenciação das células T CD4⁺ em linfócitos Th1, dando início à resposta imune celular (BLACKWELL, 2018; CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO; COUTINHO, 2014; COSTA, 2013).

Por sua vez, os macrófagos ativados, seja pela interação com o parasito ou através das citocinas secretadas por células Th1, passam a produzir óxido nítrico (NO) bem como EROs, as quais são mediadas pelo IFN- γ durante a fagocitose, e todo esse conjunto é relacionado com a resistência à infecção, sendo primordial para se debelar o parasito intracelular. Porém, quando ocorre resposta imune celular do tipo Th2, com suas citocinas relacionadas, como a IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, ocorre a produção de anticorpos, associados macrófagos alternativos, que acabam aumentando a susceptibilidade, multiplicação e disseminação do parasito, favorecendo sua sobrevivência dentro dos macrófagos e uma possível não cura (BACELLAR, 2008; FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Outras células importantes para a resposta imunológica causada pela *Leishmania* são os monócitos, que identificam o parasito através de outros monócitos infectados, produzindo NO e EROs, e além deles, também as células NK também são importantes por produzem TNF e citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, e são estimuladas por IL-12 (BACELLAR, 2008; FREITAS; PINHEIRO, 2010; SANTOS *et al.*, 2016).

2.1.7 Tratamento

Atualmente, estão disponíveis algumas opções de terapia para o tratamento das leishmanioses, podendo variar de acordo com a manifestação clínica, espécie de *Leishmania* e localização geográfica. Uma vez que vacinas contra as leishmanioses não foram ainda

desenvolvidas para humanos, é notável a importância para a melhora e/ou cura do indivíduo, tendo em vista que o tratamento bem-sucedido ainda configura uma medida chave no controle da doença. Porém as alternativas disponíveis são insatisfatórias por apresentarem inúmeras limitações, tais como: severos efeitos adversos, toxicidade, dificuldade de administração, longos períodos de tratamento, além de serem onerosas e ocasionarem o desenvolvimento de resistência pelos parasitos. Além desses entraves, as drogas podem apresentar atividades antiparasitárias variáveis em diferentes espécies (CROFT; OLLIARO, 2011; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A primeira linha no tratamento da doença são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), os quais apresentam diversos efeitos adversos, como problemas gastrointestinais, pancreatite, fadiga, dores musculoesqueléticas, transaminite, lipase elevada, trombocitopenia, leucopenia, alterações em exames de eletrocardiograma (ECG) e cardiotoxicidade (ALMEIDA; SANTOS, 2011; SANTOS *et al.*, 2008).

A Anfotericina B (Anf B) é um antibiótico e é indicado como primeira escolha para o tratamento da LTA em gestantes, e como segunda escolha quando a resposta ao Sb^{+5} não obtiver sucesso (CARVALHO, 2012). A Anf B atua com toxicidade seletiva na membrana citoplasmática da *Leishmania*, através de interferência no esteroide ergosterol (BRASIL, 2013). De acordo com Almeida e Santos (2011), apesar da droga ser a segunda opção para tratamento da LTA, são necessários estudos randomizados para diferentes protocolos terapêuticos com a mesma.

As Pentaminas consistem em diamidinas aromáticas, utilizadas nas formulações Isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e Mesilato (Di-B-Hidroximetil-Sulfonato) para tratamento de segunda escolha na LT na América, Ásia e África (BRASIL, 2013). Quando indicadas, é necessário que o paciente seja bem orientado quanto à alimentação durante o período de tratamento, visto que o mecanismo de ação da droga pode levar ao surgimento de diabetes insulino-dependente por estar relacionada com o metabolismo da glicose, com citólise das células Beta, das ilhotas de Langerhans no pâncreas responsáveis pela produção de insulina; (BRASIL, 2013).

Dentre os compostos alternativos que vêm sendo usados para o tratamento da LT, estão associações do antimoniato com a pentoxifilina, sulfato de aminiosidina, sulfato de paramomicina ou imunoterápicos (BRASIL, 2013). A Pentoxifilina possui ação vasodilatadora e inibitória sobre TNF. Em estudo de Machado *et al.* (2007) em pacientes com LMC tratados com a Pentoxifilina, foi demonstrada maior eficácia na cicatrização das lesões quando

comparada com o Sb^{5+} isoladamente. Os efeitos adversos apresentados foram náuseas, artralgia, tontura, dor abdominal e diarreia (ALMEIDA; SANTOS, 2011; MACHADO *et al.*, 2007).

A Paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo extraído de culturas da bactéria *Streptomyces rimosus*, e Santos *et al.* (2008), avaliando-se sua ação associada à uma solução hidrofílica para uso tópico em 15 pacientes com a LCL, demonstraram que a droga foi eficiente quando comparado ao uso de Sb^{5+} , principalmente em quanto aos efeitos adversos. Os mesmos autores incentivam novos estudos com as diferentes espécies de *Leishmania*, pois esses foram resultados com indivíduos infectados por *L. braziliensis*.

A Miltefosina (hexadecilfosfolina) é outro fármaco que tem demonstrado bons resultados, especialmente para a espécie *L. guyanensis*. Trata-se de um alquil-fosfolípido com indicação para tratamento antineoplásico, sendo o único medicamento anti-*Leishmanial* oral atualmente disponível. Todavia, sua eficácia na Índia e no Nepal está diminuindo com recaídas em até 20% dos casos (RIJAL *et al.*, 2013 ; SUNDAR *et al.*, 2012). Apesar de ser muito tóxica às formas promastigotas da *Leishmania*, sua atividade sobre formas amastigotas relaciona-se com seus efeitos sobre os macrófagos e linfócitos T (ALMEIDA; SANTOS, 2011). Em decorrência da sua meia-vida longa aproximadamente 150 horas, e também ao longo período de tratamento (28 dias), é susceptível ao desenvolvimento de resistência (PEREZ-VICTORIA *et al.*, 2006). Quanto aos efeitos adversos, o medicamento causa náuseas, vômitos e aumento dos níveis de creatinina (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

Imiquimod é um quimioterápico utilizado para tratamento de Condiloma acuminado (verrugas externas, genitais e anais), que tem como ação o estímulo da resposta Th1 através da produção de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ e IL-12, induzindo o macrófago a produzir NO, o que lhe confere atividade leishmanicida (BUATES; MATLASHEWSKI, 1999; KAPSENBERG, 2003). Quando em uso tópico, o Imiquimod associado ao Sb^{5+} promoveu cura clínica em 50%, 61% e 72% dos pacientes com LT tratados durante um, dois e três meses, respectivamente, resultados estes superiores quando comparado ao Sb^{5+} isoladamente com 15%, 25% e 35%, respectivamente. Os efeitos adversos relatados foram dor, edema, prurido, queimadura e eritema (MIRANDA-VERÁSTEGUI *et al.*, 2005).

2.2 Plantas medicinais e produtos naturais

Estudos comprovam que espécies vegetais são fontes potenciais para o desenvolvimento de novos e seletivos fármacos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, principalmente causadas por protozoários (BORGES; MULLEN; CROZIER, 2010; BUZZINI

et al., 2008; KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005; SINGH *et al.*, 2014), e podem ser explorados com sucesso para o desenvolvimento de drogas com atividade anti-*Leishmania* (FUNARI *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-COLOMA *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2014; MANSOUR *et al.*, 2013; TORRES *et al.*, 2014).

A investigação do potencial farmacêutico dos produtos naturais é a principal estratégia para a descoberta de novos fármacos que podem ser menos onerosos e menos tóxicos que os medicamentos convencionais. Esta área propicia inúmeras possibilidades, tendo em vista que a flora mundial representa uma vasta fonte de material para realização de testes (TIUMAN *et al.*, 2011). Dessa forma, os produtos naturais representam uma fonte imensurável de bioativos que podem tratar várias enfermidades, o que pode ser observado em muitas regiões do mundo onde a leishmaniose é endêmica, em que populações locais fazem uso de plantas medicinais para tratamento de diferentes formas de leishmaniose (LEZAMA-DÁVILA *et al.*, 2016).

Diversos metabólitos secundários de plantas como alcaloides, saponinas, quinonas, terpenos, compostos fenólicos e seus derivados possuem, dentre outras, propriedades antiparasitárias, e dessa forma as plantas e seus produtos naturais são considerados como fontes potenciais para o isolamento de compostos com atividades leishmanicidas ou imunoestimulantes (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). Nessa perspectiva, vários estudos e artigos de revisão têm tratado sobre a avaliação do potencial anti-*Leishmania* de compostos derivados de produtos naturais para descoberta de novos agentes terapêuticos (ALVES *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2012; CARVALHO, *et al.*, 2021; CHOWDHURY *et al.*, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2017; GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIERJONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; MISHRA *et al.*, 2009; ODONNE *et al.*, 2017; PASSERO *et al.*, 2014; SALAMA; ARRAIS-SILVA; ARRAIS-LIMA, 2017; SINGH *et al.*, 2014; TIWARI *et al.*, 2018).

O Brasil é um país rico em diversidade de biomas, cujo território possui cinco principais: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga. Portanto, que podem ser explorados quanto à sua ampla fonte de substâncias ativas. Entretanto, este potencial para a descoberta de plantas com atividades farmacológicas é pobremente explorado ou regulamentado, em contraste com o que ocorre em países desenvolvidos (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2013).

2.2.1 *Anacardium occidentale* L.

A família Anacardiaceae é composta por cerca de 70 gêneros e 700 espécies de plantas, sendo o *Anacardium* um dos gêneros, constituído por aproximadamente 22 espécies, das quais 21 são originárias das Américas do Sul e Central e uma da Malásia. Dentre essas espécies já relatadas, apenas a espécie *Anacardium occidentale* Linn, de origem brasileira, é explorada comercialmente (SERRANO; PESSOA, 2016).

A. occidentale, o cajueiro (**Figura 6**), é uma planta nativa do nordeste brasileiro com significativa capacidade de adaptação a solos com baixa fertilidade, a elevadas temperaturas e ao estresse hídrico (LIMA, 1988). O cajueiro está presente em vasta área do litoral brasileiro desde quando foi descoberto e reconhecido o seu valor pelos colonizadores, sendo disseminado por quase todas as regiões do Brasil, além de ser levado para o exterior, constituindo-se para muitos países uma fonte de exploração com grande relevância econômica (BARROS, 2002). A maior diversidade de *A. occidentale* se encontra no Nordeste brasileiro, em vários tipos de ecossistemas, principalmente nas zonas costeiras, constituindo a vegetação de praias, dunas e restingas, em destaque nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (CRISÓSTOMO *et al.*, 2002).

Figura 6. *A. occidentale* (cajueiro).



Fonte: <cerratinga.org.br/caju/>

No Brasil, o cajueiro é utilizado na medicina popular para diversas aplicações como líquido para higiene bucal, analgésico, diurético, tratamento de astenia, problemas respiratórios

como gripe, bronquite, e tosse, infecções genitais, escorbuto infantil, doenças de pele como eczema, sarna, verrugas e feridas (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009), dor de garganta, aftas, diabetes, cólicas intestinais e debilidade muscular (BOSCOLO; SENNAVALLE, 2008). Diversas atividades desta espécie já foram comprovadas, como disposto na tabela 1.

Tabela 1. Efeitos farmacológicos das espécies de *A. occidentale*.

(continua)

Efeito farmacológico	Referência
Antioxidante	ADEOGUN <i>et al.</i> , 2016; AJILEYE <i>et al.</i> , 2015; ANUJA; YADAV; SRINIVASAN, 2015; DA SILVA <i>et al.</i> , 2016; EMELIKE; AKUSU; UJONG, 2017; RAJESH <i>et al.</i> , 2015; SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 2015; SOUZA <i>et al.</i> , 2017; SUDJAROEN; THONGKAO; SUWANNAHONG, 2018a; TAN; CHAN, 2014; TREVISAN <i>et al.</i> , 2006; WAHYUNI <i>et al.</i> , 2018
Anti-inflamatório	OLAJIDE <i>et al.</i> , 2013; ONASANWO, <i>et al.</i> , 2012; SOUZA <i>et al.</i> , 2017; PAWAR <i>et al.</i> , 2000; RAJESWARAMMA <i>et al.</i> , 2018; THOMAS <i>et al.</i> , 2015; VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2015; VILAR <i>et al.</i> , 2016
Antimicrobiano	AJILEYE <i>et al.</i> , 2015; AKINPELU <i>et al.</i> , 2001; DA SILVA <i>et al.</i> , 2016; DIAS-SOUZA <i>et al.</i> , 2017; DOSS <i>et al.</i> , 2011; IFESAN <i>et al.</i> , 2013; RAJESH <i>et al.</i> , 2015; SIJA <i>et al.</i> , 2015
Antibacteriano	AISWARYA <i>et al.</i> , 2011; HIMEJIMA; KUBO, 1991; MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2012; TAN; CHAN, 2014; SUDJAROEN; THONGKAO; SUWANNAHONG, 2018a; THOMAS <i>et al.</i> , 2015; WAHYUNI <i>et al.</i> , 2018
Citotóxico	ANAND <i>et al.</i> , 2015; SUDJAROEN; THONGKAO; SUWANNAHONG, 2018a
Indução diabética	ELIAKIM-IKECHUKWU; OBRI; AKPA, 2010; SAMBO; OLATUNDE; LUKA, 2014; TSHIAMA <i>et al.</i> , 2018; UKWENYA <i>et al.</i> , 2013
Hipolipemiante	ANYAEGBU; AJAYI; ADEDAPO, 2017; FAZALI <i>et al.</i> , 2011; HASAN <i>et al.</i> , 2015; NWOZO; AFOLABI; OYINLOYE, 2016
Antimutagênico	MELO-CAVALCANTE <i>et al.</i> , 2003
Analgésico	OMODAMIRO; ACHI, 2018; ONASANWO <i>et al.</i> , 2012; PAWAR <i>et al.</i> , 2000
Antitirosinase	TAN; CHAN, 2014
Genotóxico	KONAN <i>et al.</i> , 2007
Hipoglicêmico	NWOZO; AFOLABI; OYINLOYE, 2016; OMOBOYOWA; AFOLABI; ARIBIGBOLA, 2018; SAIDU <i>et al.</i> , 2012; SOKENG <i>et al.</i> , 2007; TEDONG <i>et al.</i> , 2006; UKWENYA <i>et al.</i> , 2012
Cicatrização de feridas	NEHETE; TATKE, 2015; VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2015
Atividade da acetilcolinesterase	DE LIMA <i>et al.</i> , 2008
Anticâncer	SUDJAROEN; THONGKAO; SUWANNAHONG, 2018b
Antiaderente	MENEZES <i>et al.</i> , 2014

Tabela 1. Efeitos farmacológicos das espécies de *Anacardium occidentale* L.

(conclusão)

Efeito farmacológico	Referência
Redução da placa dentária e gengivite	GOMES <i>et al.</i> , 2016
Inseticida	MARQUES; ALBUQUERQUE; XAVIER-FILHO, 1992
Antifúngico	OLADELE; ISHOLA, 2017
Antisickling	TSHIAMA <i>et al.</i> , 2018
Antibiofilme	DIAS-SOUZA <i>et al.</i> , 2013; DIAS-SOUZA <i>et al.</i> , 2017
Efeito vermícida na ancilostomíase humana	EICHBAUM; KOCH-WESER; LEAO, 1950
Antivetorial	LAURENS <i>et al.</i> , 1997
Esquistossomicida	ALVARENGA <i>et al.</i> , 2016
Larvicida	TORRES; GARBO; WALDE, 2015; TORRES; GARBO; WALDE, 2017; TRIPATHY <i>et al.</i> , 2011
Ovicida	TORRES; GARBO; WALDE, 2017
Protetor renal	TEDONG <i>et al.</i> , 2006
Anti-hipertensivo	DA COSTA <i>et al.</i> , 2018
Antidepressivo	PANJWANI; PUROHIT; SIDDIQUI , 2015
Anticonvulsivante	PANJWANI; PUROHIT; SIDDIQUI , 2014
Anti-helmíntico	KAMAT <i>et al.</i> , 2003

Fonte: Adaptado de Salehi *et al.* (2020).

O caju, pseudofruto de *A. occidentale*, é conhecido pelo sabor e valor nutricional de suas amêndoas e pedúnculos, e faz parte de uma cultura de grande importância socioeconômica para o Brasil (SANTOS; MAGALHÃES, 1999). O fruto do cajueiro, conhecido popularmente como castanha de caju, apresenta casca coriácea lisa e mesocarpo alveolado. Localizada na parte mais interna da castanha encontra-se a amêndoa, que é constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, compondo a parte comestível do fruto, e revestida por uma película de tons avermelhados (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

A casca da castanha de caju apresenta uma estrutura interna semelhante a favos de mel, denominada pericarpo, onde está presente um líquido viscoso de coloração marrom escuro, chamado de líquido da casca da castanha de caju (LCC) ou cashew nut shell liquid (CNSL) como é conhecido internacionalmente (GANDHI; PATEL; DHOLAKIYA, 2012). Surgiu em 1943, em meio à 2ª Guerra Mundial, um grande interesse a nível industrial pelo cajueiro devido ao LCC (LIMA, 1988), e no decorrer dos anos a amêndoa e o LCC se tornaram os principais

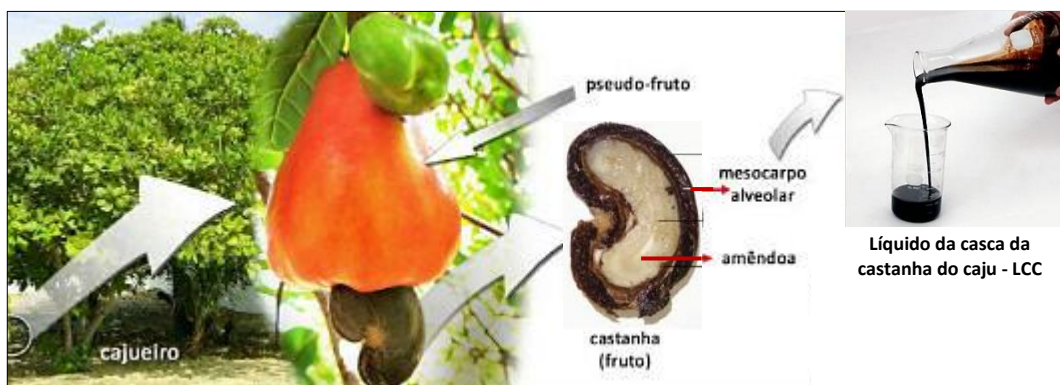
produtos provenientes do cajueiro destinados para exportação (SANTOS; MAGALHÃES, 1999).

2.2.2 Líquido da casca da castanha do caju (LCC)

Depois da castanha, o segundo principal produto do cajueiro é o LCC, seguido pelo suco da polpa do pseudofruto ou pedúnculo, o caju (MOTHÉ; MILFONT Jr, 1994). Em países da América do Sul, África e Ásia, o LCC, tem sido utilizado há décadas na medicina tradicional (AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2009; DA SILVA *et al.*, 2018; KUDI *et al.*, 1999), apresentando pouco valor a nível comercial, porém alto potencial tecnológico em virtude de seus derivados fenólicos, amplamente explorados isoladamente, o que lhe confere várias aplicações biológicas, como atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, fungicidas, antiacetilcolinesterase, moluscicidas, larvicidas e inseticidas, exibindo grande potencial terapêutico (BALGUDE; SABNIS, 2014; KUBO *et al.*, 1993a; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2011). Estudo de Lemes *et al.*, (2016) objetivou a síntese de derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer.

Para a obtenção do LCC, podem ser empregados diferentes processos como extração a frio (prensas), extração por solvente, processo térmico-mecânico (*hot oil process*), onde o próprio LCC quente é utilizado para aquecer as castanhas *in natura* a aproximadamente 190°C. Ao alcançar esta temperatura, ocorre o rompimento da casca externa, liberando os alquifenois contidos no mesocarpo, seguindo para a remoção da casca interna, o que possibilita a recuperação das amêndoas ou a extração supercrítica com CO₂, onde o rendimento é aproximadamente 100% (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009) (**Figura 7**).

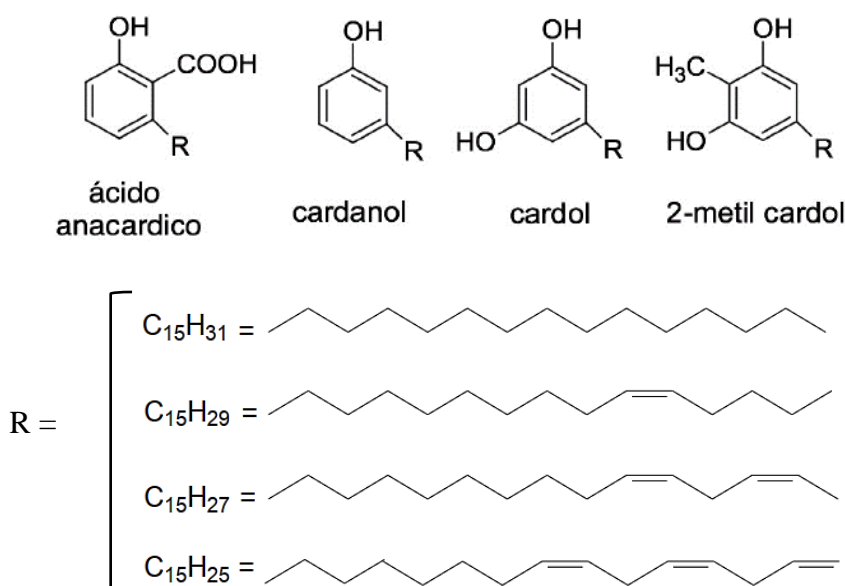
Figura 7. Cajueiro, caju, castanha e o LCC.



Fonte: Adaptado de Mazzetto, Lomonaco e Mele (2009).

O LCC é uma fonte natural de compostos fenólicos, que apresentam a uma longa cadeia alifática de quinze carbonos, na posição meta em relação à hidroxila, que pode ser saturada ($C_{15}H_{31}$) e/ou insaturada com uma ($C_{15}H_{29}$), duas ($C_{15}H_{27}$) e três ($C_{15}H_{25}$) insaturações. O LCC é classificado em natural (extraído por solvente) e técnico (submetido a altas temperaturas), sendo o LCC natural constituído de ácido anacárdico (60-65%), cardol (15-20%), cardanol (10%), e traços de metilcardol, e o LCC técnico composto principalmente por cardanol (60-65%), cardol (15-20%), material polimérico (10%), e traços de metilcardol (MELE; VASAPOLLO, 2008; MENON *et al.*, 1985) (**Figura 8; Tabela 2**).

Figura 8. Estruturas químicas dos principais constituintes do LCC.



Fonte: Mazzetto, Lomonaco e Mele (2009).

Tabela 2. Composição química do LCC natural e LCC técnico.

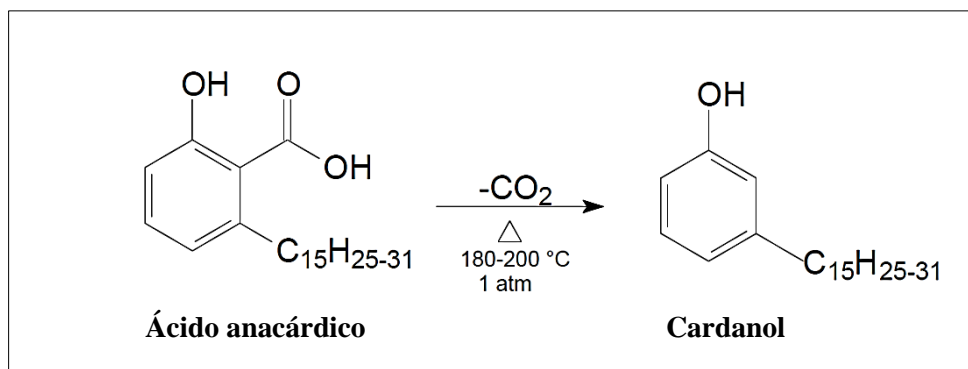
Componentes Fenólicos	LCC natural (%)	LCC técnico (%)
Ácido Anacárdico	71,70 – 82,00	1,09 – 1,75
Cardanol	1,60 – 9,20	67,82 – 94,60
Cardol	13,80 – 20,10	3,80 – 18,86
2-Metilcardol	1,65 – 3,90	1,20 – 4,10
Componentes minoritários	2,20	3,05 – 3,98
Material polimérico	----	0,34 – 21,63

Fonte: Mazzetto; Lomonaco e Mele (2009).

2.2.2.1 Ácido anacárdico

O ácido anacárdico (AA) se encontra em grande quantidade no LCC natural, porém no LCC Técnico, a sua descarboxilação através do aquecimento dá origem ao cardanol (Figura 9). É um composto fenólico biossintetizado por meio dos ácidos graxos e constituem aproximadamente de 70 a 90% LCC natural, sendo responsáveis pelas propriedades cáusticas e irritantes desse líquido (FRANÇA *et al.*, 2016). Ao ser submetido a altas temperaturas (180°C), o AA sofre reação de descarboxilação, convertendo-se a cardanol e produzindo o LCC técnico (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009) (**Figura 9**).

Figura 9. Processo de descarboxilação do AA.



Fonte: Adaptado de Mazzetto, Lomonaco e Mele (2009).

Embora o AA seja corrosivo e tóxico, são conhecidos seus efeitos medicinais, como atividade antimicrobiana (HIMEJIMA; KUBO, 1991; MUROI; KUBO, 1996), antitumoral (HEMSHEKHAR *et al.*, 2012; ITOKAWA *et al.*, 1987; KUBO *et al.*, 1993b; SEONG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2011), moluscicida (KUBO *et al.*, 1986), na inibição da acetilcolinesterase (STASIUK; BARTOSIEWICZ; KOZUBEK, 2008), da histona lipoxigenase (GRAZZINI *et al.*, 1991; HA; KUBO, 2005) e da prostaglandina sintase (KUBO *et al.*, 1987), além de possuir atividade inibitória contra gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (PEREIRA *et al.*, 2008). De acordo com Andrade *et al.* (2011), esse composto é responsável por apresentar uma atividade biológica de desnaturação de proteínas dos microorganismos.

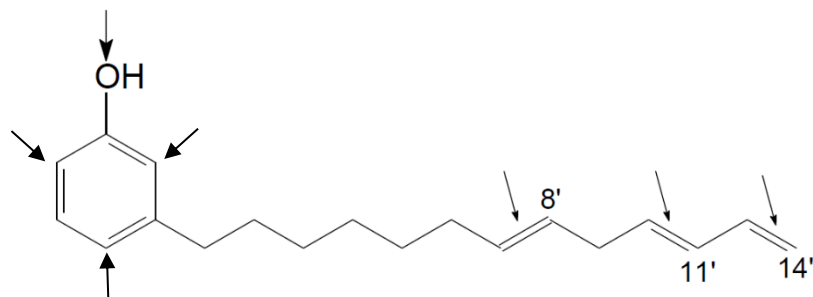
2.2.2.2 Cardanol

O cardanol (CN) é o principal constituinte do LCC técnico e é considerado um dos mais importantes e promissores componentes do LCC. Por ser um subproduto da indústria de

castanha, qualquer melhoria, seja na concentração e/ou separação, caracteriza-se efetivamente como uma inovação tecnológica (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

O CN consiste em uma mistura de 3-n-pentadecilfenol, 3-(n-pentadeca-8-enil) fenol, 3-(n-pentadeca-8,11-dienil) fenol, 3-(n-pentadeca-8,11,14-trienil) fenol. Quando comparado com os derivados fenólicos similares, este composto demonstra particularidade quanto às suas características químicas e físicoquímicas. Os sítios reacionais da sua molécula, como posições das ligações duplas e os usuais do anel fenólico (**Figura 10**), permitem a funcionalização de sua molécula, propiciando ao CN estabilidade térmica em temperaturas elevadas, caráter anfifílico e lipídico, antioxidante, resistência à chama e hidrofobicidade (LOCHAB; SHUKLA; VARMA 2014; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009; VOIRIN *et al.*, 2014).

Figura 10. Principais sítios reacionais da molécula do CN.



Fonte: Adaptado de Mazzetto, Lomonaco e Mele (2009).

A estrutura fenólica presente no composto aumenta a probabilidade da atividade bactericida do CN. Já as insaturações são responsáveis por promover lipossolubilidade, facilitando sua passagem através da membrana celular, conferindo-lhe atividade larvicida, além de aumentar a funcionalização de sua molécula. Tal funcionalização permite ampliar as aplicações do CN, elevando-se assim o interesse da academia e indústria em explorá-lo (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

Inúmeras propriedades atraentes dessa substância já foram demonstradas, como elevada solubilidade em solventes orgânicos, boa processabilidade, hidrofobicidade, além de baixa volatilização e ponto de ebulição mais elevado que os outros compostos fenólicos. Além disso, vem sendo aplicado como surfactantes, plastificantes, revestimentos, além de demonstrar atividades biológicas, como antibacteriana, antioxidante, antifúngica e antitumoral, além de entre outros (AMORATI *et al.*, 2001; BALACHANDRAN *et al.*, 2013; BLOISE *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 1998; MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

De acordo com a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2002), o CN apresenta como uma de suas características principais a não toxicidade. Testes realizados por esta organização mostraram os seguintes resultados quanto à ecotoxicidade do CN: biodegradabilidade - 96% (28 dias) - (OECD-302C, 2009); solubilidade em água igual a 1,0 g/L; ecotoxicidade (96 h): peixe < 11 g/L; dáfneas < 66 g/L; algas < 1 g/L - (OECD-425, 2008) e quanto à genotoxicidade com empregando-se o teste Ames *Salmonella* apresentou resultado negativo.

2.2.2.3 Cardol

O cardol (CD) (Figura 5) está presente em menores concentrações tanto no LCC técnico (3,8 a 18,6 %) quanto no LCC natural (13,8 a 20,21%) e possui estrutura semelhante à do AA, por apresentar uma segunda hidroxila no anel aromático (LOMONACO *et al.*, 2009), e apesar de inicialmente ter sido caracterizado como tóxico (WASSERMAN; DAWSON, 1948) estudos posteriores publicados por Suresh e Kaleysa Raj (1990) comprovaram tolerância de até 5 g/kg em ratos. Foi observada atividade antifilaríase (SURESH; KALEYSA RAJ, 1990), contra *Biomphalaria glabrata* (caramujo vetor esquistossomose) (KUBO; KOMATSU; OCHI, 1986) e nematódeo *Setaria digitata* (TUNDO; ROSSI, 2004) e na inibição da acetilcolinesterase (STASIUK; BARTOSIEWICZ; KOZUBEK, 2008). Ainda possui outras aplicações, tais como atividade antioxidante, larvicida e bactericida (OSMARI *et al.*, 2015).

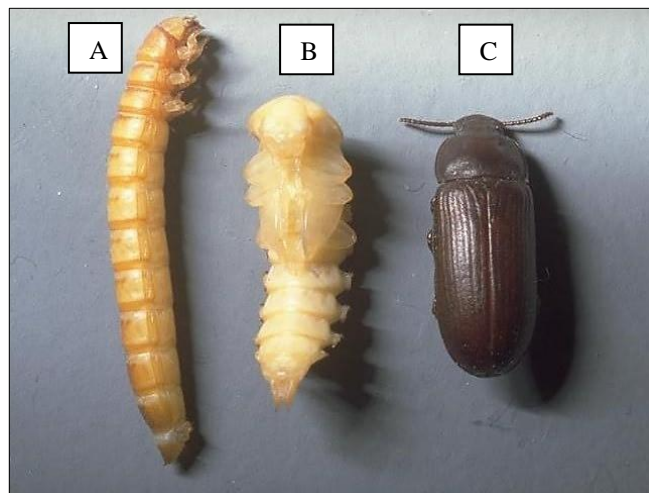
2.3 *Tenebrio molitor*

O estudo com insetos apresentou um grande desenvolvimento a partir do início do século XX por ser um grupo que contém uma diversidade de espécies. Dentre elas, está o *Tenebrio molitor*, pertencente à família Tenebrionidae, geralmente encontrado em regiões desérticas e em lugares secos. Conhecido popularmente como larva-da-farinha, alimentam-se de grãos de cereais e farinhas (LIMA, 1955).

O ciclo de vida de *T. molitor* dura entre 280-630 dias, a depender das condições de produção. Inicia-se com a oviposição 400-500 ovos por cada fêmea, e estes variam de 1,7-1,8 mm de comprimento e 0,6-0,7 mm de largura, sendo seu período de incubação de entre uma semana (27 °C) a duas semanas (25 °C). Após esse período, seguem para a fase larvar, que dura entre 90 a 140 dias. Inicialmente as larvas apresentam coloração branca e medem 0,2 cm de

comprimento, podendo atingir nesta fase 1 g de peso e 3 cm de comprimento, adquirindo então uma coloração amarela. Passam em seguida à fase de pupa, que apresenta 1 cm de comprimento, e pode durar de 6 (28 °C) a 18 dias (18 °C) (GHALY; ALKOAİK, 2009). Após 15 dias, chegam à fase adulta (besouros), adquirindo uma cor vermelha-acastanhada que aos poucos vai escurecendo até se tornar preta. A última fase pode durar de um a três meses (**Figura 11**). Diversos fatores ambientais podem influenciar o desenvolvimento de *T. molitor*, tais como temperatura, umidade, alimentação, stress e a presença de patógenos, sendo os principais a temperatura e a umidade relativa (SPANG, 2013).

Figura 11. Fases do desenvolvimento morfológico do *T. molitor*.



A: Fase larval. B: Fase de pupa. C: Besouro.

Fonte:<agrolink.com.br/upload/problemas/Tenebrio_molitor7.jpg>

O uso de larvas de *T. molitor* para a comercialização e consumo animal e humano tem crescido nos últimos tempos, devido à sua composição nutricional, facilidade de manuseio e criação e ciclo de vida curto (HAN *et al.*, 2010). Além disso, perante o conflito ético e aspectos sociais, busca-se priorizar cada vez mais o uso de modelos alternativos em pesquisa experimental, como o *T. molitor*, tendo em vista que em insetos o sistema imune inato é evolutivamente conservado (CANTERI, *et al.*, 2018). Devido a essas características, tem-se aumentado o interesse pelo uso desse inseto como modelo alternativo para estudos *in vivo* para avaliação de diversas atividades como antimicrobiana (MOREY, *et al.*, 2016), toxicidade (VAN DER VALK; MEIJDEN, 2014) inseticida (WANG, *et al.*, 2015) e de patogenicidade (McGONIGLE, *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a ação anti-*Leishmania*, tóxica e imunomoduladora do líquido da casca da castanha do caju (LCC), cardol (CD), cardanol (CN) e ácido anacárdico (AA).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade do LCC, CD, CN e AA sobre formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major*;
- Avaliar o potencial citotóxico do LCC, CD, CN e AA sobre macrófagos peritoneais murinos;
- Investigar a ação do LCC e CN sobre formas amastigotas de *L. infantum* internalizadas em macrófagos;
- Avaliar o potencial imunomodulador do LCC, CD, CN e AA sobre a atividade lisossomal, capacidade fagocítica e síntese de óxido nítrico;
- Determinar a toxicidade aguda *in vivo* do LCC e CN sobre larvas de *T. molitor*.

4 CAPÍTULO I

Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador do líquido da casca da castanha do caju (LCC), ácido anacárdico, cardanol e cardol

Resumo

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmicas em 98 países, constituindo um grande problema de saúde pública. Os tratamentos convencionais causam efeitos adversos graves, baixa tolerância, desenvolvimento de cepas resistentes, e são onerosos. Produtos naturais têm sido investigados na busca por alternativas terapêuticas. O líquido da casca da castanha do caju (LCC), fonte natural de compostos fenólicos como ácido anacárdico (AA), cardanol (CN) e cardol (CD), apresenta atividades antioxidantes, antiinflamatórias, antimicrobianas, antitumorais, larvicidas e inseticidas. Objetivou-se avaliar atividades anti-*Leishmania*, citotóxica e imunomoduladora do LCC, AA, CN e CD. As substâncias demonstraram potencial anti-*Leishmania*; os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) do LCC, AA, CN e CD contra *L. infantum* foram: 148,12; 106,45; 56,74 e 154,32 µg/mL, contra *L. braziliensis*: 85,71; 50,83; 64,28 e 137,05 µg/mL, contra *L. major*: 153,56; >800; 122,31 e 112,50 µg/mL, respectivamente. As concentrações citotóxicas médias (CC₅₀) do LCC, AA, CN e CD foram 37,51; 12,59; 31,44 e 40,53 µg/mL, respectivamente. LCC e CN reduziram significativamente o percentual de macrófagos infectados, com índice de seletividade (IS) >20 para CN. LCC, AA, CN e CD causaram aumento da capacidade fagocítica e do volume lisossomal, contudo não exibiram indução significativa da síntese de óxido nítrico. As taxas de sobrevivência das larvas de *T. molitor* foram: 85%, 75% e 60% em contato com LCC e 85%, 60% e 40% em contato com CN, ambas as substâncias nas doses de 3; 30 e 300 mg/Kg. Houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência das larvas quando tratadas com CN, demonstrando-se toxicidade aguda significante para esta substância. Investigações adicionais são necessárias para a avaliação dessas substâncias no modelo de infecção experimental *in vivo*.

Palavras-chave: Produtos naturais. Atividade anti-*Leishmania*. Citotoxicidade. Imunomodulação.

Introdução

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, constituindo um grande problema de saúde pública devido à sua alta incidência e letalidade (Alvar et al. 2012; Benitez et al. 2018). No ano de 2020, as leishmanioses foram endêmicas em 98 dos 200 países e territórios que a reportaram à OMS, e estima-se que ocorram entre 700.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea e 50.000 a 90.000 novos casos de leishmaniose visceral em todo o mundo a cada ano (WHO 2021).

A doença tem como agente etiológico mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, classificadas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, transmitidas por aproximadamente 70 espécies diferentes de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Carvalho e Ferreira 2001). A doença exibe uma variedade de manifestações clínicas, sendo as duas principais a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), e esta, por sua vez, é dividida em quatro subtipos: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD) (Goto e Lindoso 2012).

O tratamento da leishmaniose é realizado com antimoniais pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, miltefosina, estibogluconato de sódio, antimoniato de meglumina e pentamidina (Blanco e Nascimento-Júnior 2017; Kevric et al. 2015). No entanto, o uso desses fármacos requer longos períodos de administração, resultando em efeitos adversos graves, baixa tolerância e desenvolvimento de cepas resistentes ao tratamento, contribuindo para a ineficácia dos regimes terapêuticos, além de apresentarem custos elevados (Bapela et al. 2017; Souza-Silva et al. 2015).

A investigação do potencial farmacêutico dos produtos naturais é a principal estratégia para a descoberta de novos fármacos que podem ser menos onerosos e menos tóxicos que os medicamentos convencionais (Tiuman et al. 2011). As plantas são consideradas uma importante fonte de produtos naturais que podem ser explorados com sucesso para o desenvolvimento novos fármacos com atividade anti-*Leishmania* (Funari et al. 2016; González-Coloma et al. 2011; Machado et al. 2014; Mansour et al. 2013; Torres et al. 2014). Compostos como os alcaloides, fenólicos, terpenoides e flavonoides têm sido bastante estudados quanto à sua potencial atividade anti-*Leishmania* (Silva et al. 2014).

Dentre as plantas medicinais amplamente utilizadas, destaca-se o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e um dos seus principais subprodutos, o líquido da casca da castanha do caju (LCC), tem sido utilizado há décadas na medicina tradicional em países da América do Sul, África e Ásia (Ayyanar e Ignacimuthu 2009; Da Silva et al. 2018; Kudi et al. 1999).

O LCC é um produto com pouco valor a nível comercial, porém com alto potencial tecnológico em virtude de sua constituição fenólica e de suas várias características biológicas, como atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, larvicidas e inseticidas, exibindo grande potencial terapêutico (Kubo et al. 1993a; Oliveira et al. 2010; Wu et al. 2011), constituindo uma fonte natural de compostos fenólicos, como o ácido anacárdico, cardanol, cardol e 2-metilcardol (Mazzetto et al. 2009).

Os derivados do LCC também são amplamente explorados isoladamente, principalmente quanto às suas propriedades como antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antitumorais, entre outros (Amorati et al. 2001; Chen et al. 1998; Hemshekhar et al. 2012; Mazzetto et al. 2009; Muroi e Kubo 1996). O cardanol (CN) é o principal constituinte do LCC técnico e é considerado um dos mais importantes e promissores componentes. Por ser um subproduto da indústria de castanha, qualquer aprimoramento do CN, seja na concentração e/ou separação, caracteriza-se efetivamente como uma inovação tecnológica (Mazzetto et al. 2009).

Dessa forma, o LCC demonstra ampla utilidade para a farmacologia, e com isso são necessários estudos mais aprofundados dos seus metabólitos isolados, seus mecanismos de ação, bem como aspectos toxicológicos (Araújo et al. 2020). Diante do exposto, considerando-se o impacto da leishmaniose principalmente em países em desenvolvimento, a urgência por compostos mais eficazes e com menores efeitos adversos, e o amplo potencial terapêutico do LCC, é estratégico investir na busca de novas propriedades farmacológicas deste produto e seus metabólitos, como potencial fonte de medicamentos para o tratamento da leishmaniose. Assim, o presente estudo objetivou avaliar as atividades imunomoduladora e anti-*Leishmania* do LCC e do CN, a fim de propor uma busca referente a uma nova estratégia terapêutica.

Material e métodos

Local do estudo e considerações éticas

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (LAA/NPPM/UFPI), Teresina, estado do Piauí, Brasil e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob registro nº 640/2019.

Substâncias utilizadas

O Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%), foi adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de cultura Schneider's, meio DMEM, soro fetal bovino (SFB), MTT (3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio Bromo, Azul Alamar (Resazurina®) e os antibióticos Penicilina e Estreptomicina foram adquiridos da Merk Sigma-Aldrich (Brasil). O antibiótico Anfotericina B (Anf B 90%) e o panótico rápido® foram adquiridos da Cristália (São Paulo, SP). As substâncias LCC, CD, CN e AA foram provenientes do Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO/UFPI). Essas substâncias foram diluídas em DMSO 0,2%, a uma concentração de 80 mg/mL para os experimentos.

Parasitos

As cepas de *Leishmania infantum* (MHOM/5745), *Leishmania braziliensis* (10CL566) e *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friendlin), utilizadas para avaliação da atividade anti-*Leishmania*, foram provenientes do LAA/NPPM/UFPI. As formas promastigotas foram cultivadas em meio de Schneider's suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10% para *L. infantum* e *L. major*, 20% para *L. braziliensis*), 1,0 mL de urina humana filtrada (para *L. infantum*), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e incubadas em estufa demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 26 °C (Carneiro et al. 2012).

Células murinas

Os macrófagos utilizados foram coletados da cavidade peritoneal de 16 camundongos BALB/c (20-30g), oito machos e oito fêmeas, de 4 a 5 semanas de vida, provenientes do Biotério Setorial I da UFPI, mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*. 72h antes da coleta das células, foi realizada a elicitação prévia com aplicação de 2,0 mL de tioglicolato a 3% por via intraperitoneal. Decorrido este tempo, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico por via intraperitoneal de uma associação de lidocaína (10 mg/Kg de peso vivo) e tiopental (150 mg/Kg de peso vivo), realizando-se a administração de lidocaína previamente ao tiopental.

Após eutanásia, aplicou-se 8 mL de salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl 145 mM, Na_2HPO_4 9 mM, Na_2HPO_4 1 mM, pH 7,4), estéril, a 4°C, na cavidade abdominal, e após massagem suave na região abdominal, realizou-se a aspiração do PBS injetado juntamente com os macrófagos elicitados utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, centrifugado a 3000 rpm, a 4°C durante 10 min. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de RPMI na temperatura de 4°C. Para averiguação da viabilidade celular, foi realizada a contagem das células em Câmara de Neubauer, diluído em corante azul de Trypan (Sigma, EUA).

Invertebrados

As larvas de *Tenebrio molitor* utilizadas para avaliação da toxicidade aguda foram provenientes do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfofisiologia Veterinária, do Centro de Ciências Agrárias/UFPI, onde foram mantidas em caixas organizadoras de plástico com dimensões de 60 x 40 x 80 cm com água e ração *ad libitum*, em sala fechada com temperatura ambiente de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram selecionadas para o experimento as larvas com peso entre 100 e 200 mg, de cor clara e uniforme, sem sinais de melanização.

Avaliação da atividade anti-*Leishmania* do LCC, CD, CN e AA sobre formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major*

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major* em fase logarítmica de crescimento. Os parasitos foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1×10^6 *Leishmania*/100 μL de meio. Em seguida, o LCC, CD, CN e AA foram adicionados aos poços em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo-se oito faixas de concentrações finais desejadas (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 e 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A placa foi incubada em estufa demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 26°C por 48h e, restando-se 6h para o término deste período, foram adicionados 20 μL de resazurina 1×10^{-3} mol/L, incubando-se novamente a placa na B.O.D. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorvância Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de inibição do crescimento (%) (Soares et al. 2007; Valadares et al. 2011).

Para o controle positivo utilizou-se 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B (Anf B) em meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço, e para o controle negativo utilizou-se meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço, sendo neste caso a viabilidade de 100% para o parasito. A leitura do branco, para cada concentração e para os controles, fez-se necessária para desprezar a absorvância resultante do próprio meio com interferência ou não dos compostos estudados (Soares et al. 2007; Valadares et al. 2011).

Avaliação da atividade toxicológica

Avaliação da citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos

A avaliação da citotoxicidade das substâncias foi realizada em placa de 96 poços, utilizando-se o teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Foram plaqueados 2×10^5 macrófagos por poço em 100 μL de meio RPMI 1640 (suplementado com

10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante 4h para a adesão celular. Decorrido esse tempo, retirou-se o sobrenadante para remoção das células que não aderiram (Oliveira et al. 2017).

LCC, CD, CN e AA foram diluídos em meio RPMI suplementado, adicionados à placa contendo os macrófagos em concentrações seriadas atingindo oito faixas de concentrações finais (6,25 a 800 µg/mL), e incubados a 37°C e 5% de CO₂ durante 48 h. Após esse período, a citotoxicidade foi avaliada por adição de 10% de MTT [5 mg/mL], diluído em 100 µL de meio RPMI, incubando-se novamente a placa durante 4h a 37°C e 5% de CO₂. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos por adição de 100 µL de DMSO. Finalmente, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 550 nm, utilizando-se um leitor de placas Biotek (ELx800) (Oliveira et al. 2017).

Avaliação da atividade do LCC e CN sobre macrófagos infectados por *L. infantum* e Índice de Seletividade (IS)

Sendo *L. infantum* a espécie que causa a leishmaniose zoonótica e que desenvolve a forma visceral da doença, considerada a forma mais grave (Steverding 2017), avaliou-se a atividade do LCC, substância pura, e do CN, composto isolado de LCC que apresentou melhor CI₅₀ sobre promastigotas de *L. infantum*. Os macrófagos foram plaqueados em placas de cultivo celular de 24 poços numa concentração de 2×10^5 células/poço em 500 µL de RPMI suplementado, contendo lamínulas redondas estéreis de 13 mm. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 4h para a adesão celular. Em seguida, os macrófagos aderidos foram incubados com um novo meio contendo promastigotas de *L. infantum* (em fase estacionária), numa razão de 10 promastigotas para 1 macrófago, a 5% de CO₂ e 37°C, *overnight* (Carneiro et al. 2012).

Após, o meio foi aspirado para remoção dos parasitos não internalizados, e então a cultura infectada foi incubada com as concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5 µg/mL (concentrações não tóxicas baseadas nos valores de CI₅₀ e CC₅₀) de LCC e CN e Anf B nas concentrações de 0,5; 1 e 2 µg/mL. Em seguida, as lamínulas foram removidas e coradas utilizando-se o panótico rápido®. Para cada tratamento, contou-se o número de macrófagos infectados e a carga parasitária, percorrendo-se os campos das lamínulas até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando-se microscopia de luz (Carneiro et al. 2012).

O índice de seletividade de cada tratamento foi calculado dividindo-se a concentração citotóxica média (CC₅₀) observada para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pela

concentração inibitória média (CI₅₀), calculada para as formas amastigotas internalizadas em macrófagos (Oliveira et al. 2017).

Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos

Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço numa placa de 96 poços com LCC, CD, CN e AA em diluições seriadas, atingindo-se cinco faixas de concentrações finais (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL). A placa foi incubada durante 48h em estufa a 37°C e a 5% de CO₂ e, decorrido esse tempo, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incubou-se por 30 min. Após esse período, descartou-se o sobrenadante, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37°C e adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais. Após 30 min em agitador de Kline, a placa foi lida no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm (Bonatto et al. 2004).

Determinação da capacidade fagocítica

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço numa placa de 96 poços com LCC, CD, CN e AA em diluições seriadas, atingindo-se cinco faixas de concentrações finais (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL). Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de zymosan corado e incubou-se por 30 min a 37 °C. Após este tempo, foram adicionados 100 µL de fixador de Baker para interromper o processo de fagocitose e, 30 min depois, a placa foi lavada com salina 0,9 % a fim de remover o zymosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, e adicionou-se 100 µL de solução de extração e após solubilização em agitador de *Kline* a placa foi lida no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm (Grando et al. 2009).

Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço numa placa de 96 poços com as substâncias em diluições seriadas, atingindo-se três faixas de concentrações finais (3,125; 6,25 e 12,5 µg/mL), na ausência (LCC, AA, CN e CD) ou na presença (LCC e CN) de formas promastigotas de *L. infantum* na concentração de 1×10^6 por poço. Transcorrido 24 h de incubação a 37 °C e 5% de CO₂ transferiram-se os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito (Soares et al. 2007).

A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em concentrações variadas de 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100 e 150 μM , diluídas em meio RPMI. No momento da dosagem, misturou-se partes iguais das amostras (sobrenadantes) ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H_3PO_4 10% (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e fez-se a leitura das absorbâncias em leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm, sendo o resultado foi plotado em valor real de produção nitrito quantificado em μM (Soares et al. 2007).

Avaliação da toxicidade aguda sobre larvas de *Tenebrio molitor*

Para avaliação da toxicidade aguda foram utilizadas 10 larvas de *T. molitor* para cada concentração testada, em triplicata. As substâncias testadas foram o LCC, subproduto do cajueiro, e o CN, principal e mais importante constituinte do LCC (Mazzetto et al. 2009). Ambos foram aplicados nas larvas no volume de 10 μL nas concentrações de 3; 30 e 300 mg/Kg com o auxílio de uma seringa Hamilton (701 N, manômetro 26, Capacidade de 100 μL) na hemocele, no segundo ou terceiro esternito visível acima das pernas, na porção ventral. As larvas foram incubadas à temperatura ambiente em placas de petri contendo dieta de criação e o número de larvas mortas foi avaliado após 48h. Para estabelecer a morte das larvas, realizou-se a verificação visual de cada indivíduo, quanto à presença de mielinização e/ou resposta a estímulos físicos após toque suave (de Souza et al. 2015).

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração inibitória média (CI_{50}) e a concentração citotóxica média (CC_{50}) com limite de confiança de 95% foram calculadas utilizando-se regressão de probitos do programa SPSS 13.0. O índice de seletividade foi calculado dividindo-se a CC_{50} pela CI_{50} de amastigotas internalizadas. A curva de sobrevida das larvas de *T. molitor* foi plotada pela análise de Kaplan-Meier e os resultados foram analisados pelo teste de Log Rank para avaliar o nível de relação entre as substâncias quanto ao parâmetro toxicidade aguda. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

Resultados

Ensaio de atividade anti-*Leishmania*

O LCC, AA, CN e CD demonstraram potencial anti-*Leishmania*, sendo sua ação dependente da concentração. Foi possível observar atividade contra todas as espécies de *Leishmania* testadas, onde na concentração de 800 µg/mL houve 100% de inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major* na presença de LCC; de *L. infantum* e *L. braziliensis* na presença de CN e CD; e de *L. infantum* na presença de AA. A mesma inibição foi observada a partir da concentração de 400 µg/mL de AA sobre promastigotas de *L. braziliensis*. CN, CD e AA apresentaram cerca de 90%, 85% e 40% de inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. major* na concentração de 800 µg/mL, respectivamente. A Anf B apresentou inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* em cerca de 90% e de *L. infantum* e *L. major* em cerca de 80%, ambas na concentração de 2 µg/mL.

Os valores de CI₅₀ do LCC, AA, CN e CD contra *L. infantum* foram: 148,12; 106,45; 56,74 e 154,32 µg/mL, contra *L. braziliensis* foram: 85,71; 50,83; 64,28 e 137,05 µg/mL, e contra *L. major* foram: 153,56; >800; 122,31 e 112,50 µg/mL, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 Atividade anti-*Leishmania* de LCC e seus principais constituintes: AA, CN e CD.

Compostos	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
	CI ₅₀ µg/mL ^a	CI ₅₀ µg/mL ^a	CI ₅₀ µg/mL ^a
LCC	148,12±0,08	85,71±0,11	153,56±0,08
AA	106,45±0,05	50,83±0,12	>800
CN	56,74±0,06	64,28±0,06	122,31±0,05
CD	154,32±0,04	137,05±0,17	112,50±0,06
Anf B	2,46±0,07	2,94±0,05	0,59±0,13

^a Concentração de inibição 50

Determinação da citotoxicidade

Citotoxicidade em macrófagos

Na ação sobre os macrófagos, o LCC demonstrou citotoxicidade significativa a partir da concentração de 12,5 µg/mL, apresentando valor de CC₅₀ de 37,51 µg/mL, enquanto AA, CN e CD reduziram significativamente a viabilidade dos macrófagos a partir da concentração de 6,25 µg/mL, resultando nos valores de CC₅₀ de 12,59; 31,44 e 40,53 µg/mL, respectivamente.

A Anf B apresentou alta toxicidade sobre os macrófagos murinos, apresentando CC_{50} de 8,75 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 1; Tabela 2).

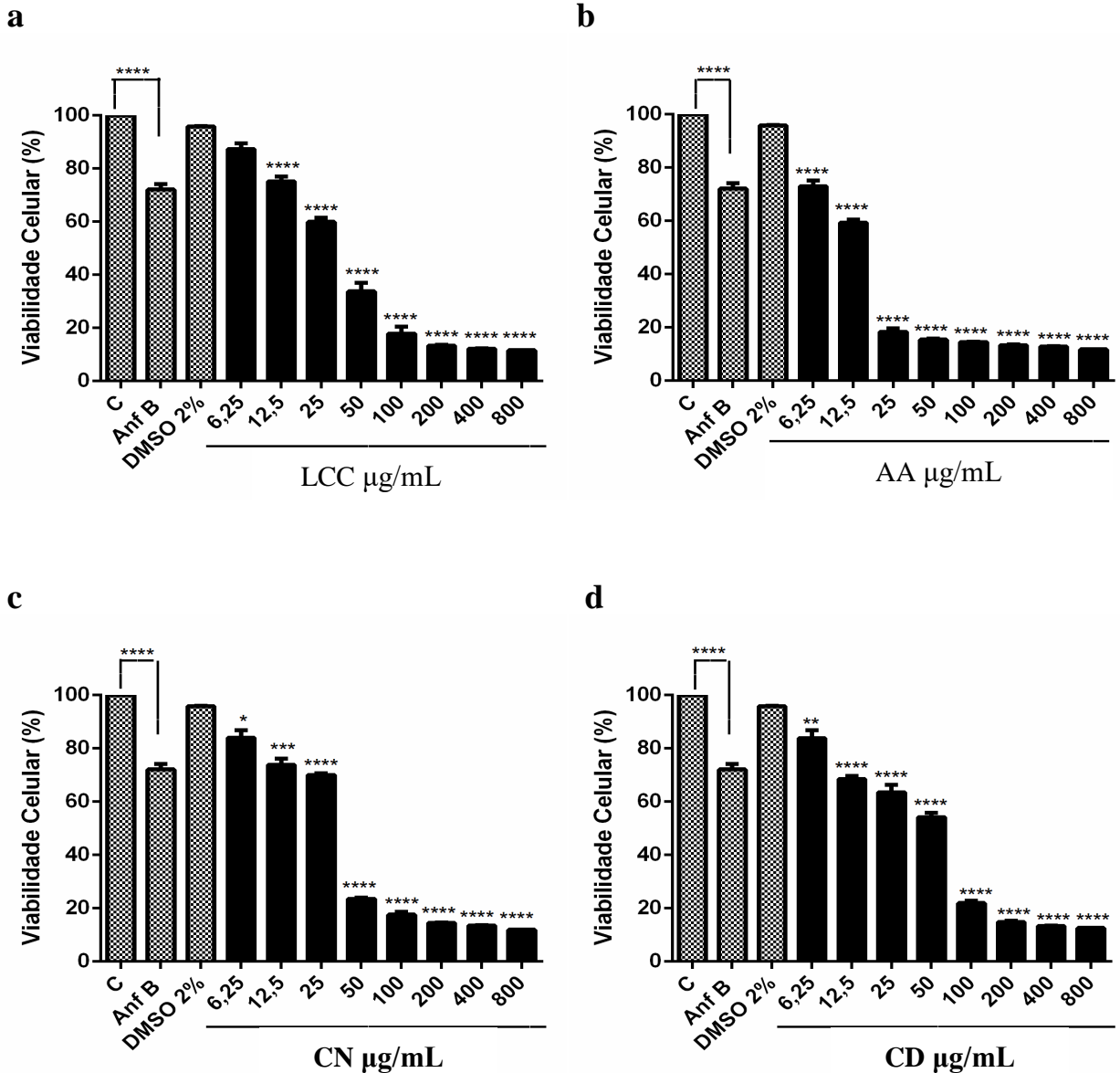


Fig. 1 Efeitos citotóxicos de LCC (a), AA (b), CN (c) e CD (d) contra macrófagos peritoneais murinos. Macrófagos foram incubados por 48 h na presença de diferentes concentrações. A viabilidade dos macrófagos foi mensurada pelo sal tetrasólio (MTT). Resultados representam média \pm E.P.M de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ quando comparado com o controle (C) ou Anf B

Efeitos sobre macrófagos infectados e determinação do Índice de Sobrevivência e Índice de Seletividade (IS)

Na avaliação da atividade do LCC e CN frente à forma amastigota intracelular, apresentaram CI_{50} de 4,63 e 1,42 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A Anf B apresentou CI_{50} de 0,68

$\mu\text{g/ml}$ sobre amastigotas internalizadas em macrófagos (Tabela 2). LCC e CN foram capazes de reduzir o percentual de macrófagos parasitados por *L. infantum* (Fig. 2).

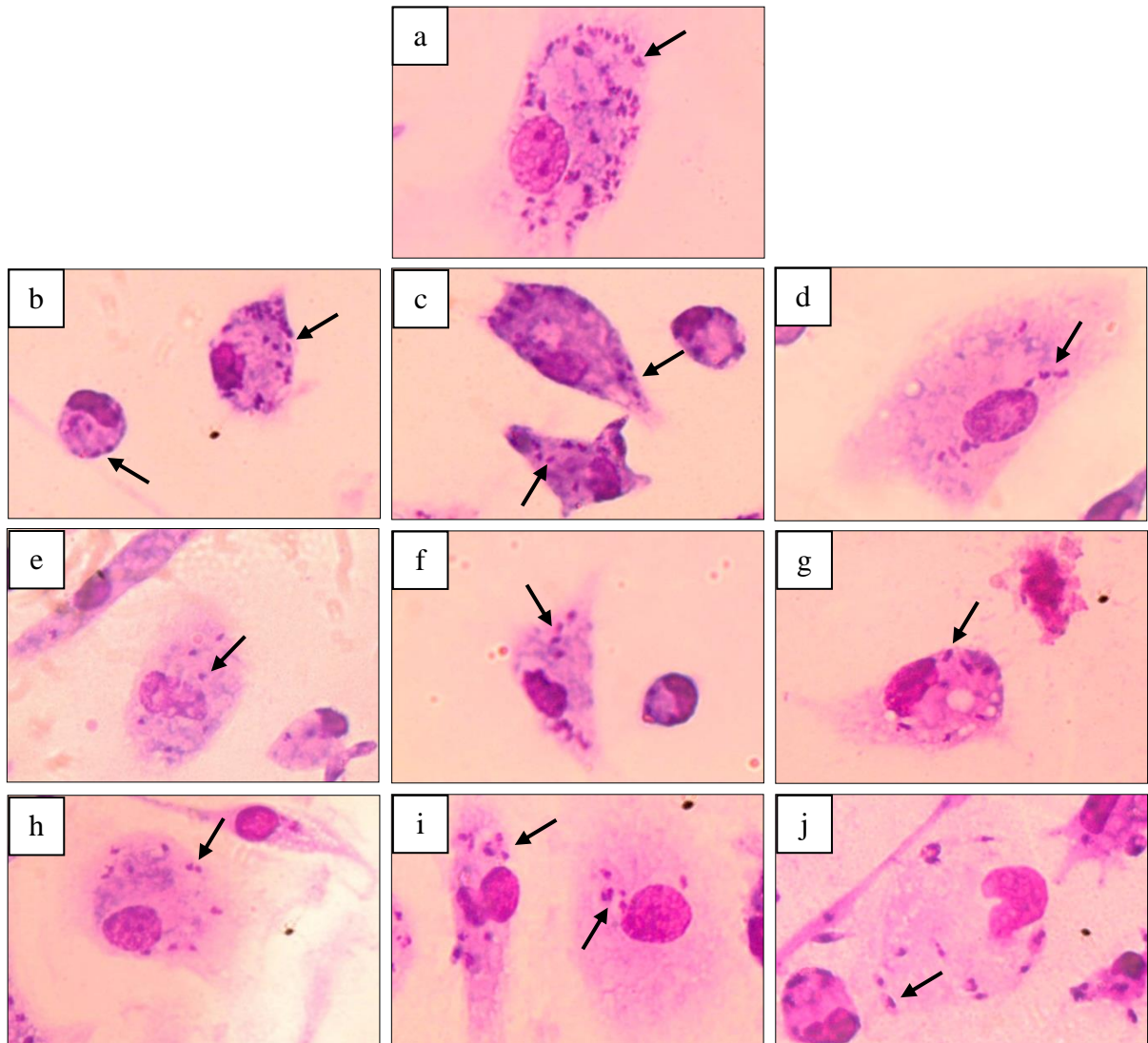


Fig. 2 Macrófagos experimentalmente infectados por *L. infantum*. Controle (a). Anf B foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,5 (b); 1,0 (c) e 2,0 (d) $\mu\text{g/mL}$. Para o tratamento com LCC foram utilizadas as concentrações de 3,125 (e); 6,25 (f) e 12,5 (g) $\mu\text{g/mL}$. O CN foi utilizado nas concentrações de 3,125 (h); 6,25 (i) e 12,5 (j) $\mu\text{g/mL}$. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Aumento 1000x

O controle negativo obteve aproximadamente 87% de células parasitadas, enquanto as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de Anf B reduziram esse número cerca de 73, 70 e 50%, respectivamente. A redução das células parasitadas tratadas com LCC e CN foi dependente da concentração utilizada. As células tratadas com LCC apresentaram parasitismo em torno de 79, 77 e 64%, e com CN o parasitismo foi aproximadamente 78, 79 e 71%, após serem tratadas nas concentrações correspondentes a 3,125; 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Fig. 3a).

Analisando-se a índice de sobrevivência, o controle obteve em média 9,0 amastigotas/macrófago. A Anf B nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$ reduziu essa quantidade de parasitos para aproximadamente 4,8; 3,9 e 2,1 amastigotas/macrófago, respectivamente. No tratamento com LCC, a quantidade de amastigotas reduziu, de forma dependente da concentração, para 5,2 amastigotas/macrófagos na concentração de 3,125 $\mu\text{g/mL}$; já na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, essa quantidade diminuiu para aproximadamente 3,9 amastigotas/macrófagos; quando tratados com 12,5 $\mu\text{g/mL}$, reduziu-se a índice de sobrevivência para 2,3 amastigotas/macrófagos. Para o tratamento com CN, a quantidade de amastigotas/macrófago correspondente às concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ foi 3,4; 3,1 e 2,3 amastigotas/macrófago, respectivamente (Fig. 3b).

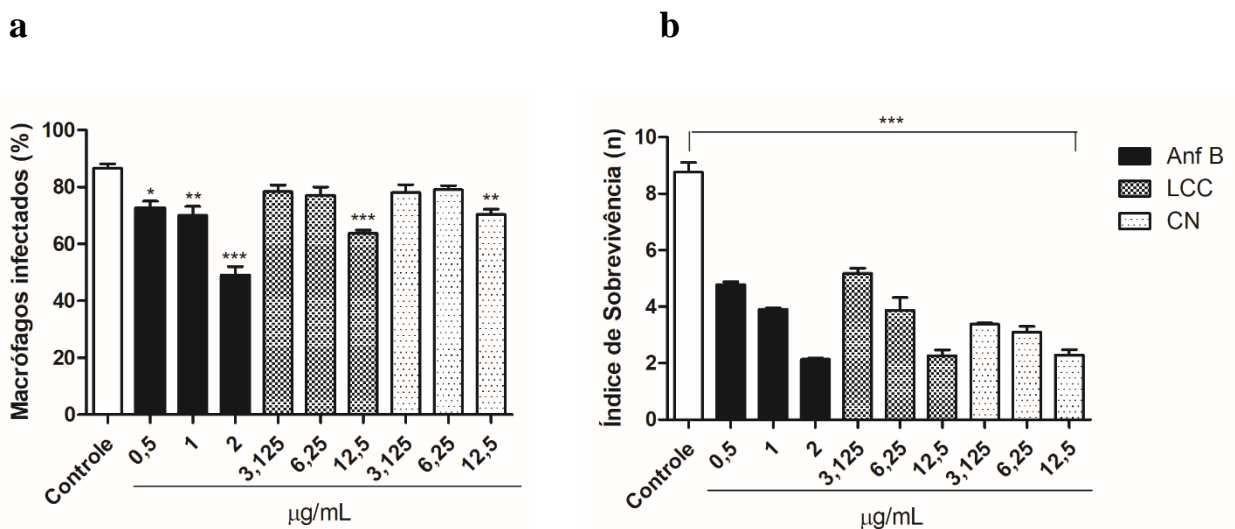


Fig. 3 Efeitos de LCC, CN e Anf B (como controle positivo), para avaliar o percentual de macrófagos infectados (a) e o índice de sobrevivência (b) no tratamento de macrófagos murinos infectados por *L. infantum*, considerando o controle 87% de infecção. As células foram tratadas durante 48 h de incubação com concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de LCC e CN. A Anf B foi utilizada nas concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}$ CI_{50} , 1 x CI_{50} e 2x CI_{50} sobre as formas amastigotas do parasita. Os resultados representam média \pm E.P.M em três experimentos realizados em triplicata * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

A citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos e a atividade frente à forma amastigota intracelular de *Leishmania infantum* foram utilizadas para se determinar o índice de seletividade (IS), cujo valor representa o quanto a substância é mais tóxica para o parasita do que para os macrófagos. O LCC, CN e Anf B demonstraram mais seletividade para as formas e promastigotas de *L. infantum*, do que para os macrófagos murinos. Os resultados obtidos indicam que o LCC é aproximadamente 8,1 vezes mais seletivo para o protozoário do que para as células de mamíferos, enquanto o CN apresentou seletividade 22,14 vezes maior para *L.*

infantum do que para macrófagos, sendo este valor superior ao apresentado pela Anf B, que se mostrou 12,86 vezes mais seletivo para o parasita (Tabela 2).

Tabela 2 Efeito citotóxico sobre células de mamíferos e valores de índice de seletividade calculados para LCC, AA, CN, CD e anfotericina B (Anf B).

Compostos	Macrófagos	Amastigotas internalizadas (<i>L. infantum</i>)	IS ^c <i>L. infantum</i>
	CC ₅₀ µg/mL ^a	CI ₅₀ µg/mL ^b	
LCC	37,51±0,04	4,63	8,10
AA	12,59±0,04	-	-
CN	31,44±0,04	1,42	22,14
CD	40,53±0,04	-	-
Anf B	8,75±0,02 ^d	0,68	12,86

^a Concentração de inibição 50

^b Concentração citotóxica 50

^c Índice de seletividade para amastigotas internalizadas em macrófagos (CC₅₀/CI₅₀)

^d Alves et al. (2017)

Atividade Lisossomal e determinação da Capacidade fagocítica

Os resultados referentes aos parâmetros de ativação de macrófagos, tais como aumento do volume lisossomal e fagocitose foram avaliados com base na retenção de vermelho neutro e de partículas de Zymozan pelos macrófagos. O CN e CD foram capazes de aumentar significativamente o volume lisossomal dos macrófagos na concentração de 3,125 µg/mL, além das concentrações de 6,25 e 12,5 µg/mL do CN, enquanto no LCC e AA não houve retenção de vermelho neutro nas vesículas secretórias dos macrófagos (Fig. 4a). Na avaliação da capacidade de fagocitose de Zymozan, todas as substâncias testadas induziram significativamente o aumento da capacidade fagocítica, sendo essa indução nas concentrações de 3,125; 6,25 e 12,5 µg/mL para o CD, 6,25 e 12,5 µg/mL para o LCC, 6,25 µg/mL para o AA e 12,5 µg/mL para o CN (Fig. 4b).

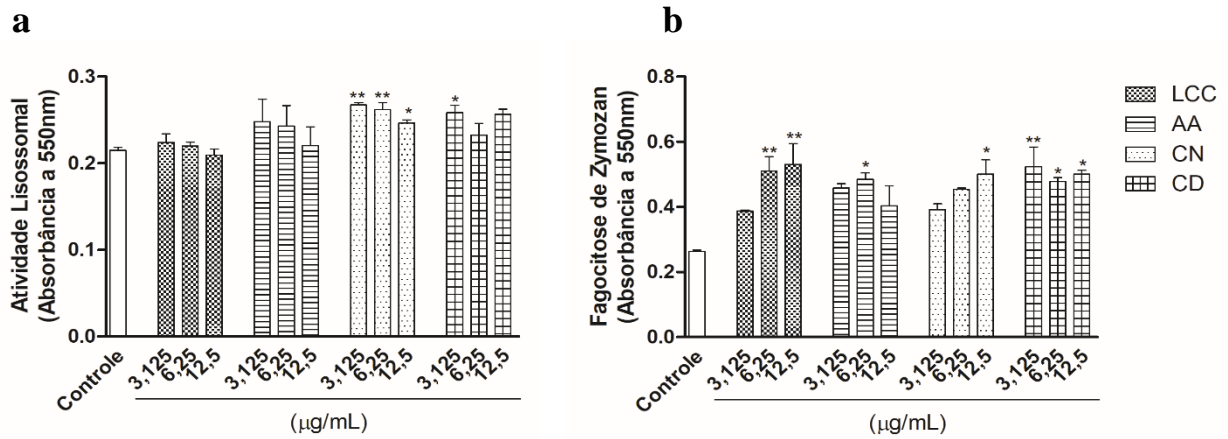


Fig. 4 A influência de LCC, AA, CN e CD sobre a atividade lisossomal (a) e atividade fagocítica (b). Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com concentrações variadas por 48 h. Volume lisossomal e capacidade fagocítica foram analisados por espectrofotometria pela quantificação aumentada pelo corante vermelho neutro, seguida de solubilização pela solução de extração. A fagocitose foi analisada pela incorporação de partículas de Zymozan ao vermelho neutro, solubilizado pela solução de extração. Resultados representam média \pm E.P.M. de três experimentos realizado em triplicata, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. Controle

Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO), um índice de ativação de macrófagos, foi quantificada pela mensuração das concentrações de nitrito através da incubação de macrófagos com LCC, AA, CN e CD na ausência e com LCC e CN na presença de formas promastigotas de *L. infantum*. Como resultado, nenhuma das quatro substâncias demonstrou aumento significativo da síntese de nitrito na ausência de *Leishmania* (Fig. 5a), assim como o LCC e CN na presença do parasita em todas as concentrações testadas (Fig. 5b).

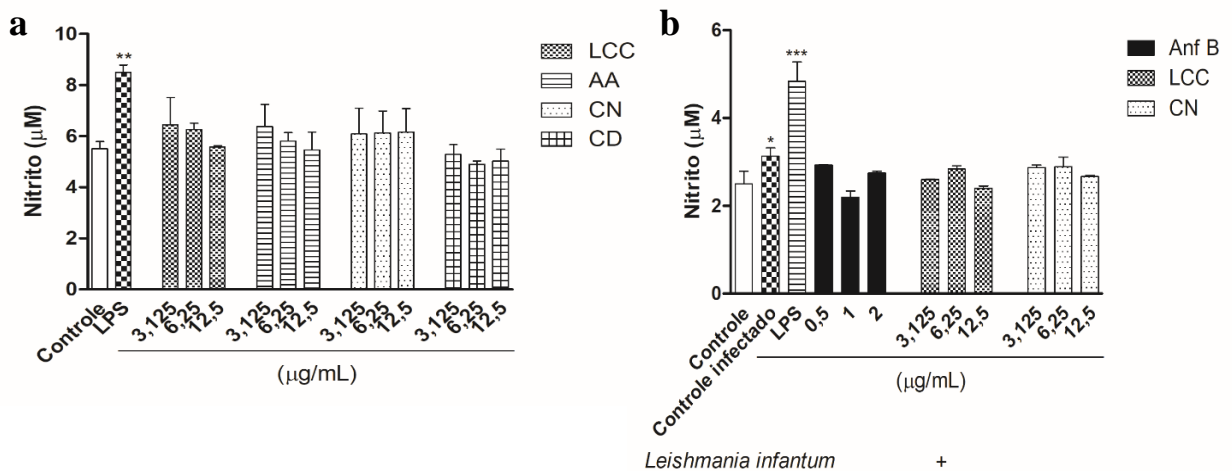


Fig. 5 Produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos tratados com LCC, AA, CN e CD na ausência (-) (a), e tratados com LCC e CN na presença (+) (b) de formas promastigotas de *L. infantum*, por 24 h. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi

misturado em partes iguais com o reagente de Griess. LPS – lipopolissacarídeo bacteriano (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os resultados apresentam a média \pm E.P.M. em três experimentos realizados em triplicata. $P < 0,05$ LCC, AA, CN e CD vs células sem o estímulo e LCC e CN vs células com o estímulo por *Leishmania*. A Anf B foi utilizada nas concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}$ CI_{50} , 1 x CI_{50} e 2x CI_{50} . * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ quando comparado com o controle positivo (LPS)

Avaliação da toxicidade aguda sobre larvas de *Tenebrio molitor*

Os perfis de sobrevivência das larvas de *T. molitor* quando submetidas ao contato com LCC e CN podem ser visualizados nas Figs. 6 e 7, demonstrando ação dependente da concentração. Os resultados demonstraram, após 48 h, que as taxas de sobrevivência das larvas frente ao LCC, foram aproximadamente 85%, 75% e 60% nas doses de 3, 30 e 300 mg/Kg, respectivamente, enquanto que as taxas de sobrevivência frente ao CN foram aproximadamente 85%, 60% e 40% nas doses de 3, 30 e 300 mg/Kg, respectivamente. Após o ensaio de toxicidade, constatou-se que existe uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as curvas de sobrevivência do CN, demonstrando-se toxicidade aguda significativa desta substância.

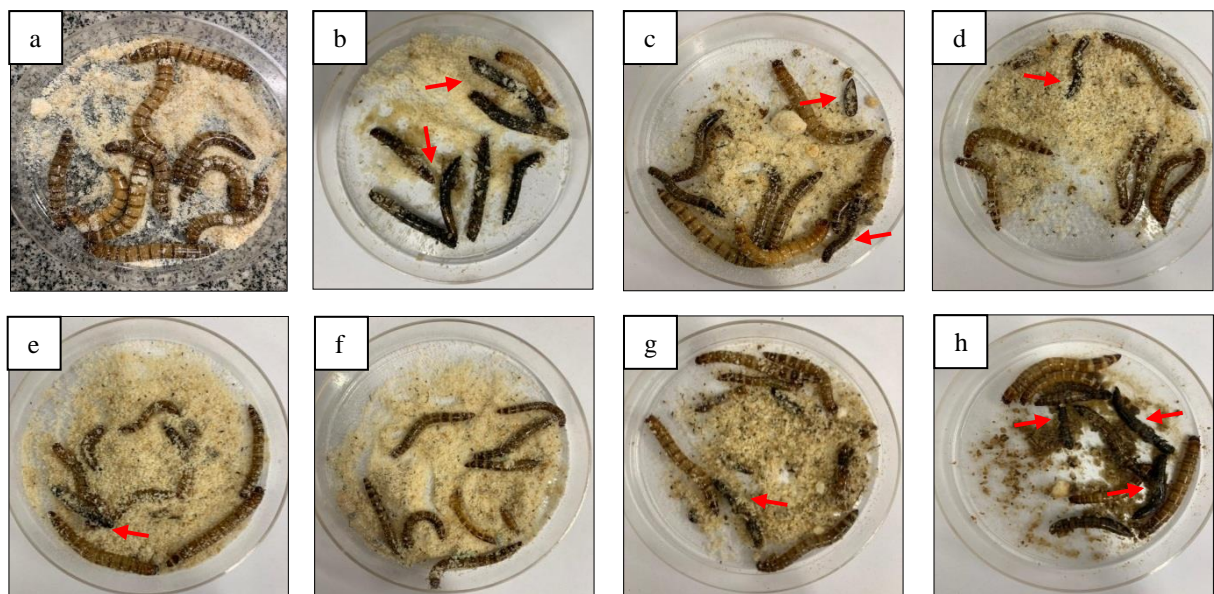


Fig. 6 Viabilidade das larvas de *T. molitor*. Controle (a). DMSO a 100% (b). Para o tratamento com LCC foram utilizadas as doses de 3,0 (c); 30,0 (d) e 300 (e) mg/Kg. O CN foi utilizado nas doses de 3 (f); 30 (g) e 300 (h) mg/Kg. As setas vermelhas apontam larvas mortas apresentando encolhimento do corpo e melanização característica de mortalidade larval

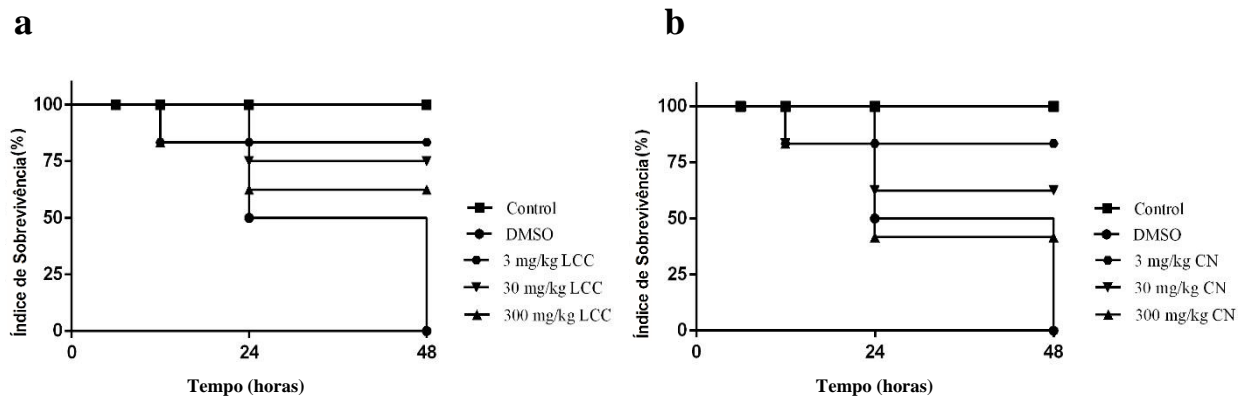


Fig. 7 Percentual de sobrevivência da larva *T. molitor* exposta ao LCC (a) e CN (b). As larvas foram incubadas por 48 h na presença de diferentes concentrações. A viabilidade das larvas foi mensurada realizando-se a verificação visual de cada indivíduo, quanto à presença de mielinização e/ou resposta a estímulos físicos após toque suave. O DMSO a 0,2% foi utilizado como controle e o DMSO a 100% foi utilizado para causar 100% de mortalidade larval. Resultados representam média \pm E.P.M dos tratamentos realizados em triplicata.

Discussão

Estudos comprovam que espécies vegetais são fontes potenciais para o desenvolvimento de novos e seletivos fármacos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, principalmente causadas por protozoários (Borges et al. 2010; Buzzini et al. 2008; Kolodziej e Kiderlen 2005; Singh et al. 2014), e podem ser explorados com sucesso para o desenvolvimento de drogas com atividade anti-*Leishmania* (Funari et al. 2016; González-Coloma et al. 2011; Machado et al. 2014; Mansour et al. 2013; Torres et al. 2014).

Diversos metabólitos secundários de plantas como alcaloides, saponinas, quinonas, terpenos, compostos fenólicos e seus derivados possuem, dentre outras, propriedades antiparasitárias, e dessa forma as plantas e seus produtos naturais são considerados como fontes potenciais para o isolamento de compostos com atividades leishmanicidas ou imunoestimulantes (Chan-Bacab e Peña-Rodríguez 2001).

Nessa perspectiva, vários estudos e artigos de revisão têm tratado sobre a avaliação do potencial anti-*Leishmania* de compostos derivados de produtos naturais para descoberta de novos agentes terapêuticos (Alves et al. 2017; Alves et al. 2018; Carneiro et al. 2012; Carvalho, et al. 2021; Chowdhury et al. 2017; Dos Santos et al. 2011; Ferreira et al. 2004; Ferreira et al. 2017; Gutiérrez-Rebolledo et al. 2017; Mishra et al. 2009; Odonne et al. 2017; Passero et al. 2014; Salama et al. 2017; Singh et al. 2014; Tiwari et al. 2018).

O LCC, subproduto do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), é utilizado na medicina tradicional (Ayyanar e Ignacimuthu 2009; Da Silva et al. 2018; Kudi et al. 1999), e em virtude de sua composição fenólica demonstra inúmeras aplicações biológicas, como atividades

antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorais, fungicidas, antiacetilcolinesterase, moluscidas, larvicidas e inseticidas, exibindo grande potencial terapêutico (Balgude e Sabnis 2014; Kubo et al. 1993a; Oliveira et al. 2010; Wu et al. 2011). Ainda em estudo de Lemes et al. (2016) objetivou a síntese de derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer.

O LCC é uma fonte natural de compostos fenólicos, que apresentam a uma longa cadeia alifática de quinze carbonos, na posição meta em relação à hidroxila, que pode ser saturada ($C_{15}H_{31}$) e/ou insaturada com uma ($C_{15}H_{29}$), duas ($C_{15}H_{27}$) e três ($C_{15}H_{25}$) insaturações. O LCC é classificado em natural (extraído por solvente) e técnico (submetido a altas temperaturas), sendo o LCC natural constituído de ácido anacárdico (60-65%), cardol (15-20%), cardanol (10%), e traços de metilcardol, e o LCC técnico composto principalmente por cardanol (60-65%), cardol (15-20%), material polimérico (10%), e traços de metilcardol (Mele e Vasapollo 2008).

O CN é o principal constituinte do LCC técnico, e seus derivados demonstraram atividades antibacteriana, antioxidante, antifúngica e antitumoral, além de hidrofobicidade (Amorati et al. 2001; Chen et al. 1998; Mazzetto et al. 2009).

Embora o AA seja corrosivo e tóxico, são conhecidos seus efeitos medicinais, como atividade antimicrobiana (Himejima e Kubo 1991; Muroi e Kubo 1996), antitumoral (Hemshkhar et al. 2012; Itokawa et al. 1987; Kubo et al. 1993b; Seong et al. 2014; Wu et al. 2011), moluscida (Kubo et al. 1986), na inibição da acetilcolinesterase (Stasiuk et al. 2008), da histona lipoxigenase (Grazzini et al. 1991; Ha e Kubo 2005) e da prostaglandina sintase (Kubo et al. 1987), além de possuir atividade inibitória contra gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Pereira et al. 2008).

O CD possui estrutura semelhante à do AA, por apresentar uma segunda hidroxila no anel aromático (Lomonaco et al. 2009), e apesar de inicialmente ter sido caracterizado como tóxico (Wasserman e Dawson 1948) estudos posteriores publicados por Suresh e Kaleysa Raj (1990) comprovaram tolerância de até 5 g/kg em ratos. Foi observada atividade antifilaríase (Suresh e Kaleysa Raj 1990), contra *Biomphalaria glabrata* (caramujo vetor esquistossomose) (Kubo et al. 1986) e na inibição da acetilcolinesterase (Stasiuk et al. 2008).

Apesar de existirem outros estudos de avaliação anti-*Leishmania* usando-se compostos fenólicos e extratos de plantas descritos na literatura (Silveira et al. 2020), o presente estudo é pioneiro na avaliação do LCC e seus principais constituintes contra três espécies diferentes de *Leishmania*, da sua atividade toxicológica sobre células de mamíferos e *T. molitor*, além da avaliação do potencial imunomodulador dessas substâncias.

O LCC, AA, CD e CN demonstraram atividade significativa frente as formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major* após 48 horas de incubação. Embora os dados farmacológicos relativos à atividade anti-*Leishmania* do LCC e seus principais constituintes sejam escassos, outras partes do *A. occidentale* têm demonstrado atividade anti-*Leishmania*, corroborando nosso estudo. Resultados de França et al. (1993), apresentaram atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico da casca do caule (nas concentrações de 7,5 e 15 mg/mL) de *A. occidentale* sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*. Em estudo utilizando-se extrato etanólico das folhas de *A. occidentale*, foi demonstrada atividade sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, apresentando inibição de crescimento 5,4% e 32,3%, respectivamente, ambas na concentração de 100 µg /mL (Luize et al. 2005). Cascas do caule, folhas, raízes, entre outras partes de *A. occidentale* já foram relatados no uso popular sobre leishmaniose cutânea em áreas endêmicas do Brasil (Netto et al. 1985; França et al. 1993; França et al 1996; Moreira et al. 2002).

Este estudo apresentou melhores resultados que os de Braga et al. (2007) utilizando-se o extrato da casca de caule de *A. occidentale*, onde nenhuma atividade contra formas promastigotas de *L. amazonenses* e *L. infantum* foi encontrada, resultando valores de $CI_{50} > 200$ µg/mL para ambas.

Em estudo com compostos isolados de folhas de *Schinus terebinthifolius*, planta medicinal nativa da América do Sul pertencente à família Anacardiaceae, rica em compostos fenólicos (Santana et al. 2012), mostrou eficácia frente à promastigotas de *L. infantum*, com um valor de CI_{50} de 57,82 µg/mL (Moraes et al. 2014), resultado semelhante ao valor de inibição de crescimento do CN sobre promastigotas da mesma espécie de *Leishmania* demonstrado no presente estudo.

Moura-Costa et al. (2012), avaliaram a atividade do extrato aquoso e extrato hidroalcoólico a 50% de *S. terebinthifolius* contra promastigotas de *L. amazonensis*, encontrando valores inferiores aos resultados deste estudo, já que obtiveram CI_{50} de 201 µg/ml e 688 µg/ml, respectivamente.

O presente estudo apresentou melhores resultados quando comparados aos de Dibyendu e Chakraborti (2014), em que os antimoniais pentavalentes, a pentamidina e a paramomicina, usadas para o tratamento de LC e LV, mostraram falta de resposta contra formas promastigotas de *Leishmania*.

A realização de testes *in vitro*, através de ensaios de viabilidade celular, consiste na primeira etapa para a avaliação da compatibilidade biológica de determinada substância, fornecendo dados importantes sobre a análise da biocompatibilidade entre materiais diversos

(Rogerio et al. 2003). Para que produtos naturais sejam utilizados como terapias alternativas no tratamento das leishmanioses, são necessários testes de citotoxicidade em células de mamíferos (Brenzan et al. 2007), sendo essencial em macrófagos, pois fazem parte do ciclo de vida da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, visto que a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas e multiplicação subsequente ocorre no interior dessas células (koutsoni et al. 2014; Liu e Uzonna, 2012).

Uma vez que LCC, AA, CN e CD apresentaram valores significativos de CI_{50} sobre formas promastigotas das três espécies de *Leishmania*, fez-se necessária a investigação da citotoxicidade desses compostos sobre macrófagos. Ambas demonstraram toxicidade significativa sobre essas células, sendo que LCC, CN e CD apresentaram resultados semelhantes entre eles, porém menos tóxicos quando comparados à Anf B, utilizada como controle positivo, enquanto que AA apresentou uma maior toxicidade, com valor de CC_{50} próximo ao da Anf B. Apesar de apresentarem citotoxicidade significativa, quando se determinou o índice de seletividade baseado na razão de CC_{50} sobre CI_{50} em amastigotas intracelulares, observou-se que o LCC e CN foram mais seletivos para o parasita, sendo o valor de IS do CN acima de 20, corroborando os dados da literatura, onde esse índice deve apresentar valor próximo ou superior a 20 para amastigotas internalizadas em macrófagos (Osorio et al. 2007).

Em estudo de Mesquita et al. (2014), a miltefosina, utilizada como fármaco padrão, apresentou uma CC_{50} de 49,72 $\mu\text{g/mL}$, resultado próximo aos valores das substâncias testadas neste estudo, e apresentou um $SI=7$ sobre *L. infantum*, valor semelhante ao do LCC, porém muito inferior ao índice de seletividade do CN. Esta substância também foi mais seletiva para o parasita do que a Anf B utilizada como controle positivo neste estudo.

O modelo experimental de amastigotas internalizadas em macrófagos é o que mais representa a maneira como ocorre a infecção no hospedeiro (Carneiro et al. 2012). Dessa forma, as substâncias que são capazes de reduzir o percentual de macrófagos parasitados e o índice de sobrevivência de amastigotas nos macrófagos são consideravelmente promissoras a serem testadas *in vivo* (Alves et al. 2017).

Quando testado contra os amastigotas intracelulares, houve uma redução significativa tanto nos valores de CI_{50} de LCC e CN, quanto no percentual de macrófagos murinos experimentalmente infectados por *L. infantum* e no índice de sobrevivência das formas amastigotas no interior dos macrófagos, nas três concentrações testadas dos compostos. Essa ação foi dependente da concentração, observando-se melhores resultados na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para LCC e CN em comparação à Anf B. Resultados inferiores foram encontrados

por Moraes et al. (2014), que testaram três derivados naturais de folhas de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), e encontraram valores de IC₅₀ de 66.59 µg/ML, 64.90 µg/mL e 28.95 µg/mL, respectivamente, contra amastigotas internalizadas *L. infantum*.

Avaliando-se as imagens realizadas por microscopia, observa-se que no grupo controle há uma grande concentração de amastigotas em volta do vacúolo parasitóforo, enquanto nos grupos tratados com LCC e CN observou-se uma diminuição no aglomerado dos parasitos, demonstrando-se a redução da carga parasitária dentro dos macrófagos murinos, o que reforça o potencial anti-*Leishmania* dessas substâncias. Pode-se atribuir esse efeito a uma possível ativação de macrófagos, que também pode ter promovido uma potencialização de oxigênio e um aumento da regulação de citocinas pelos mesmos (Reimão et al. 2010).

A atividade dos compostos contra formas promastigotas e amastigotas pode divergir, a depender dos sítios da ação anti-*Leishmania*, o que contribui para que sejam seletivos para uma das duas formas de desenvolvimento. A susceptibilidade de ambas as formas evolutivas ao composto pode ser explicada pelas diferentes características bioquímicas entre elas, bem como pelo perfil químico da substância, como a sua solubilidade em lipídios (Athayde-Filho et al. 2000). A melhor atividade anti-*Leishmania* do CN quando comparado ao LCC provavelmente pode ser decorrente da grande quantidade de compostos presentes no mesmo, que podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos.

O CN pertence à classe dos lipídeos fenólicos não-isoprenoides e possui uma estrutura molecular composta por uma região hidrofílica e outra hidrofóbica, resultando num caráter anfifílico, o que possibilita a funcionalização de sua molécula (Lochab et al. 2014; Voirin et al. 2014). O CN apresenta particularidades em suas características químicas e físico-químicas, quando em comparação com derivados fenólicos similares, principalmente quanto à porção fenólica e à posição da dupla ligação, o que permite inúmeras funcionalidades, como o acoplamento de grupos polares e com propriedades biológicas (Mazzetto et al. 2009).

No que diz respeito à resposta imune celular frente às infecções por *Leishmania*, é desejável a do tipo Th1, que confere cura ou proteção, como aumento de capacidade fagocítica, do volume lisossomal, da síntese de óxido nítrico, dentre outros, através de mecanismos de ativação de macrófagos. Na investigação de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, busca-se fármacos que possuam, além da atividade sobre o parasita, a capacidade imunomodulatória, de forma a prevalecer a resposta imune do hospedeiro do tipo Th1 (Islamuddin et al. 2015; Roy et al. 2014). Assim sendo, foram avaliados os parâmetros de ativação de macrófagos com capacidade microbicida.

Os resultados dos ensaios de atividade lisossomal e capacidade fagocítica demonstraram que o tratamento dos macrófagos com o LCC e seus principais constituintes obtiveram resultados significativos de imunomodulação. O CN e CD retiveram partículas de vermelho neutro, caracterizado pelo aumento significativo da atividade lisossomal, podendo-se sugerir um aumento de defesa dessas células. O Zymosan induz estímulo das células de defesa a produzirem resposta, causando um aumento na produção de IFN e da capacidade fagocítica (Wei et al. 2011), e esse aumento foi demonstrado por todas as substâncias testadas. Esses resultados corroboram o estudo realizado por Alves et al. (2017), em que os ácidos gálico e elágico, compostos fenólicos de ocorrência natural encontradas em algumas plantas, dentre elas o *A. occidentale*, apresentaram resultados de imunomodulação na determinação de capacidade fagocítica e atividade lisossomal em concentrações de 6,25 µg/mL e 3,125 µg/mL, semelhantes às do presente estudo.

A imunidade inata exerce um importante papel no controle de infecções, por meio de mecanismos de ação como fagocitose e atividade lisossomal, os quais propiciam ativação de antígenos e eliminação de patógenos (Harrison et al. 2003). O fagossoma formado logo após a endocitose de patógenos se funde, seguido de fusão com lisossomas para produzir um fagolisossomo (Niedergang e Chavrier 2004). O fagolisossomo é uma estrutura preenchida com hidrolases ácidas e espécies reativas de oxigênio nas quais ocorre a maior parte da degradação do conteúdo envolvido, e por fim, os patógenos fagocitados são mortos dentro do fagolisossomo (Lee et al. 2003; Lopes et al. 2006). Assim, os parâmetros de ativação de macrófagos acarretam em alterações conformacionais para aumentar o desempenho de suas funções, como a locomoção e a fagocitose (Petropolis et al. 2014).

Um mecanismo de resistência primária à infecção por *Leishmania* é a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados (Lima-Júnior et al. 2013). No interior do fagolisossomo, o NO reage com O_2^{-2} , formando uma espécie reativa de oxigênio, o peroxinitrito. A partir daí forma-se o nitrato e nitrito como produto final, que atuam como agentes microbicidas (Bogdan; Rollinghoff 1998; Ueda-Nakamura et al. 2006).

No presente estudo, observou-se que LCC, AA, CN e CD não exibiram indução significativa da síntese de NO, tanto nos macrófagos infectados quanto não infectados. Da mesma forma, o tratamento com a Anf B em macrófagos infectados não induziu produção significativa de NO. Resultados similares foram encontrados por Abas et al. (2006) testando-se extrato de folhas de *A. occidentale*, onde não houve liberação significativa de NO em macrófagos murinos. Esses dados reforçam que os compostos testados utilizam outra via para potencialização de sua atividade leishmanicida, não dependendo para síntese de NO, tendo em

vista que a produção dessa molécula não é a única via para o controle da infecção intracelular por *Leishmania* em macrófagos (Singh et al. 2012). Como não houve indução significativa para produção de NO, é possível que a redução de macrófagos infectados e do índice de sobrevivência seja devido à capacidade fagocítica e à atividade lisossomal por macrófagos estimulados pelas substâncias.

O uso de larvas de *T. molitor* para a comercialização e consumo animal e humano tem crescido nos últimos tempos, devido à sua composição nutricional, facilidade de manuseio e criação e ciclo de vida curto (Han et al. 2010). Além disso, perante o conflito ético e aspectos sociais, busca-se priorizar cada vez mais o uso modelos alternativos em pesquisa experimental, como o *T. molitor*, tendo em vista que em insetos o sistema imune inato é evolutivamente conservado (Canteri et al. 2018). Devido a essas características, tem-se aumentado o interesse pelo uso desse inseto como modelo alternativo para estudos *in vivo* para avaliação de diversas atividades como antimicrobiana (Morey et al. 2016), toxicidade (Van Der Valk e Meijden, 2014) inseticida (Wang et al. 2015) e de patogenicidade (McGonigle et al. 2016).

Os estudos toxicológicos têm como objetivo principal uma previsão dos possíveis efeitos adversos que determinada substância pode provocar quando da exposição humana ou animal, seja ela candidata a um medicamento, praguicida, agente químico industrial, dentre outros (Koeter 1993; Stokes 2002; Meyer 2003). Neste contexto, foi realizado o ensaio *in vivo* utilizando-se como organismo modelo o *T. molitor*, sendo determinados os perfis de sobrevivência nas formas larvais do inseto, para avaliação da toxicidade aguda do LCC e CN. Assim como no teste de citotoxicidade em macrófagos, o LCC apresentou menor toxicidade sobre *T. molitor* que o CN, sugerindo-se um efeito sinérgico dos compostos presentes no LCC, conferindo ao mesmo uma menor toxicidade, quando comparado ao CN isolado.

Esses resultados corroboram alguns estudos que mostraram que as substâncias puras isoladas foram mais tóxicas do que suas frações de origem (Silva et al. 2007; Simas et al. 2004). Semelhantemente, Guissoni et al. (2013) demonstraram que o LCC foi menos tóxico, apresentando maior valor de concentração letal média (CL₅₀) do que suas frações, na atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. Avaliando-se a toxicidade oral aguda de LCC em *Rattus norvegicus*, foi demonstrada DL₅₀ >2000 mg/kg, não causando nenhum sinal significativo de intoxicação aos animais (Guissoni et al. 2013). Segundo a classificação da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2002), este valor permite classificar o LCC, na classe 5 (DL₅₀ 2000-5000 mg/Kg), indicando uma substância de baixa toxicidade.

Ainda de acordo com a OECD, o CN apresenta como uma de suas características principais a não toxicidade. Testes realizados por esta organização mostraram os seguintes

resultados quanto à ecotoxicidade do CN: biodegradabilidade - 96% (28 dias) - (OECD-302C, 2009); solubilidade em água igual a 1,0 g/L; ecotoxicidade (96 h): peixe < 11 g/L; dáfrias < 66 g/L; algas < 1 g/L - (OECD-425, 2008) e quanto à genotoxicidade com empregando-se o teste Ames *Salmonella* apresentou resultado negativo. Segundo o documento *Safety Data Sheets* (SDS, 2017), a DL₅₀ oral é de 500 mg/kg (ratos) e a DL₅₀ dérmica é >2,000 mg/kg (*Daphnia magna*).

A não toxicidade do CN relatada na literatura difere do resultado de CC₅₀ e DL₅₀ para essa substância no presente estudo, porém, de acordo com a OECD, essa toxicidade, mesmo que seja baixa, pode ser melhorada com o encapsulamento e a liberação controlada para utilização como biofármaco (OECD, 2002).

Em conclusão, LCC, AA, CN e CD foram capazes de apresentar potencial anti-*Leishmania* contra *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major*, atuando também através de vias de ativação de macrófagos, tais como aumento da capacidade fagocitária, aumento do volume lisossomal. O LCC e o CN foram capazes de reduzir o percentual de macrófagos murinos infectados por *L. infantum* e o índice de sobrevivência das formas amastigotas internalizadas. Demonstrou-se que larvas de *T. molitor* são um modelo alternativo de invertebrado apropriado para analisar a toxicidade aguda das substâncias testadas. Os resultados são promissores e servem como ponto de partida para a realização de pesquisas posteriores que visem a avaliação do potencial leishmanicida *in vivo*.

Referências

- Abas F, Lajis NH, Israf DA, Khozirah S, Kalsom YU (2006) Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. *Food Chem* 95: 566-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.034>
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 7(5): e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Alves MMM, Cruz LPL, Freitas RIC, Costa AMS, Lima JEO, Reis RLR, Vêras LMC, Carvalho FAA (2018) Essential Oil of *Pilocarpus Microphyllus* Stapf. against promastigotes forms of *Leishmania infantum*. *J Soil Plant Biol* 1: 40-43. <https://doi.org/10.33513/JSPB/1801-06>
- Alves MMM, Brito LM, Souza AC et al (2017) Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 390: 893-903. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1387-y>

- Amorati R, Pedulli GF, Valgimigli L, Attanasi OA, Filippone P, Fiorucci C, Saladino R (2001) Absolute rate constants for the reaction of peroxy radicals with cardanol derivatives. *J Chem Soc 2*: 2142-2146. <https://doi.org/10.1039/B105079F>
- Araújo JMD, Silva AP, Cândido, MB, Silva, TWM, Andrade Júnior FP (2020) Ethnopharmacological study of *Anacardium occidentale* L.: a brief review. *Res Soc Dev* 9(8): e487985802. <http://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.8502>
- Athayde-Filho PF, Miller J, Simasc AM (2000) Mesoionic Compounds: Amphiphilic Heterocyclic Betaines. *Synthesis* 11: 1565-1568. <http://doi.org/10.1055/s-2000-7606>
- Ayyanar M, Ignacimuthu S (2009) Herbal medicines for wound healing among tribal people in southern India: ethnobotanical and scientific evidences. *Int J App Res Nat Prod* 2(3): 29-42. Available online <http://www.healthy-synergies.com>
- Bapela MJ, Kaiser M, Meyer JJM (2017) Anti-Leishmanial activity of selected South African plant species. *S Afr J Bot* 108: 342-345. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.08.014>
- Balgude D, Sabnis AS (2014) CNSL: an environment friendly alternative for the modern coating industry. *J Coating Tech Res* 11:169-183. <https://doi.org/10.1007/s11998-013-9521-3>
- Benitez ADN, Martins FDC, Mareze M et al (2018) Spatial and simultaneous seroepidemiology of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dog owners and their dogs from randomly selected households in a major city of southern Brazil. *Prev Vet Med* 154: 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.011>
- Berman HM, Battistuz T, Bhat TN et al (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235-242. <https://doi.org/10.1107/S0907444902003451>
- Blanco VR, Nascimento-Junior NM (2017) Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. *Rev Virtual Quim* 9 (3): 861-876. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170055>
- Bogdan C, Rollingshoff M (1998) The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28: 121-134. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00169-0)
- Bonatto SJR, Folador A, Aikawa J et al (2004) Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. *Cell Immunol* 231: 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2004.12.001>
- Borges G, Mullen W, Crozier A (2010) Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. *Food Funct* 1: 73-83. <https://doi.org/10.1039/C0FO00008F>
- Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES (2007) Anti-Leishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol* 111: 396-402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.006>

- Brenzan MA, Nakamura CV, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MC, Cortez DA (2007) Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliensis* leaves against *Leishmania amazonensis*. Parasitol Res 101: 715-722. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0542-7>
- Buzzini P, Arapitsas P, Goretti M et al (2008) Antimicrobial and Antiviral Activity of Hydrolysable Tannins. Mini Rev Med Chem 8(12): 1179-1187. <https://doi.org/10.2174/138955708786140990>
- Canteri SP, Caloni CC, Wilson D, Almeida SR (2018) An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. J Fungi 4(4): 125. <https://doi.org/10.3390/jof4040125>
- Carneiro SM, Carvalho FA, Santana LC, Sousa AP, Neto JM, Chaves MH (2012) The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.) Biol Res 45:111-116. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000200002>
- Carvalho PB, Ferreira EI (2001) Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. Fitoterapia 72: 599-618. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00301-X](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00301-X)
- Carvalho RCV, Sousa VC, Santos LP et al (2021) Limonene-carvacrol: A combination of monoterpenes with enhanced anti-Leishmanial activity. Toxicol In Vitro 74:105158. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105158>
- Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM (2001) Plant Natural Products with Leishmanicidal Activity. Nat Prod Rep 18: 674-688, 2001. <https://doi.org/10.1039/B100455G>
- Chen J, Zhang JH, Wang LK, Sucheck SJ, Snow AM, Hecht SM (1998) Inhibitors of DNA polymerase β from *Schoepfia californica*. J Chem Soc Chem Commun 24:2769-2770. <https://doi.org/10.1039/A807053I>
- Chowdhury SR, Kumar A, Godinho JLP et al (2017) Voacamine alters *Leishmania* ultrastructure and kills parasite by poisoning unusual bi-subunit topoisomerase IB. Biochem Pharmacol 138: 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.05.002>
- Cohen NC (1996) Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. San Diego, USA <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-178245-0.X5000-8>
- da Silva DPB, Florentino IF, da Silva Moreira LK et al (2018) Chemical characterization and pharmacological assessment of cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.), polysaccharide free. J Ethnopharmacol 213: 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.021>
- de Souza PC, Morey AT, Marcondes G et al (2015) *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. J Microbiol Methods 118: 182-6. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.004>
- Dibyendu P, Partha D, Tripti D, Tapati (2014) *In vitro* anti-Leishmanial efficacy of potato tuber extract (PTE_x): *Leishmanial* serine protease(s) as putative target. Exp. Parasitol 146: 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.009>

Dos Santos R, Batista, J, Rosa S et al (2011) Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. *Parasitology* 138(10): 1224-1233. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001168>

Ferreira ICP, Lonardoni MVC, Machado GMC, Leon LL, Gobbi-Filho L, Pinto LHB, Oliveira AJB (2004) Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(3): 325-327. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300015>

Ferreira C, Passos CLA, Soares DC, Costa KP, Rezende MJC, Lobão AQ, Pinto AC, Hamerski L, Saraiva EM (2017) Leishmanicidal activity of the alkaloid-rich fraction from *Guatteria latifolia*. *Exp Parasitol* 172: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.014>

França F, Cuba CA, Moreira EA, Almeida M, das Virgens ML, Marsden PD (1993) Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentale* L.) sobre a infecção por *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev. Soc. Bras Med Trop* 26 (3): 151-155. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821993000300004>

França, F, Lago EL, Marsden PD. (1996) Plants used in the treatment of Leishmanial ulcers due to *Leishmania (Vannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 29(3): 229-232. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821996000300002>

Funari CS, Almeida L, Passalacqua TG, Martinez I, Ambrósio DL, Cicarelli RMB, Silva DHS, Graminha MAS (2016) Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro anti-Leishmanial and antitrypanosomal activity. *Acta Amaz* 46 (4): 411-416. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600204>

Guissoni ACP, Silva IG, Geris R, Cunha LC, Silva HHG (2013) Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. *Rev Bras Pl Med* 15: 363-367. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000300008>

Himejima M, Kubo I (1991) Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) nut shell oil. *J Agric Food Chem* 39: 418-421. <https://doi.org/10.1021/jf00002a039>

Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Takeya K, Lepoittevin JP, Asakawa Y (1987) Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. *Chem Pharm Bull* 35: 3016-3020. <https://doi.org/10.1248/cpb.35.3016>

González-Coloma A, Reina M, Sáenz C, Lacret R, Ruiz-Mesia L, Arán VJ, Sanz J, Martínez-Díaz RA (2011) Anti-Leishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. *Parasitol Res* 110: 1381-1392. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2638-3>

Goodsell DS (2009) Computational docking of biomolecular complexes with autodock. *Cold Spring Harbor Protocols* 4(5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5200>

Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ (1996) Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. *J Mol Recognit* 9: 1-5. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199601\)9:1<1::AID-JMR241>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199601)9:1<1::AID-JMR241>3.0.CO;2-6)

Goto H, Lindoso JAL (2010) Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8(4): 419-433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

Grando FCC, Felício CA, Twardowschy A, Paula FM, Batista VG, Fernandes LC, Curi R, Nishiyama A (2009) Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. *Braz J Med Biol Res* 42(7): 599-605. <https://doi.org/10.1590/S0100-879%2009005000003>

Grazzini R, Hesk D, Heininger E et al (1991) Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 775-780. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80252-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80252-9)

Gutiérrez-Rebolledo GA, Drier-Jonas S, Jiménez-Arellanes MA (2017) Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-Leishmaniasis activity: An update. *Asian Pac J Trop Med* 10(12): 1105-1110. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.016>

Ha TJ, Kubo I (2005) Lipoxygenase Inhibitory Activity of Anacardic Acids. *J Agric Food Chem* 53(11): 4350-4354. <https://doi.org/10.1021/jf048184e>

Han SR, Lee BS, Jung KJ et al (2016) Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. *Regul Toxicol Pharm* 77: 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.006>

Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA, Grinstein S (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23: 6494-6506. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6494-6506.2003>

Hemshekhar M, Santhosh MS, Kemparaju K, Girish KS (2012) Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110: 122-132. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>

Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, Afrin F (2015) Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9(1): e3321. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003321>

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH (2015) New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. *Dermatol Clin* 33 (3): 579-593. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>

Koeter HB (1993) Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of in vitro studies. *Reprod Toxicol* 7: 117-123, [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(93\)90077-K](https://doi.org/10.1016/0890-6238(93)90077-K)

Kolodziej H, Kiderlen AF (2005) Anti-Leishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7. cells. *Phytochemistry* 66: 2056-2071. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.011>

Koutsoni O, Barhoumi M, Guizani I, Dotsika E (2014) *Leishmania* eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages. PLoS One 9(5): e97319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097319>

Kubo I, Kim M, Naya K, Yamagiwa Y, Ohashi K, Sakamoto Y, Hirakawa S, Kamikawa T (1987) Prostaglandin synthetase inhibitors from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. Chem Lett 16: 1101-1104. <https://doi.org/10.1246/cl.1987.1101>

Kubo I, Komatsu S, Ochi M (1986) Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* L. and their large-scale isolation. J Agric Food Chem 34: 970-973. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00072a010>

Kubo I, Muroi H, Himejima M, Yamagiwa Y, Mera H, Tokushima K, Ohta S, Kamikawa T. (1993a) Structure-Antibacterial activity relationships of anacardic acids. J Agric Food Chem 41: 1016-1019. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00030a036>

Kubo I, Ochi M, Vieira PC, Komatsu S (1993b) Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) apple juice. J Agric Food Chem 41: 1012-1015. <https://doi.org/10.1021/jf00030a035>

Kudi C, Umoh JU, Eduvie LO, Gefu J (1999) Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. J Ethnopharmacol 67: 225-228. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00214-1)

Lee WL, Harrison RE, Grinstein S (2003) Phagocytosis by neutrophils. Microbes Infect 5: 1299-1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>

Lemes LFN, Ramos GA, de Oliveira AS et al (2016) Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. Eur J Med Chem 108: 687-700. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.024>

Lochab B, Shukla S, Varma IK (2014) Naturally occurring phenolic sources: monomers and polymers. RSC Adv 4: 21712-21762. <https://doi.org/10.1039/C4RA00181H>

Lomonaco D, Santiago GMP, Ferreira YS, Arriaga AMC, Mazzetto SE, Melec G, Vasapollo G Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. Green Chem 11: 31-33, 2009. <https://doi.org/10.1039/B811504D>

Lopes L, Godoy LMF, de Oliveira CC, Gabardo J, Schadeck RJG, de Freitas Buchi D. (2006) Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. Micron 37: 277-287. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.08.005>

Lima-Junior D, Costa D, Carregaro V et al (2013) Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. Nat Med 19: 909-915. <https://doi.org/10.1038/nm.3221>

Liu D, Uzonna JE (2012) The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Front Cell Infect Microbiol 2(83): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>

Luize PS, Tiunan TS, Maza MLG, PK Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Cortez DAG, de Mello JCP, Nakamura CV (2005) Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Pharm Sci* 41(1): 85-94. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000100010>

Machado M, Dinis AM, Santos-Rosa M, Alves V, Salgueiro L, Cavaleiro C, Sousa MC (2014) Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. *Vet Parasitol* 200: 39-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.016>

Mansour R, Haouas N, Ben Kahla-Nakbi A, Hammami S, Mighri Z, Mhenni F, Babba H (2013) The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum* in vitro. *Iran J Pharm Res* 12(3): 349-355. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2013.1333>

Mazzetto SE, Lomonaco D, Mele G (2009) Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. *Quim Nova* 32: 732-741. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300017>

McGonigle JE, Purves J, Rolff J (2016) Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. *Dev Comp Immunol* 59: 34-38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.002>

Mele G, Vasapollo G (2008) Fine Chemicals and New Hybrid Materials From Cardanol. *Mini Rev Org Chem* 5(3): 243-253. <https://doi.org/10.2174/157019308785161611>

Mesquita JT, Costa-Silva TA, Borborema SET, Tempone AG (2014) Activity of imidazole compounds on *Leishmania (L.) infantum chagasi*: reactive oxygen species induced by econazole. *Mol Cell Biochem* 389: 293-300. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1954-6>

MEYER O (2003) Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicol Lett* 140: 21-30. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00492-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00492-7)

BB Mishra, RR Kale, RK Singh, VK Tiwari (2009) Alkaloids: future prospective to combat Leishmaniasis. *Fitoterapia* 80: 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.10.009>

Morais TR, da Costa-Silva TA, Tempone AG et al (2014) Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triterpenoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): structure/activity relationships. *Molecules* 19(5): 5761-5776. <https://doi.org/10.3390/molecules19055761>

Moreira RCR, Rebêlo JMM, Gama MEA, Costa JML (2002) Nível de conhecimentos sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saude Publica* 18: 187-195. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000100019>

Morey AT, de Souza FC, Santos JP et al (2016) Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. *Curr Pharm Biotechnol* 17(4): 365-375. <https://doi.org/10.2174/1389201017666151223123712>

Moura-Costa GF, Nocchi SR, Ceole LF, Mello JCP, Nakamura CV, Filho BPD, Temponi LG, Nakamura TU (2012) Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol* 143: 631-638. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.016>

Muroi H, Kubo I (1996) Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* 80: 387-394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03233.x>

Netto EM, Tada MS, Golight KDC, Lago E, Barreto AC, Marsden P (1985) Conceitos de uma população local a respeito da Leishmaniose Mucocutânea em uma área endêmica. *Rev Soc Bras Med Trop* 18(1): 33-37. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821985000100007>

Niedergang F, Chavrier P (2004) Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr Opin Cell Biol* 16: 422-428. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.006>

Odonne G, Houël E, Bourdy G, Stien D (2017) Treating Leishmaniasis in Amazonia: a review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. *J Ethnopharmacol* 199: 211-230. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.048>

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development (2002), Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development (2008), Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development (2009), Test No. 302C: Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070400-en>.

Oliveira LGC, Brito LM, Alves MMA et al (2017) *In vitro* effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran against *Leishmania amazonensis*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 01: 1-7. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12639>

Oliveira MS, Morais SM, Magalhaes DV et al (2010) Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. *Acta Trop* 117: 165-170,. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.003>

Osorio E, Arango GJ, Jiménez N et al (2007) Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 111: 630-5. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.015>

Passero LF, Laurenti MD, Santos-Gomes G, Soares Campos BL, Sartorelli P, Lago JH (2014) Plants used in traditional medicine: extracts and secondary metabolites exhibiting antileishmanial activity. *Curr Clin Pharmacol* 9(3):187-204. <https://doi.org/10.2174/1574884709999140606161413>

Pereira JM, Severino RP, Vieira PC et al Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem* 16(19): 8889-8895, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.08.057>

Petropolis DB, Rodrigues JCF, Viana NB, Pontes B, Pereira CFA, Silva-Filho FC (2014) *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. *PeerJ* 2: e317. <https://doi.org/10.7717/peerj.317>

Reimão JQ, Scotti MT, Tempone AG (2010) Anti-Leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1, 4-dihydropyridines: *In vitro* evaluation and structure-activity relationship study. *Bioorg Med Chem* 18: 8044–8053. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.015>

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS (2003) Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mater Res* 6(3): 317-320. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300003>

Roy N, Chakraborty S, Paul Chowdhury B, Banerjee S, Halder K, Majumder S, Majumdar S, Sen PC (2014) Regulation of PKC mediated signaling by calcium during Visceral Leishmaniasis. *PLoS One* 9(10): e110843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110843>

Salama IS, Arrais-Silva C, Arrais-Lima WW (2017) Evaluation of boldine activity against intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Korean J Parasitol* 55(3): 337. <https://dx.doi.org/10.3347%2Fkjp.2017.55.3.337>

Sanner MF (1999) Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model* 17(1): 57-61. PMID: 10660911

Santana JS, Sartorelli P, Lago JHG, Matsuo AL (2012) Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim Nova* 35(11): 2245-2248. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100029>

Scotti L, Mendonça Junior FJB, Moreira DRM, Silva MS, Pitta IR, Scotti MT (2012) SAR, QSAR and docking of anticancer flavonoids and variants: a review. *Curr Top Med Chem* 12(24):2785-2809. <https://doi.org/10.2174/1568026611212240007>

Seong YA, Shin PG, Yoon JS, Yadunandam AK, Kim GD (2014) Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. *Cell Biochem Biophys* 68(2): 369-377. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9717-2>

Silveira, ES, Rodrigues NLDC, Machado, NMJ, Fonseca, FRM, Teixeira, MJ, Leal LKAM (2020) Medicinal Plants Containing Coumarin or Essential Oils from the Brazilian Biome May be New Option for Treating Leishmaniasis? *Pharmacogn Rev* 14(27): 53-61. <https://doi.org/10.5530/phrev.2020.14.9>

Simas NK, Lima EC Conceição SR, Kuster RM, Oliveira Filho M, Lage CLS (2004). Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue atividade larvicida de *Myrozylon balsamum*

(óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Quim Nova 27(1): 46-9. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100009>

Singh N, Kumar, M, Singh RK (2012) Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med 5: 485-497. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60084-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4)

Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK (2014) Natural product based leads to fight against Leishmaniasis. Bioorg Med Chem 22: 18-45. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.048>

Silva HHG, Geris R, Rodrigues Filho E, Rocha C, Silva IG (2007) Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop 40(3): 264-67. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000300002>

Silva RAO, Santos MRMC, Filho FCS, Silva, MCC Oliveira, GAL, Silva MGO, Marques, LGA (2014) Prospecção tecnológica de fitoterápico (*Euphorbia tirucalli* L.) utilizado no tratamento de neoplasias e outras doenças. Cadernos de Prospecção 6(4): 490-499. <https://doi.org/10.9771/cp.v6i4.11394>

Soares DC, Pereira CG, Meireles MA, Saraiva EM (2007) Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. Parasitol Int 56(2): 135-139. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.01.004>

Solis FJ, Wets RJB (1981) Minimization by Random Search Techniques. Math Oper Res 6(1): 19-30. <https://doi.org/10.1287/moor.6.1.19>

Souza-Silva F, Bourguignon SC Pereira BAS et al (2015) Epoxy- α -lapachone has *in vitro* and *in vivo* anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* effects and inhibits e erine proteinase activity in this parasite. Antimicrob Agents Chemother 59(4): 1910-1918. <https://doi.org/10.1128/AAC.04742-14>

Stasiuk M, Bartosiewicz D, Kozubek (2008) A Inhibitory effect of some natural and semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. Food Chem 108(3): 996-1001. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.011>

Steverding D (2017) The history of Leishmaniasis. Parasit Vectors 10(82): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

Stokes WS (2002) Humane endpoint for laboratory animals used in regulatory testing. ILAR J 43: 31-38. https://doi.org/10.1093/ilar.43.Suppl_1.S31

SDS - Safety Data Sheet (2017) According to Regulation (EC) n ° 1907/2006 and its amendments. p. 8. <https://nonkorservice.pl/wp-content/uploads/2018/05/C-Pox-ST180-AL-7N180-ms3.pdf> Accessed in Jun 20, 2021.

Suresh M, Kaleysa Raj R (1990) Cardol: The antifilarial principle from *Anacardium occidentale* L. Curr Sci 59(9): 477-479. <http://www.jstor.org/stable/24093746>

Torres FAE, Passalacqua TG, Velásque AMA, de Souza RA, Colepicolo P, Graminha MAS (2014) New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Rev Bras Farmacogn* 24(3): 265-276. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.001>

Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV (2011) Recent advances in Leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* 15:e525-e532. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>

Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK Singh SP, Singh RK (2018) Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of Leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem* 18(1): 26-41 <https://doi.org/10.2174/1389557517666170425105129>

Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA et al (2010) Anti-Leishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol Int* 55: 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.006>

Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS et al (2011) Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol Int* 60(4): 357-63. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.001>

Van Der Valk T, Van Der Meijden A (2014) Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. *Toxicon* 88: 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.007>

Voirin C, Caillol S, Sadavarte NV, Tawade BV, Boutevinab B, Wadgaonkar PP (2014) Functionalization of cardanol: towards biobased polymers and additives. *Polym Chem* 5: 3142-3162. <https://dx.doi.org/10.1039/c3py01194a>

Wang X, Hao Q, Chen Y, Jiang S, Yang Q, Li Q (2015) The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Insect Sci* 15 (1): 116. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev093>

Wasserman D, Dawson CR (1948) The cardol component of Indian cashew nut shell liquid with reference to the liquid's vesicant activity. *J Am Chem Soc* 70(11): 3675-3679. <https://doi.org/10.1021/ja01191a041>

Wei WC, Su YH, Chen SS, Sheu JH, Yang NS (2011) GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. *Cytokine* 55: 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.03.017>

WHO - World Health Organization (2021) Leishmaniasis. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>. Accessed June 15, 2021.

Wu K, Liu J, Tseng SF et al (2011) Anacardic Acid (6-Pentadecylsalicylic Acid) Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Src/FAK/Rho GTPases Signaling Pathway. *J Pharmacol Exp. Ther* 339(2): 403-411. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.181891>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados apresentados, compreende-se que o tratamento das leishmanioses engloba uma complexidade de fatores que devem ser observados. Devido às limitações existentes nas opções de terapia para o tratamento da doença, o desenvolvimento racional de fármacos é uma realidade, gerando novas perspectivas acerca da descoberta de novos medicamentos ou aprimoramento dos que já existem. Dentre as alternativas, encontra-se o desenvolvimento de fármacos a partir de compostos oriundos de plantas, os quais podem apresentar moléculas que produzam resultados promissores como potencial fonte de medicamentos para o tratamento da leishmaniose.

Este estudo amplia o conhecimento científico do LCC, AA, CN e CD ao demonstrar sua promissora atividade contra *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major*, bem como sua atividade imunomoduladora. Assim, investigações adicionais são necessárias para a avaliação dessas substâncias veiculadas em microemulsões e outras formulações farmacêuticas, bem como sua associação a medicamentos convencionais, no modelo de infecção experimental *in vivo*, explorando-se o efeito terapêutico, verificando-se a melhor dose, regimes terapêuticos e vias de administração.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ADEOGUN, A. *et al.* Kinetics, thermodynamics and antioxidant activities of water and ethanol extract of stem bark of *Anacardium occidentale*. **Ife Journal of Science**, v. 18, p. 43-52, 2016.

AISWARYA, G, *et al.* Study for antibacterial activity of cashew apple *Anacardium occidentale* extracts. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, p. 193-200, 2011.

AJILEYE, O. O. *et al.* Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. Anacardiaceae leaf extract. **Journal of King Saud University – Science**, v. 27, p. 244-52, 2015.

AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004770, 2016.

AKHTARDANESH, B. *et al.* Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: serological and molecular study. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 54, n. 1, p. 96-102, 2017.

AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286-287, 2001.

ALCOLEA, P. J. *et al.* Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 13, n. 5, p. e0007288, 2019.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro**, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN. C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v.7, n.5, 2012.

ALVARENGA, T. A. *et al.* Schistosomicidal activity of alkyl-phenols from the cashew *Anacardium occidentale* against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 8821-8827, 2016.

ALVES, M. M. M. *et al.* Essential Oil of *Pilocarpus Microphyllus* Stapf. against promastigotes forms of *Leishmania infantum*. **Journal of Soil and Plant Biology**, v. 1, p. 40-43, 2018.

ALVES, M. M. M. *et al.* Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 893-903, 2017.

AMORATI, R. *et al.* Absolute rate constants for the reaction of peroxy radicals with cardanol derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 2, p. 2142-2146, 2001.

ANAND, G. *et al.* *In vitro* antimicrobial and cytotoxic effects of *Anacardium occidentale* and *Mangifera indica* in oral care. **Journal of Pharmacy and Bioallied Science**, v. 7, p. 69-74, 2015.

ANDRADE, T. J. A. S. *et al.* Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). **Food Chemistry**, v. 126, p. 1044-1048, 2011.

ANUJA, K.; YADA, V. R.; SRINIVASAN, D. Evaluation of antioxidant activity of cashew apple juice *Anacardium occidentale* by various methods. **International Journal of Innovation in Pharma Biosciences and Research Technology**, v. 2, p. 179-85, 2015.

ANYAEGBU, O.; AJAYI, A.; ADEDAPO, A. Hypolipidemic and antioxidant effects of the Methanolic stem bark extract of *Anacardium occidentale* Linn. in triton-X 100 induced hyperlipidemic rats. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 17, p. 211-221, 2017.

ARAÚJO, J. M. D. *et al.* Ethnopharmacological study of *Anacardium occidentale* L.: a brief review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e487985802, 2020.

AYYANAR, M; IGNACIMUTHU, S. Herbal medicines for wound healing among tribal people in southern India: ethnobotanical and scientific evidences. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 2, p. 29-42, 2009.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da leishmaniose visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 74, n. 1, 2008.

BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal Leishmaniasis patients. **Infectious Immunology**, n. 70, p. 6734-6740, 2002.

BALACHANDRAN, V. S. *et al.* Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from nut to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 427-438, 2013.

BALASEGARAM, M. *et al.* Liposomal amphotericin B as a treatment for human Leishmaniasis. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 17, n. 4, p. 493-510, 2012.

BALGUDE, D.; SABNIS, A.S. CNSL: an environment friendly alternative for the modern coating industry. **Journal of Coatings Technology and Research**, v. 11, n. 2, p. 169-183, 2014.

BAPELA, M. J.; KAISER, M.; MEYER, J. J. M. South African Journal of Botany Anti-Leishmanial activity of selected South African plant species. **South African Journal of Botany**, v.108, p.342-345, 2017.

BARBOSA, T. P. *et al.* Design synthesis and anti-Leishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4250-4256, 2011.

BARROS, L. M. **Caju. Produção: aspectos técnicos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 148, 2002.

BATISTA; J. F. *et al.* Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia**. v. 29, n. 4, 2020.

BEKHIT, A. A. *et al.* *Leishmania* treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 160, p. 229-2445, 2018.

BENASSI, J.C. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 93-97, 2017.

BENITEZ, N.A. *et al.* Spatial and simultaneous seroepidemiology of anti-*Leishmania* spp. antibodies in dog owners and their dogs from randomly selected households in a major city of southern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.154, p.47-53, 2018.

BEZERRA, T. T. Nanocompósitos de AgNPs funcionalizadas com os constituintes do LCC e galactomanana com potencial atividade anti-*Leishmania*. 2019. 76 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

BHOR, R.; RAFATI, S.; PAI, K. Cytokine saga in visceral Leishmaniasis. **Cytokine**, e:155322, 2020.

BLACKWELL, S. Chemokines and Leishmaniasis Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 6, p. 295-301, 2018.

BLANCO, V.R.; NASCIMENTO-JUNIOR, N.M. Leishmaniasis: general aspects related with the disease, the parasite cycle, available drugs, novel prototypes and vaccines. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017.

BLOISE, E. *et al.* Sustainable Preparation of Cardanol-Based Nanocarriers with Embedded Natural Phenolic Compounds. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1299-1304, 2014.

BORGES, G.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices. **Food Function**, v. 1, p. 73-83, 2010.

BORGHI, S.M. *et al.* *Leishmania* infection: painful or painless? **Parasitology research**, v. 116, p. 465-475, 2017.

BOSCOLO, O. H.; SENNA-VALLE, L. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 63, p. 263-277, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS - Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil. 2020d. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em 16 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS - Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Leishmaniose Visceral - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil. 2020a. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvpi.def>>. Acesso em 16 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS - Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Leishmaniose Visceral - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Piauí. 2021c. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvPI.def>>. Acesso em 20 de nov 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A à Z. Leishmaniose Tegumentar. Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2019. 2020c. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 16 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A à Z. Leishmaniose Visceral. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2019. 2020b. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 16 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde de A à Z. Leishmaniose Tegumentar (LT). 2021b. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-tegumentar-lt>>. Acesso em: 16 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: RENISUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 14 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Doenças tropicais negligenciadas. Número Especial, 2021a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf>. Acesso em: 15 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico]. 3ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf>. Acesso em: 16 de jun 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. rev. atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental Leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1485-1494, 1999.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

BUZZINI, P. *et al.* Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1179-1187, 2008.

CÂMARA, C. R. S. Indicadores de qualidade de amêndoas de castanha de caju em pedaços durante o processo industrial. 2010.118f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2010.

CANTERI, De S. P. *et al.* An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 2018.

CARNEIRO, S. M. P. *et al.* The cytotoxic and anti-*Leishmanial* activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, p. 111-116, 2012.

- CARVALHO, E. M. Parasite, vectors and reservoirs as determinants of tegumentary Leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 423-424, 2012.
- CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 599-618, 2001.
- CARVALHO, R. C. V. *et al.* Limonene-carvacrol: A combination of monoterpenes with enhanced anti-Leishmanial activity. **Toxicology in Vitro**, v. 74, p. 105158, 2021.
- CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.M. Plant Natural Products with Leishmanicidal Activity. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 674-688, 2001.
- CHEN, J. *et al.* Inibidores da DNA polimerase β da *Schoepfia californica*. **Journal Chemical Society, Chemical Communications**, v. 24, p. 2769-2770, 1998.
- CHOWDHURY, S. R. *et al.* Voacamine alters *Leishmania* ultrastructure and kills parasite by poisoning unusual bi-subunit topoisomerase IB. **Biochemical pharmacology**, v. 138, p. 19-30, 2017.
- CLABORN, D. M. The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. **Journal Global Infection Disease**, v. 2, n. 2, p.127-134, 2010.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N.; COUTINHO, S. G. A resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. In: Conceição-Silva F, Alvez CR, comps. *Leishmanioses do continente americano* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 357-379, 2014.
- COSTA, D. *et al.* CCR2 signaling contributes to the differentiation of protective inflammatory dendritic cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 2, p.423-32, 2013.
- COSTA, A.B.G. *et al.* 3'nucleotidase/nuclease activity allows *leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 4, p.1732-1740, 2014.
- CRISÓSTOMO, L.A. *et al.* **Adubação, irrigação, híbridos e práticas culturais para o meloeiro no Nordeste**. Fortaleza: 21 p. Circular Técnica, 14. Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.
- CROFT, S. L.; OLLIARO, P. *Leishmaniasis* chemotherapy - challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p. 1478-1483, 2011.
- DA COSTA, C. D. E. *et al.* Hypotensive, vasorelaxant and antihypertensive activities of the hexane extract of *Anacardium occidentale* Linn. **Arch Biol Sci.**, v. 70, p. 459-468, 2018.
- DA SILVA, D. P. B. *et al.* Chemical characterization and pharmacological assessment of cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.), polysaccharide free. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 395-402, 2018.

DA SILVA, R. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of *Anacardium occidentale* L. flowers in comparison to bark and leaves extracts. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 4, p. 87-89, 2016.

DE LIMA, S. G. *et al.* Effects of immature cashew nut-shell liquid *Anacardium occidentale* against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae* and inhibition of acetylcholinesterase activity. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 806-18, 2008.

DIAS-SOUZA, M. *et al.* Evaluation of antimicrobial and anti-biofilm activities of *Anacardium occidentale* stem bark extract. **Journal of Natural Products**, v. 26, p. 198-205, 2013.

DIAS-SOUZA, M. V. *et al.* Antibiofilm activity of cashew juice pulp against *Staphylococcus aureus*, high performance liquid chromatography/diode array detection and gas chromatography-mass spectrometry analyses, and interference on antimicrobial drugs. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 589-96, 2017.

DOS SANTOS, R. A. N. *et al.* Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. **Parasitology**, v. 138, n. 10, p. 1224-1233, 2011.

DOSS, V. THANGAVEL, K. Antioxidant and antimicrobial activity using different extracts of *Anacardium occidentale* L. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 2, 436-443, 2011.

EICHBAUM F, KOCH-WESER D, LEO A. Activity of cashew *Anacardium occidentale* nuts shell oil in human ancylostomiasis. **American Journal of Digestive Diseases**, v. 17, p. 370-371, 1950.

ELIAKIM-IKECHUKWU, C.; OBRI, A.; AKPA, O. Phytochemical and micronutrient composition of *Anacardium occidentale* Linn cashew stem-bark hydroethanolic extract and its effect on the fasting blood glucose levels and body weight of diabetic wistar rats. **Internet Journal of Nutrition and Wellness**, v. 10, p. 1-6, 2010.

ELMAHALLAWY, E. *et al.* Diagnosis of Leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, p. 961-972, 2014.

EMELIKE, N.; AKUSU, M.; UJONG, A. Antioxidant and physicochemical properties of oils extracted from cashew *Anacardium occidentale* L. Kernels. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 2, p. 122-128, 2017.

FAZALI, F. *et al.* Phytochemical screening, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of aqueous extract of *Anacardium occidentale* Linn. and its effects on endogenous antioxidant enzymes in hypercholesterolemic induced rabbits. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 69-74, 2011.

FERREIRA, I. C. P. *et al.* Anti-Leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FERREIRA, C. *et al.* Leishmanicidal activity of the alkaloid-rich fraction from *Guatteria latifolia*. **Experimental parasitology**, v. 172, p. 51-60, 2017.

FRANÇA, F.C. F. *et al.* Síntese e caracterização de surfactantes alquilfenil poliglicosídios a partir da amilose e alquil fenóis extraídos do LCC natural. **Química Nova**, v. 39, n. 7, p. 771-781, 2016.

FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. *Revista Portuguesa de Ciências veterinárias*, v.109, n.55, p. 11-20, 2010.

FUNARI, C.S. *et al.* Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro anti-*Leishmanial* and antitrypanosomal activity. **Acta Amazonica**, v. 46, p. 411-416, 2016.

GANDHI, T.; PATEL, M.; DHOLAKIYA, B. Studies on effect of various solvents on extraction of cashew nut shell liquid (CNSL) and isolation of major phenolic constituents from extracted CNSL. **Journal of Natural Products Plant Resource**, v. 2, n. 1, p. 135, 2012.

GATHANY, J. *Phlebotomus papatasi* sand fly. Public Health Image Library, Centers for Disease Control and Prevention, USA. Centers for Disease Control and Prevention – CDC. ID#: 10275. Disponível em: < <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10275>>. Acesso em 05 de jun 2021.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of translational internal medicine**. v. 3, n. 2, p. 43-50, 2015.

GHALY, A. E.; ALKOAİK, F. N. The yellow mealworm as a novel source of protein. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.4, p. 319-331, 2009.

GOMES, C. E. *et al.* Clinical effect of a mouthwash containing *Anacardium occidentale* Linn. on plaque and gingivitis control: a randomized controlled trial. **Indian J Dent Res.**, v. 27, 364-369, 2016.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* Anti-*Leishmanial*, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. **Parasitology Research**, v.110, p.1381-1392, 2011.

GOTO, H.; LINDOSO J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRAZZINI, R. *et al.* Inhibition of lipoygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 176, p. 775-780, 1991.

GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A.; DRIER-JONAS, S.; JIMÉNEZ-ARELLANES, M. A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-Leishmaniasis

activity: An update. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1105-1110, 2017.

HA, T. J.; KUBO, I. Atividade inibitória da lipoxigenase de ácidos anacárdicos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4350-4354, 2005.

HAN, S.R. *et al.* Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 206-212, 2016.

HARHAY, M. O. *et al.* Urban parasitology: visceral Leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011,

HEMSHEKHAR, M. *et al.* Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 418-421, 1991.

HUBERT, D. J. *et al.* *In vitro* leishmanicidal activity of some Cameroonian medicinal plants. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 304-308, 2013.

IFESAN, B. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of selected plant leaves. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, p. 465, 2013.

ITOKAWA, H. *et al.* Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 3016-3020, 1987.

KAMATH, K. *et al.* Anthelmintic activity of leaves extracts of *Anacardium Occidentale* and *Mangifera Indica* anacardiaceae . **American Journal of PharmTech Research**, v. 3, p. 560-564, 2003.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 984-993, 2003.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at thre hosdt-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9 p. 604- 615, 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A.F. Anti-Leishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7. cells. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2056-2071, 2005.

KUBO, I. *et al.* Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1012-1015, 1993b.

- KUBO, I. *et al.* Prostaglandin synthetase inhibitors from the African medicinal plant *Ozoroa mucronata*. **Chemistry Letters**, v. 16, p. 1101-1104, 1987.
- KUBO, I.; KOMATZU, S.; OCHI, M. Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* L. and their large-scale isolation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 34, p. 970-973, 1986.
- KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Structure-Antibacterial activity relationships of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1016–1019, 1993a.
- KUDI, A.C. *et al.* Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 225-228, 1999.
- LAURENS, A. *et al.* Antivectorial activities of cashew nut shell extracts from *Anacardium occidentale* L. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 145-146, 1997.
- LEMES, L.F.N. *et al.* Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 687-700, 2016.
- LEZAMA-DÁVILA, C. M. *et al.* A new anti-Leishmanial preparation of combined solamargine and solasonine heals cutaneous Leishmaniasis through different immunochemical pathways. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2732-2738, 2016.
- LIMA, A. C. **Insetos do Brasil**. 9º TOMO. Capítulo XXIX. Coleópteros 3ª parte. Escola Nacional de agronomia série didática, Nº 11 – 1955.
- LIMA, V. P. M. S. Modelos de exploração do cajueiro. In: LIMA, V.P.M.S. (Org.). **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: BNB-ETENE, p.107-117,1988.
- LOCHAB, B.; SHUKLA, S.; VARMA, I. K. Naturally occurring phenolic sources: monomers and polymers. **RSC Advances**, v. 4, p. 21712-21762, 2014.
- LOMONACO, D. *et al.* Study of technical CNSL and its main components as new green larvicides. **Green Chemistry**, v. 11, n. 1, p.31-33, 2009.
- MACHADO, M. *et al.* Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 39-49, 2014.
- MACHADO, P. R. *et al.* Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 788-793, 2007.
- MAGILL, A. J. *et al.* Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 19, p. 1383-1387, 1993.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde**, v. 24, n. 12, p.2941-2947, 2008.

MANSOUR, R. *et al.* The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 349-355, 2013.

MANSUETO, P. *et al.* Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil Visceral/Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of *Leishmaniases* and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, p. 123-147, 2013.

MARQUES, M.; ALBUQUERQUE, P.; XAVIER-FILHO, J. Antimicrobial and insecticidal activities of cashew tree gum exudate. **Annals of Applied Biology**, v. 121, p. 371-377, 1992.

MARTÍNEZ AGUILAR, Y. *et al.* Secondary metabolites and *in vitro* antibacterial activity of extracts from *Anacardium occidentale* L. Cashew tree leaves. **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 17, p. 320-329, 2012.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous Leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. 2009. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, p. 732-741.

MCGONIGLE, J. E.; PURVES, J.; ROLFF, J. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 59, p. 34-38, 2016.

MELE, G; VASAPOLLO, G. Fine Chemicals and New Hybrid Materials From Cardanol, **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 5, n.3, 2008.

MENEZES, K. *et al.* Antimicrobial and anti-adherent *in vitro* activity of tannins isolated from *Anacardium occidentale* Linn. Cashew on dental biofilm bacteria. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 14, 2014.

MENON, A. *et al.* Cashew nut shell liquid-its polymeric and other industrial products. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 44, p. 2381-2383, 1985.

MIRANDA-VERÁSTEGUI, C. *et al.* Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 1395-1403, 2005.

MISHRA, B. B. *et al.* Alkaloids: future prospective to combat Leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90, 2009.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. *et al.* Citotoxicidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 21, n. 1, p. 50-56, 2013.

MOREY, A. T. *et al.* Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2016.

MOTHÉ, S. G.; MILFONT, W. N. Aplicações do LCC (Líquido da Casca da Castanha de Caju). **Revista de Química Industrial**, v. 695, p.15, 1994.

MUROI, H.; KUBO, I. Atividade antibacteriana de ácido anacárdico e toatarol, isoladamente e em combinação com meticilina, contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. **Journal of Bacteriology Aplicada**, v. 80, n. 4, p. 387-394, 1996.

NEHETE M, TATKE P. *Anacardium occidentale* Linn. –a potential wound healing agent. **Planta Medica.**, v. 81, p. 18, 2015.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12 ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

NUNES, C. M. *et al.* Serological, parasitological and molecular tests for canine visceral leishmaniosis diagnosis in a longitudinal study. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 402-409, 2015.

NWOZO, S.; AFOLABI, A.; OYINLOYE, B. Antioxidant, lipid modulating and hypoglycemic effects of the aqueous extract of *Anacardium occidentale* leave in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 5, p. 59, 2016.

ODONNE, G. *et al.* Treating Leishmaniasis in Amazonia: a review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 199, p. 211-230, 2017.

OLADELE, O.; ISHOLA, M. Activities of leaf extracts of cashew *Anacardium occidentale* L. and pawpaw *Carica papaya* L. against mycelia growth of *Aspergillus* species obtained from decayed cashew fruits. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, 2017.

OLAJIDE, O. A.; ADEROGBA, M. A.; FIEBICH, B. L. Mechanisms of anti-inflammatory property of *Anacardium occidentale* stem bark: inhibition of NF-kappaB and MAPK signalling in the microglia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 42-49, 2013.

OLIVEIRA, L. S. S.; FERREIRA, F.S.; BARROSO, A.M. Erva de Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.): Aplicações clínicas e formas tóxicas - Revisão de literatura. **JBCA - Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.7, n.13, p. 464-499, 2014.

OLIVEIRA, M. S. C. *et al.* Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v.117, p.165-170, 2010.

OMODAMIRO, O.; ACHI, N. Evaluation of *in-vitro* antioxidant and *in-vivo* analgesic activities of methanol extract of *Anacardium occidentale* leaf in Wistar albino rats. **SciFed Drug Delivery Research**, v. 2, 2018.

ONASANWO, S. A. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory properties of the leaf extracts of *Anacardium occidentale* in the laboratory rodents. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 27, p. 65-71, 2012.

Organization for Economic Co-operation and Development – OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2002.

Organization for Economic Co-operation and Development – OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2008.

Organization for Economic Co-operation and Development – OECD. Test No. 302C: Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, 2009.

OSMARI, M. P. *et al.* Líquido da casca da castanha de caju: características e aplicabilidades na produção animal. **Pubvet**, v. 9, 143-149, 2015.

OTRANTO, D. *et al.* Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: pathogen and vector circulation in a confined environment. **Veterinary Parasitology**, v. 236, p. 144-151, 2017.

Pan American Health Organization/World Health Organization – PAHO/WHO. Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. 2016a. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en>. Acesso em: 07 de jan 2021.

Pan American Health Organization/World Health Organization – PAHO/WHO. Visceral Leishmaniasis. 2016b. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en>. Acesso em: 07 de jan. 2021.

Pan American Health Organization/ World Health Organization – PAHO/WHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. n. 9, 2020. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>>. Acesso em: 07 de jan 2021.

PANWANI, D.; PUROHIT, V.; SIDDIQUI, H. Anticonvulsant activity of *Anacardium occidentale* L. leaves extract in experimental mice. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 1, p. 90-3, 2014.

PANJWANI, D.; PUROHIT, V.; SIDDIQUI, H. Antidepressant-like effects of *Anacardium occidentale* L. leaves in the mouse forced swim and tail suspension tests. **Pharmacologia.**, v. 6, p. 186-91, 2015.

- PASSERO, L. F. D. *et al.* Plants used in traditional medicine: extracts and secondary metabolites exhibiting anti-Leishmanial activity. **Current clinical pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 187-204, 2014.
- PAWAR, S. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activity of *Anacardium occidentale* leaf extracts. **Ancient Science of Life**, v. 19, p. 169, 2000.
- PEREIRA, J. M. *et al.* Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 19, p. 8889-8895, 2008.
- PEREZ-VICTORIA, F. J. *et al.* Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.33, p.23766-75. 2006.
- RAJESH, B. *et al.* S. Antioxidant and antimicrobial activity of leaves of *Terminalia catappa* and *Anacardium occidentale*: a comparative study. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, 2015.
- RAJESWARAMMA, G.; JAYASREE, D. *In vitro* anti-inflammatory activity of *Anacardium occidentale* seed extract. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 17, p. 18-22, 2018.
- REITHINGER R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 7, p. 581-596, 2007.
- RIJAL, S. *et al.* Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, p. 1530-1538, 2013.
- SALAMA, I. S; ARRAIS-SILVA, C.; ARRAIS-LIMA, W. W. Evaluation of boldine activity against intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. **The Korean journal of parasitology**, v. 55, n. 3, p. 337, 2017.
- SAIDU, A. *et al.* Antibacterial and comparative hypoglycemic effect of *Anacardium occidentale* leaves. **International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, 6-10, 2012.
- SALEHI, B. *et al.* Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Effects of *Anacardium* Plants: An Ethnopharmacological Perspective. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 295, 2020.
- SAMBO, S.; OLATUNDE, A.; LUKA, C. Anti-diabetic activity of aqueous extract of *Anacardium occidentale* Linn stem bark in normal and alloxan-induced diabetic albino rats. **Journal of Biological Sciences and Bioconservation**, v. 6, p. 41-57, 2014.
- SÁNCHEZ, L. *et al.* Evaluación de un antioxidante natural extraído del marañón *Anacardium occidentale* L. para mejorar la estabilidad oxidativa del biodiesel de jatropha. **Información tecnológica**, v. 26, p. 19-30, 2015.

SANTOS, A. M. *et al.* Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 444-448, 2008.

SANTOS, D. M. *et al.* Chemotherapeutic Potential of 17-AAG against Cutaneous *et al.* Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2014.

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, G. C. Utilisation of Cashew Nut Shell Liquid from *Anacardium occidentale* as Starting Material for Organic Synthesis: A Novel Route to Lasiodiplodin from Cardols. **Journal Braz. Chemical Society**, v. 10, p. 13-20. 1999.

SANTOS, P. L. *et al.* The severity of visceral Leishmaniasis is correlates with elevated levels of serum IL-6, IL-27 and CD14. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n.1, e:0004375, 2016.

SCHIMMING, B.C.; PINTO; SILVA, R.C. Leishmaniose visceral canina - Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.10, p.1-17, 2012.

SCHNORR, D. *et al.* IFN- γ Production of *Leishmania* Supplements Antigen the skin test *Leishmania* in the identification of exposure to *L. braziliensis* Infection. **PLoS neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 12, dez, 2012.

SERRANO, L. A. L.; PESSOA, P. F. A. P. **Sistema de produção do caju: aspectos econômicos da cultura do cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2 ed, julho. 2016.

SEONG, Y.A. *et al.* Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 369-377, 2014.

SIJA, S.; POTTY, V.; SANTHOSHLAL, P. Pharmacological evaluation and detection of anacardic acid in callus culture and various plant parts of *Anacardium occidentale* L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 7, p. 251-258, 2015.

SILVA, A. G. *et al.* Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440-444, 2007.

SILVA, R. A. O. *et al.* Prospecção tecnológica de fitoterápico (*Euphorbia tirucalli* L.) utilizado no tratamento de neoplasias e outras doenças. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 4, p. 490, 2014.

SINGH, N. *et al.* Natural product based leads to fight against Leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 18-45, 2014.

- SOKENG, S. *et al.* Hypoglycemic effect of *Anacardium occidentale* L. methanol extract and fractions on streptozotocin-induced diabetic rats. **Global Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 1-5, 2007.
- SOUZA, C. *et al.* Análise da informação sobre a leishmaniose visceral disponível em portais brasileiros da rede mundial de computadores – Internet. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 352-357, 2008.
- SOUZA, N. C. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Anacardium occidentale* leaf extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, Article ID 2787308, 2017.
- SOUZA-SILVA, F. *et al.* Epoxy- α -lapachone has *in vitro* and *in vivo* anti-*Leishmania (Leishmania) amazonensis* effects and inhibits eerrine proteinaseactivity in this parasite. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 1910-1918, 2015.
- SPANG, B. Insects as food: assessing the food conversion efficiency of the mealworm (*Tenebrio molitor*). Environmental study master thesis: The Evergreen State College, 2013.
- STASIUK, M.; BARTOSIEWICZ, D.; KOZUBEK, A. Inhibitory effect of some natural and semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 996-1001, 2008.
- STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**. v. 13, p. 191-200, 2015.
- STEVERDING, D. The history of Leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.
- SUDJAROEN, Y.; THONGKAO, K.; SUWANNAHONG, K. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxicity activities of cashew *Anacardium occidentale* nut shell waste. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 12, p. 229-34, 2018a.
- SUDJAROEN, Y.; THONGKAO, K.; SUWANNAHONG, K. Inappropriate of *in vitro* antimicrobial and anticancer activities from cashew *Anacardium occidentale* L. nut shell extracts. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 9, p. 33-38, 2018b.
- SUNDAR, S. *et al.* Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral Leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 543-550, 2012.
- SURESH, M.; KALEYSA RAJ, R. Cardol: The antifilarial principle from *Anacardium occidentale* L. **Current Science**, v. 59, p. 477-479, 1990.
- TAN, Y. P.; CHAN, E.W.C. Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and Piper betle. **Food Bioscience**, v. 6, p. 17-23, 2014.
- TEDONG, L. *et al.* Antihyperglycemic and renal protective activities of *Anacardium occidentale* Anacardiaceae leaves in streptozotocin induced diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative**, v. 3, p. 23-35, 2006.

TEIXEIRA, M. J. *et al.* Chemokines in host-parasite interactions in Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n.1, 2006.

THOMAS, B. *et al.* Antibacterial and anti-inflammatory activities of *Anacardium occidentale* leaves and bark extracts. **Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 23, p. 1-6, 2015.

TIUMAN, T. S. *et al.* Recent advances in Leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525-532, 2011.

TIWARI, N. *et al.* 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, p. 26-41, 2018.

TORRES, F.A.E. *et al.* New drugs with antiprotozoal activity from marinealgae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 265-276, 2014.

TORRES, R. C.; GARBO, A.G.; WALDE, R. Z. Characterization and bioassay for larvicidal activity of *Anacardium occidentale* cashew shell waste fractions against dengue vector *Aedes aegypti*. **Parasitology Research**, v. 114, p. 3699-3702, 2015.

TORRES, R.; GARBO, A.; WALDE, R. Larvicidal and ovicidal activities, characterization and stability of *Anacardium occidentale* Cashew shell wastes. **Virology: Research and Reviews**, v. 1, p. 1-3, 2017.

TRIPATHY, A. *et al.* The mosquitocidal activity of methanolic extracts of *Lantana camara* root and *Anacardium occidentale* leaf: role of glutathione S-transferase in insecticide resistance. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 291-295, 2011.

TSHIAMA, C. *et al.* Antidiabetic, antisickling and antibacterial activities of *Anacardium occidentale* L. Anacardiaceae and *Zanthoxylum rubescens* Planch. Ex Hook Rutaceae from DRC. **International Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 3, p. 7-14, 2018.

TUNDO, P.; ROSSI, R. H. Química Verde en Latinoamérica. INCA/IUPAC, 2004.

UKWENYA, V. *et al.* Antihyperglycemic activities of methanolic leaf extract of *Anacardium occidentale* Linn. on the pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 6, p. 169-174, 2012.

UKWENYA, V. *et al.* Evaluation of antioxidant potential of methanolic leaf extract of *Anacardium occidentale* Linn on the testes of streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **European Journal of Anatomy**, v. 17, p.72-81, 2013.

VAN DER VALK, T.; VAN DER MEIJDEN, A. Toxicity of scorpion venom in chick embryo and mealworm assay depending on the use of the soluble fraction versus the whole venom. **Toxicon**, v. 88, p. 38-43, 2014.

VASCONCELOS, M. D. *et al.* Anti-inflammatory and wound healing potential of cashew apple juice *Anacardium occidentale* L. in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 240, p. 1648-1655, 2015.

VILAR, M. S. *et al.* Assessment of phenolic compounds and anti-inflammatory activity of ethyl acetate phase of *Anacardium occidentale* L. Bark. **Molecules**, v. 21, 2016.

VOIRIN, C. *et al.* Functionalization of cardanol: towards biobased polymers and additives. **Polymer Chemistry**, v. 5, p. 3142-3162, 2014.

WAHYUNI, M. M. H. *et al.* Radical scavenging and antibacterial activity of phenolic compounds from *Anacardium occidentale* L. Stem Barks from South East Sulawesi-Indonesia. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, p. 143-149, 2018.

WANG, X. *et al.* The effect of chemical composition and bioactivity of several essential oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 116, 2015.

WASSERMAN, D.; DAWSON, C. R. The cardol component of Indian cashew nut shell liquid with reference to the liquid's vesicant activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, n. 11, 3675-3679, 1948.

WILSON, R. Blood-fed *Lutzomyia longipalpis* sandfly. **PLoS Pathogens Issue Image**, v. 5, n. 8, 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/image.ppat.v05.i08>>. Acesso em 5 de jun 2021.

World Health Organization - WHO. Integrating neglected tropical diseases in global health and development: Fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2017.

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>>. Acesso em: 15 de jun 2021.

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis. Number of cases of cutaneous Leishmaniasis reported: 2020. 2021b. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/Leishmaniasis/Leishmaniasis.html>. Acesso em: 15 de jun 2021.

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis. Number of cases of visceral Leishmaniasis reported: 2020. 2021a. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/Leishmaniasis/Leishmaniasis.html>. Acesso em: 15 de jun 2021.

WU, Y. *et al.* Anacardic Acid (6-Pentadecylsalicylic Acid) Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Src/FAK/Rho GTPases Signaling Pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, p. 403-411, 2011.

7 ANEXOS

7.1 Anexo I - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

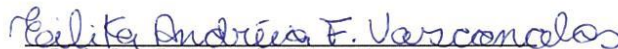


Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "*Atividade do líquido de castanha de caju (Anacardium occidentale L.) (LCC) e seus principais constituintes contra Leishmania infantum Lutzomyia longipalpis*", sob a responsabilidade da **Profa. Dra. IVETE LOPES DE MENDONÇA** do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI, com Carta de Aprovação nesta Comissão sob o nº **640/2020**, teve após análise da documentação recebida por esta Comissão, a sua solicitação de **Prorrogação de Vigência até 30 de Maio de 2022**, **Aprovada** em Reunião datada de 12 de Abril de 2021.

Teresina, 22 de Abril de 2021.


 Profa. Dra. Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos.
 Vice- Coordenadora da CEUA/UFPI



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Atividade do líquido de castanha de caju (Anacardium occidentale L.) (LCC) e seus principais constituintes contra Leishmania infantum Lutzomyia longipalpis*", registrada nº 640/2020, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. IVETE LOPES DE MENDONÇA** do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em **Ad. Referendum**.
Obs: Solicitação de Prorrogação de Vigência até 30 de Maio de 2022, Aprovada em Reunião datada de 12 de Abril de 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	08/06/2020 a 31/05/2022
Espécie/Linhagem/raça	Camundongo heterogênico/ Balc/c Ovino/ mestiço
Nº de Animais	16 01
Peso/ Idade	25g/ 4 a 5 semanas 77kg/ 2 anos
Sexo	08 Machos e 08 Fêmeas Macho
Origem	Camundongos: Biotério Setorial II/ UFPI. Carneiro: Biotério Central/UFPI.
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Biotério Setorial I da UFPI Biotério Central da UFPI.
Grau de Invasividade	1

Teresina, 22 de Abril de 2021.


 Profa. Dra. Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos.