UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antileishmania do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. e dos complexos de inclusão em β-ciclodextrina.

JÉSSICA FREIRE DA SILVA FIGUEIREDO

Teresina –Piauí

2017

JÉSSICA FREIRE DA SILVA FIGUEIREDO

Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antileishmania do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. e dos complexos de inclusão em β-ciclodextrina.

Exame de Defesa de Mestrado submetido à Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho

Teresina - Piauí

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Representação da Informação

F475d Figueiredo, Jéssica Freire da Silva.
Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antileishmania do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. e dos complexos de inclusãoo em β-ciclodextrina / Jéssica Freire da Silva Figueiredo. – 2026.
106 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Teresina, 2026.
"Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho."

1. Citotoxicidade. 2. Leishmanioses. 3. *Lippia*. 4. β-ciclodextrina. 5. Monoterpenos. I. Carvalho, Maria das Graças Freire de Medeiros. II. Título.

CDD 615.1

Bibliotecário: Gésio dos Santos Barros – CRB3/1469

JÉSSICA FREIRE DA SILVA FIGUEIREDO

Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antileishmania do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. e dos complexos de inclusão em β-ciclodextrina

Exame de Defesa de Mestrado submetido à Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

gov.br Documento assinado digitalmente
MARIA DAS GRACAS FREIRE DE MEDEIROS CARV
Data: 17/08/2026 11:00:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho (Orientadora)

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPI

gov.br Documento assinado digitalmente
MARCILIA PINHEIRO DA COSTA
Data: 18/08/2026 11:31:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Dra. Marcília Pinheiro da Costa (Examinadora interna)

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – CCS/UFPI

gov.br Documento assinado digitalmente
SABRINA MARIA PORTELA CARNEIRO
Data: 18/08/2026 09:23:58-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª. Dra. Sabrina Maria Portela Carneiro (Examinadora externa)

Docente do Curso de Farmácia (UFPI)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profª. Drª. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profª. Drª Regina Ferraz Mendes

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr Sergio Luiz Galan Ribeiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profª. Drª. Marcília Pinheiro da Costa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS 8
LISTA DE FIGURAS 10
LISTA DE TABELAS 12
RESUMO 13
ABSTRACT 14
1. INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 18
2.1 GERAL 18
2.2 ESPECÍFICOS 18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 19
3.1 Leishmanioses 19
3.2 Diagnósticos das Leishmanioses 21
3.3 Tratamento das Leishmanioses 22
3.4 Plantas medicinais e sua utilização 23
3.5 Óleos essenciais 23
3.6 Monoterpenos: timol e carvacrol 24
3.7 Gênero *Lippia* 25
3.8 Ciclodextrinas e complexos de inclusão 27
3.9 Caracterização dos complexos de inclusão 29
3.9.1 Infravermelho (IV) 29
3.9.2 Difração de Raios-X (DRX) 30
REFERÊNCIAS 30
CAPÍTULO I
PRODUTOS NATURAIS PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA 36
RESUMO 36
1. INTRODUÇÃO 37
2. METODOLOGIA 38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4. CONCLUSÃO 47
REFERÊNCIAS 47
CAPÍTULO II

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Lippia origanoides H.B.K* E SEUS MAJORITÁRIOS EM BETACICLODEXTRINA 50

RESUMO 50

1. INTRODUÇÃO 51

2.MATERIAL E MÉTODOS 52

2.1. Material vegetal e reagentes 52

2.2. Análise química do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K 52

2.3.Preparo dos complexos 53

2.3.1. Preparo da Mistura Física (MF) 53

2.3.2. Obtenção dos complexos de inclusão pelo método de secagem por *spray drying* 53

2.4. Caracterização dos complexos de inclusão 54

2.4.1. Análise do teor do óleo e padrões complexados e eficiência de complexação 53

2.4.1.1 Preparo da curva de calibração do timol e carvacrol 543

2.4.1.2 Preparo das amostras 54

2.4.1.3 Doseamento por cromatografia gasosa 54

2.4.2. Difratograma de Raio X 54

2.4.3.Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) 55

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

4. CONCLUSÃO 68

REFERENCIAS 68

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) E DE SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS EM COMPLEXO DE INCLUSÃO COM BETACICLODEXTRINAS 71

RESUMO 71

1. INTRODUÇÃO 72

2.MATERIAL E MÉTODOS 74

2.1 Substâncias químicas e reagentes .....

2.2 Células e animais .....

2.3 Material vegetal 75

2.4 Obtenção do óleo essencial (OELO) 75

2.5 Obtenção dos complexos de inclusão (CI) 75

2.6 Atividade antileishmania sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* 76

2.7 Determinação da citotoxicidade 76

2.7.1 Citotoxicidade nos macrófagos e o cálculo do índice de seletividade (IS) 76
2.7.2 Atividade hemolítica sobre hemácias de carneiro 77
2.8 Atividade sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis* 78
2.9 Atividade imunomoduladora 78
2.9.1 Produção de óxido nítrico (NO) 78
2.9.2 Capacidade fagocítica 78
2.9.3 Atividade lisossomal 78
2.10 Analise estatística 799
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 79
4. CONCLUSÃO 96
REFERÊNCIAS 96
APENDICE 1 101
APENDICE 2 102
APENDICES 3 105

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

ANOVA Análise de Variância

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

BVS- Biblioteca Virtual em Saúde

β-CD - Betaciclodextrina

CEEA – Comitê de ética em Experimentação Animal

CC_{50} – Concentração citotóxica 50%

CD – Ciclodextrina

CG-EM – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa

CI – Complexo de Inclusão

CI_{50} – Concentração inibitória média

DMSO- Dimetilsulfóxido

DRX – Difração de Raios X

DSC - Calorimetria esploratória diferencial

EC – Eficiência de complexação

EPO - European Patent Office

FTIR - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de *Fourrier*

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Intelectual

LAGO – Laboratório de Geoquímica Orgânica

LC - Leshmaniose cutânea

LV- Leishmaniose visceral

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MF - Mistura física

MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo

NO - Óxido nítrico

NTF –Núcleo de Tecnologia Farmacêutica

NPPM –Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais

OELO - Óleo essencial de *Lippia origanoides H.B.K*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS- “Phosphate buffered saline”- Salina tamponada com fosfato

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

SFB – Soro fetal bovino

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

UPSTO - United States Patent and Trademark Office

WHO/OMS - "World Health Organization" – Organização Mundial de Saúde

WIPO- World Intellectual Property Organization

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Distribuição de novos casos de LV no mundo no ano de 2013. 19
Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania sp* 21
Figura 3 - Estrutura molecular do timol, do carvacrol e p-cimeno.. 25
Figura 4 - *Lippia origanoides* H.B.K. no campo. 25
Figura 5 - Estruturas das ciclodextrinas (α, β e γ). 28

CAPITULO I

Figura 1 - Classificação dos artigos e das patentes selecionadas na BVS e na base do INPI de acordo com o ano, respectivamente. 40
Figura 2 - Classificação dos artigos e das patentes selecionadas na BVS e na base do INPI de acordo com o ano, respectivamente 41

CAPITULO II

Figura 1 - Estruturas químicas do timol, carvacrol e p-cimeno. 51
Figura 2 - Curva de calibração do Timol. 58
Figura 3 - Curva de calibração do Carvacrol. 59
Figura 4 - Cromatogramas obtidos por CG/MS do marcador Timol (A) e Timol CI (B). 61
Figura 5 - Cromatogramas obtidos por CG/MS do marcador Carvacrol (A) e Carvacrol CI(B). 61
Figura 6 - Cromatogramas obtidos por CG/MS dos marcadores timol/carvacrol (A) e do OELO CI (B). 61
Figura 7 - Difratograma da betaciclodextrina, da mistura física e complexo de inclusão entre β-ciclodextrina e OELO. 63
Figura 8 - Difratograma da β-ciclodextrina, da mistura física e complexo de inclusão da entre β-ciclodextrina e timol. 65
Figura 9 - Difratograma da β-ciclodextrina, da mistura física e complexo de inclusão da entre β-ciclodextrina e carvacrol. 65
Figura 10 - Espectros de FTIR das moléculas de β-ciclodextrina (B-CD), carvacrol, mistura física (MF) e complexo de inclusão(CI). 65
Figura 11 - Espectros de FTIR das moléculas de β-CD, timol, mistura física (MF) e complexo de inclusão(CI). 67
Figura 12 - Espectros de FTIR das moléculas de β-ciclodextrina (B-CD), OELO, mistura física (MF) e complexo de inclusão(CI). 67

CAPÍTULO III

Figura 1 - Atividade antileishmania de OE de *Lippia origanoides* (OELO), β-CD, timol e carvacrol livres e complexados contra formas promastigotas. 80

Figura 2 - Atividade antileishmania de OE de *Lippia origanoides* (OELO), β-CD, timol e carvacrol livres e complexados contra amastigotas axênicas.. 81
Figura 3 - Teste de citotoxicidade do OE de *Lippia origanoides* (OELO), β-CD, timol e carvacrol livres e complexados sobre macrófagos murinos... 82
Figura 4 - Teste de hemólise sobre hemácias de carneiro.. 86
Figura 5 - Efeito do OELO, timol, carvacrol e seus complexos de inclusão para avaliar a infecção (A) (% macrófagos infectados) e infectividade (B) (nº amastigotas por macrófago) sobre macrófagos murinos infectados por *L. amazonensis.* 917
Figura 6 - Macrófagos experimentalmente infectados por *L. amazonensis* e tratados com betaciclodextrina (Beta-CD), OELO e OELO CI..... 91
Figura 7 - Macrófagos experimentalmente infectados por *L. amazonensis* e tratados com timol, timol CI, carvacrol e carvacrol CI.. 90
Figura 8 - Teste de óxido nítrico. 91
Figura 9 - Teste de capacidade fagocítica. 94
Figura 10 - Teste de volume lisossomal.. 95

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Resultado da pesquisa nas bases de patentes e na BVS no período 2005- 2015.....39
Tabela 2 - Panorama mundial do resultado da pesquisa na base de patente no INPI e na BVS no período 2005 - 2015.....42
Tabela 3 - Resultados de algumas patentes encontradas na base do INPI utilizando o descritor "Leishmaniose(s)"/"Leishmaniasis" nos últimos 10 anos e que descrevem a utilização de produtos naturais. 43
Tabela 4 - Alguns artigos encontrados com produtos naturais para tratamento de leishmaniose. 45

CAPITULO II

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de partes aéreas de *L. origanoides* HBK.

.....56
Tabela 2 - Teor do OELO e padrões complexados obtidos por CG/MS

.....59

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Efeito antileishmania e citotóxico de OELO, timol , carvacrol e betaciclodextrina livres e em CI.....83

Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antileishmania do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K. e dos complexos de inclusão em β-ciclodextrina**. JÉSSICA FREIRE DA SILVA FIGUEIREDO.** Orientadora: Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia, UFPI, 2017.

RESUMO

Lippia origanoides H.B.K é uma espécie bastante utilizada na medicina popular no tratamento de problemas gastrointestinais, respiratórios, bem como um anti-séptico natural. Além disso, também possui propriedades analgésica, anti-inflamatória, antifúngica e antiparasitária. Estudos anteriores apontam que o óleo essencial extraído de suas partes aéreas, cujos constituintes majoritários são os isômeros carvacrol e timol, apresentam atividade antileishmania promissora. As leishmanioses são doenças endêmicas causadas por 20 espécies de protozoários patogênicas para o homem, pertencentes ao gênero *Leishmania sp.*, e afetam mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo. A cada ano são registrados dois milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas se encontram em área de risco. A falta de tratamento eficaz vem impulsionando a comunidade de pesquisadores a buscarem novas alternativas terapêuticas. O tratamento tradicional da leishmaniose, desde 1940, tem sido a base de antimônios pentavalentes compostos por estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina. No entanto, apresentam como desvantagens a via de administração (parenteral), terapia de longa duração, alem dos efeitos colaterais, a ausência crescente de resposta terapêutica é outro problema a ser enfrentado. Sabe-se que os óleos essenciais são fontes promissoras de novas entidades químicas com aplicabilidade na indútria destacando-se a cosmética, farmacêutica e alimentícia, têm como características a volatilidade e a instabilidade quando expostos ao oxigênio, luz e calor. Estas características podem ser melhoradas por meio da formação do complexo de inclusão com polímeros de ciclodextrinas. Desta forma, o presente estudo consistiu na obtenção, caracterização físico-química e avaliação do efeito antileishmania de complexos de inclusão do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K (OELO), e seus majoritários em β-ciclodextrina (β-CD). No primeiro capítulo foi realizada uma prospecção tecnológica sobre a utilização de produtos naturais no tratamento das leishmanioses. O segundo capítulo aborda a obtenção e caracterização físico-química dos complexos. Estes foram preparados por dispersão do OELO, timol e carvacrol em solução hidroalcoólica e submetidos ao processo de secagem por atomização (*spray drying)*, obtendo assim um material particulado que foi comparado às misturas físicas com β-ciclodextrina. A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e os complexos foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), e espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Forrier (FTIR). A análise obtida por CG/EM revelou que o timol (30,55%), carvacrol (20,28%) e p-cimeno (11,68%) foram os constituintes majoritários do OELO. Já a eficiência de complexação (EC) foi determinada por cromatografia gasosa, sendo os valores de EC para o Timol de 81,9 % e Carvacrol de 78,1 %. Os complexos reduziram significativamente a infecção e infectividade de macrófagos parasitados por *L. amazonensis,* além de apresentaram efeito imunomodulador, aumentando a indução de óxido nítrico, da capacidade fagocítica e do volume lisossomal em macrófagos. Os resultados deste trabalho evidenciam o potencial uso do OELO e seus constituintes majoritários timol e carvacrol em CI como uma alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: *Lippia,* monoterpenos, β-ciclodextrina*,* leishmanioses, citotoxicidade.

Technological development and evaluation of the antileishmania activity of the essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. and inclusion complexes in β-cyclodextrin. **JÉSSICA FREIRE DA SILVA FIGUEIREDO**. Advisor: D Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho Master's qualification. Post-grad program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center. Department of Pharmacy, UFPI, 2017.

ABSTRACT

Lippia origanoides H.B.K is a species widely used in folk medicine in the treatment of gastrointestinal, respiratory problems, as well as a natural antiseptic. In addition, it also has analgesic, anti-inflammatory, antifungal and antiparasitic properties. Previous studies indicate that the essential oil extracted from its aerial parts, whose major constituents are the carvacrol and thymol isomers, shows promising antileishmania activity. Leishmaniasis is endemic diseases caused by 20 species of protozoa, pathogenic to man, of the genus Leishmania, affect more than 12 million people around the world, each year two million new cases are registered and 350 million people meet in an area of risk. The lack of effective treatment has encouraged the community of researchers to seek new therapeutic alternatives. The traditional treatment of leishmaniasis, since 1940, has been the basis of pentavalent antimonies composed of sodium stibogluconate and meglumine antimoniate. However, the disadvantages are the route of administration (parenteral), long-term therapy, in addition to side effects, the increasing absence of therapeutic response is another problem to be faced. It is known that essential oils are promising sources of new chemical entities with applicability in the industry, highlighting cosmetics, pharmaceuticals and food, have as characteristics volatility and instability when exposed to oxygen, light and heat. These characteristics can be improved by forming the inclusion complex with cyclodextrin polymers.Thus, the present study consists of obtaining, physico-chemical characterization and evaluation of the antileishmania effect of *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) essential oil of inclusion complexes and its major components in β-cyclodextrin (β-CD). In the first chapter, a technological survey was conducted on the use of natural products in the treatment of leishmaniasis. The second chapter deals with the physico-chemical characterization and characterization of complexes. These were prepared by dispersion of OEL, thymol and carvacrol in hydroalcoholic solution and subjected to the spray drying process, thus obtaining a particulate material that was compared to the physical mixtures with β-cyclodextrin. The chemical constituents of the essential oil were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/ MS) and the complexes were characterized by X-ray diffraction (XRD), and absorption spectrophotometry in the infrared region with the Forrier transform (FTIR). The GC / MS analysis revealed that thymol (30.55%), carvacrol (20.28%) and p-cymene (11.68%) were the major constituents of OELO. The efficiency of complexation (EC) was determined by gas chromatography, with EC values for Thyroid of 81.9% and Carvacrol of 78.1%. In the third chapter, the antileishmania activity of the complexes on promastigotes and amastigotes of Leishmania amazonensis was evaluated. IC formation significantly reduced cytotoxicity on sheep macrophages and erythrocytes. In addition, the compounds tested had an immunomodulatory effect with increased induction of nitric oxide, phagocytic capacity and lysosomal volume in macrophages. The results of this work show the potential use of OELO and its major constituents thymol and carvacrol in IC as a therapeutic alternative for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: *Lippia*, monoterpenes, β-cyclodextrin, leishmaniasis, cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses parasitárias que fazem parte do grupo das doenças tropicais consideradas negligenciadas, com elevado índice de morbidade e mortalidade. São causadas por 20 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* que se estabelecem em células do sistema fagocítico mononuclear, sendo transmitidas por flebotomíneos. O parasita possui duas formas distintas no seu ciclo evolutivo: uma forma presente no inseto vetor, a promastigota, e outra que está presente no hospedeiro vertebrado parasitando células do sistema fagocítico mononuclear, a amastigota, sendo esta última o alvo dos tratamentos convencionais existentes atualmente. As formas clínicas podem ser classificadas em leishmanioses tegumentar e visceral, e as manifestações clínicas vão desde lesões cutânea e muco-cutânea a lesões que podem causar destruição das mucosas do baço, fígado e retículo endotelial (TORRES-SANTOS et al.,1999; CARVALHO et al., 2001; REITHINGER et al., 2007; WHO, 2016).

Essas zoonoses estão presentes em mais de 70 países, com 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. O Brasil integra o grupo de seis países onde ocorrem mais de 90% dos casos de leishmanioses viscerais (LV) no mundo, também estando entre os dez países que em conjunto representam 70 a 75% da incidência de leishmaniose cutânea (LC), segundo estimativa global (WHO, 2016). De acordo com os dados da OMS 0,2 a 0,4 milhões de casos e 0,7 a 1,2 milhões de casos de LV e LC, respectivamente, ocorrem a cada ano. Os tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis apresentam efeitos colaterais, como toxicidades cardíaca, hepática, pancreática, renal, além de contribuírem para a resistência do parasita, o que vem sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas (KEDZIERSKI et al., 2009; NEVES et al., 2011).

Nesse contexto, as plantas medicinais representam uma fonte importante de compostos bioativos, os quais podem ser protótipos de novos fármacos antiparasitárias. Dentre os compostos obtidos a partir de plantas medicinais, podem ser destacados os óleos essenciais (OEs), que são misturas complexas de compostos voláteis, líquidos e geralmente odoríferos. Apresentam como características a volatilidade e a instabilidade quando expostos ao oxigênio, luz e calor. Em sua composição há predominância de terpenos e fenilpropanóides (SIMÕES, et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais apresentam um largo espectro de atividades biológicas tais como: antiviral, fungicida, inseticida, antimicrobiana, entre outros, sendo utilizados através dos

séculos no tratamento de diversas patologias (PISSERI et al., 2008). Essas atividades são atribuídas aos monoterpenos (AMARAL et al., 2007; SILVA et al., 2014).

Lippia origanoides Humboldt, Bonpland e Kunth (HBK), família Verbenaceae, é um arbusto aromático que chega a atingir até 3 m de altura, nativa da América Central (México, Guatemala e Cuba), norte da América do Sul, especialmente na região amazônica (Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia) e Antilhas (STASHENKO et al, 2010). Estudos anteriores relatam a ação do óleo essencial obtido de suas partes aéreas contra formas promastigotas de *L. chagasi*. Tais resultados são atribuídos a seus constituintes majoritários, os isômeros monoterpenos timol e carvacrol, os principais responsáveis por suas atividades farmacológicas (ABENA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; ESCOBAR et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; FARIAS-JUNIOR, et al, 2012; RONDON et al., 2012; BORGES et al., 2012).

Como demonstrado na literatura, as plantas e os seus derivados são considerados muito importantes para o desenvolvimento da ciência. Os óleos essenciais, aos quais são ricamente encontrados em diversas famílias, conhecidas como plantas aromáticas, representam uma fonte para descoberta de novas entidades químicas com resultados farmacológicos promissores, necessitando de pesquisas na área tecnológica para aumentar sua estabilidade quando incorporados num artefato farmacêutico e ainda um incremento de melhoria na sua hidrossolubidade (BILIA et al, 2014; SANTOS et al, 2015).

Os fármacos de maneira geral, raramente são administrados em sua forma livre, necessitam ser incorporados a formulações farmacêuticas a fim de adequar ao efeito desejado. Os excipientes farmacêuticos possuem funções variadas dentro da formulação, atuando como diluentes, veículos, agentes de estabilidade, conservantes, emulsificantes, dentre outras. (AULTON; TAYLOR, 2016).

As ciclodextrinas (CDs) são excipientes farmacêuticos, oligossacarídeos cíclicos, com alto número de hidroxilas, o que lhes confere uma boa solubilidade em água. São conhecidas por permitirem a encapsulação molecular de biomoléculas com características hidrofóbicas, como os óleos essenciais, formando assim os chamados complexos de inclusão, melhorando a solubilidade e a estabilidade (ASTRAY et al., 2009). Essa encapsulação pode evitar a exposição a condições indesejáveis de temperatura, umidade luz e oxidação (SZENTE; SZEJTLI, 2004). Portanto, a complexação do óleo de *L. origanoides* poderia ser uma alternativa viável para evitar sua degradação, e melhorar sua atividade antileishmania (OLIVEIRA, 2002; SANTOS, 1998).

Este trabalho se propôs a microencapsular o óleo essencial em complexos de inclusão, e avaliar sua atividade antileismania *in vitro*, contribuindo para o possível desenvolvimento de uma futura e segura alternativa terapêutica para o tratamento das leishmanioses.

O presente trabalho está dividido em introdução, referencial teórico e seguido de três capítulos. A revisão da literatura aborda as leishmanioses dentro do contexto das doenças negligenciadas, as plantas medicinais, os óleos essenciais, Lippia *origanoides* H.B.K., e ciclodextrinas objetos de estudos deste trabalho. O capítulo 1 é composto do artigo intitulado **"PRODUTOS NATURAIS PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA".** O capítulo 2 é composto pelo artigo **"OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Lippia origanoides H.B.K* E SEUS MAJORITÁRIOS EM BETACICLODEXTRINA".** O capítulo 3 é composto pelo artigo **"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) E DE SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS EM COMPLEXO DE INCLUSÃO COM BETACICLODEXTRINAS."**

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K e dos complexos de inclusão entre óleo essencial e β-ciclodextrina, bem como realizar sua a caracterização físico-química.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Obter o óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) e identificar seus principais constituintes;
- ✓ Preparar complexos de inclusão entre OELO e β-ciclodextrina, timol e β-ciclodextrina, carvacrol e β-ciclodextrina através de secagem por *spray drying*;
- ✓ Obter a eficiência de complexação dos complexos por CG-EM;
- ✓ Caracterizar os complexos de inclusão através de técnicas analíticas como: infravermelho e difração de raios-X;
- ✓ Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* do OELO, timol e carvacrol e seus complexos de inclusão em formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis;*
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do OELO, timol, carvacrol e seus complexos de inclusão sobre macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos de carneiro;
- ✓ Avaliar a atividade do OELO, timol, carvacrol e seus complexos de inclusão sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis;*
- ✓ Investigar a atividade do OELO, timol, carvacrol e seus complexos de inclusão sobre parâmetros de ativação de macrófagos, como a atividade lisossomal, e de indução da síntese de óxido nítrico.

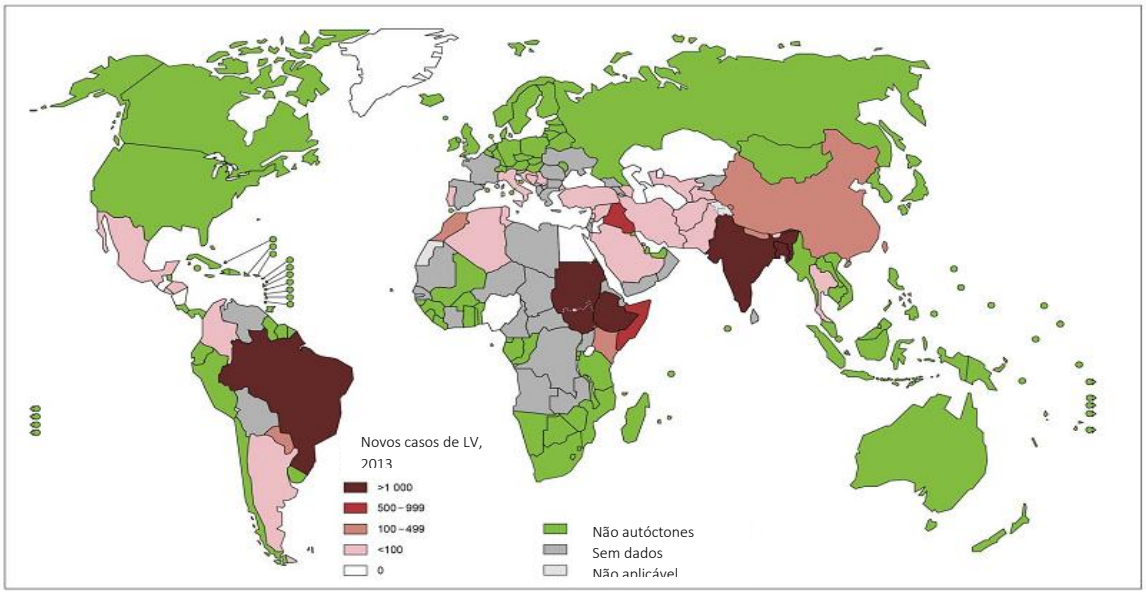
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças, com variadas manifestações clínicas, causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania* que afetam principalmente comunidades pobres na África, Ásia e América Latina, e está associada a desnutrição, deslocamento da população, precárias condições de moradia e saneamento, sistema imunológico deficiente e baixas condições sócio-econômicas. A doença apresenta quatro formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (também conhecida como calazar); dérmica pós-calazar; cutânea; mucocutânea. Enquanto a leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral é a doença mais grave e pode ser fatal se não tratada (DUTARI; LOIAZA, 2014; CARDOSO, et al, 2014; WHO, 2016).

Essas doenças afetam cerca de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo e outras 200 milhões estão sob risco, principalmente no Brasil e outros países tropicais. De acordo com os dados disponíveis até 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 90% dos casos globais de leishmaniose visceral (LV) ocorreram em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão, e 70% dos casos de leishmanioses cutâneas (LC) ocorreram em dez países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irão, Peru, Sudão e República Árabe da Síria. Endêmicas em mais de 98 países e territórios com uma ocorrência anual de novos casos de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV e de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LC em todo o mundo. (WHO, 2016).

Figura 1 - Distribuição de novos casos de LV no mundo no ano de 2013.



FONTE: Adaptado de WHO (2016).

Segundo dados do Ministério da Saúde, registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre 2010 e 2015 ocorreram 20.453 casos confirmados de leishmaniose visceral no Brasil, destes 1195 ocorreram no Piauí. Já sobre os casos de leishmaniose tegumentar, ocorreram e 124.840 casos no Brasil, sendo 652 casos no Piauí (BRASIL, 2017a, 2017b).

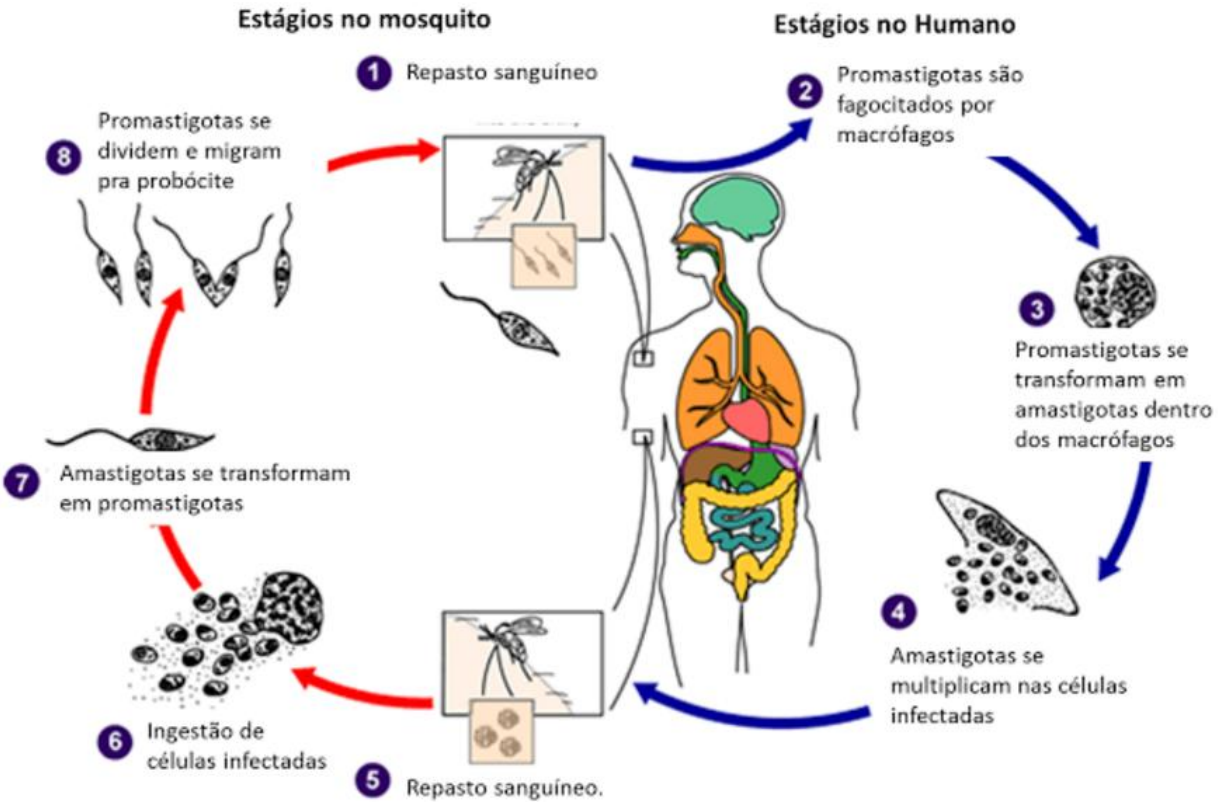
As mudanças ambientais, devastação de florestas, crescimento populacional, e migração de pessoas não-imunes para áreas endêmicas estão diretamente relacionadas a expansão das leishmanioses e o aumento acentuado da prevalência, contribuindo de forma potencial para expansão da extensão geográfica do vetor, aumentando assim a transmissão de leishmanioses em áreas anteriormente não afetadas. Nas regiões endêmicas, as circunstâncias socioeconômicas expõem facilmente a população local ao vetor, favorecendo o desenvolvimento e propagação da doença (PATZ, et al., 2000; DAUMERIE e SAVIOLI, 2010).

Os agentes etiológicos das leishmanioses pertencem à ordem Kinetoplastida, e família Trypanosomatidae. A infecção humana é causada por cerca de 21 de 30 espécies de *Leishmania* . Estes incluem o complexo *L. donovani* com 2 espécies (*L. donovani, L. infantum* [também conhecido como *L. chagasi* no Novo Mundo]); o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana, L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropica; L. major; L. aethiopica*; e o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis, L. (V.) panamensis e L. (V.) peruviana*). As diferentes espécies são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análise isoenzimática, métodos moleculares ou anticorpos monoclonais (CARDOSO, et al, 2014; CDC, 2016).

Como pode ser observado na Figura 2, o ciclo biológico de *Leishmania spp*. apresenta estágios nos hospedeiros vertebrados e nos insetos vetores e se inicia quando o hospedeiro vertebrado é infectado com as formas promastigotas através da inoculação pelas fêmeas dos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (1). Uma vez no organismo hospedeiro, os parasitas são interiorizados (fagocitados) por células do sistema mononuclear fagocítico, especialmente os macrófagos(2). A forma promastigota, no interior da célula se transforma em amastigota, e inicia o processo de sucessivas multiplicações(3). Posteriormente a célula hospedeira é rompida e as amastigotas resultantes das multiplicações(4), são liberadas, podendo ser interiorizadas por outras células fagocíticas mononucleares. Os insetos vetores sadios podem ser infectados durante o repasto sanguíneo(5) em um ser humano infectado ou em animais infectados, ocorrendo a ingestão (6) de amastigotas (sangue, na linfa interstícial, células fagocíticas). No trato digestivo do inseto, as amastigotas se convertem em

promastigotas procíclicos (6) se dividem por fissão binária e migram (já como promastigotas metacíclicos, ou seja, infectantes) para a probóscide do inseto (8) e podem ser transmitidos para os hospedeiros vertebrados através de sua picada, reiniciando o ciclo (NEVES, 2004).

Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania sp.*



FONTE: Adaptado de CDC (2016).

3.2 Diagnósticos das Leishmanioses

O diagnóstico laboratorial baseia-se em visualizar parasitas nos tecidos, em sorologia e cultura de células. Os exames moleculares utilizam a reação em cadeia da polimerase, muito utilizado para fins de pesquisa, no entanto é pouco utilizada na rotina de laboratórios para diagnóstico. Sendo uma opção útil de diagnostico, pois é capaz de identificar o gênero do agente etiológico a partir do material clínico obtido para a realização dos testes parasitológicos convencionais (MURRAY et al. 2005; BRASIL, 2013).

Outros métodos de diagnósticos importantes são os imunológicos, os quais utilizam a eletroforese de enzimas e anticorpos monoclonais, usados também na identificação da espécie infectante. Entre os métodos imunológicos, o teste de intradermorreação de Montenegro é o

mais utilizado no Brasil, sendo fundamentado na visualização da resposta celular. (BRASIL, 2013).

3.3 Tratamento das Leishmanioses

O tratamento atual é baseado em quimioterapia com antimoniais pentavalentes que foram recomendados para o tratamento da leishmaniose por mais de 70 anos e é considerado insuficiente, tendo em vista a falta de inovação tecnológica de alternativas terapêuticas antileishmanias. Os antimônios pentavalentes, compostos por estibogluconato de sódio (Pentostan®) e Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) representam a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses desde 1940, limitando-se a via de administração de uso parenteral que, é invasiva, além de ser uma terapia de longa duração e apresentar uma alta toxicidade. (SUNDAR; SINGH; SING, 2014).

Os efeitos adversos dos antimoniais estão relacionados principalmente as toxicidades cardíaca, hepática, pancreática, renal e do sistema músculo-esquelético. A cardiotoxicidade traduz-se, principalmente, por distúrbios da repolarização ventricular, essas alterações são dose e tempo dependentes. As reações relacionadas ao aparelho gastrintestinal são frequentes e incluem náuseas, anorexia e dor abdominal (NEVES et al. 2011; BRASIL,2014).

A falta de monitorização e controle do uso das terapias existentes tem conduzindo ao aumento da resistência a essa classe de medicamentos e, em algumas áreas endêmicas, seu uso já é limitado devido à falta de eficácia. O grupo de drogas de segunda linha usadas no tratamento da leishmaniose incluem diamidinas (pentamidina) e anfotericina B, mas estas drogas também são tóxicas e apresentam efeitos colaterais graves, como anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia, alterações cardíacas e hipotensão (PHAM; LOISEAU; BARRAT, 2013; NEVES et al. 2011; BRASIL,2014)

A ausência crescente de resposta terapêutica, alto custo e a falta de eficácia dos tratamentos tradicionais evidencia a necessidade de novas alternativas terapêuticas. A busca por novas entidades químicas que possam contribuir neste cenário, tem sido desafiadora para os pesquisadores (PHAM; LOISEAU; BARRAT, 2013; KEDZIERSKI et al, 2009).

A inserção de novas ferramentas terapêuticas se faz necessária, considerando o alto custo dos antimoniais, medicamentos importados; tratamentos por longos períodos e por via de administração parenteral, o que muitas vezes requer a internação do paciente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB et al., 2006).

3.4 Plantas medicinais e sua utilização

As plantas representam um celeiro para a busca de novas entidades químicas. A imensa flora e as diversidades dos aspectos culturais são fatores que mais influenciam para o amplo espectro de utilização e aplicação (CALIXTO, 2003). Os estudos entnobotânicos evidenciam o acúmulo secular de conhecimentos empíricos, de uso dos vegetais, por diversos grupos étnicos e ressalta a sua importância para o êxito dos objetivos de uma pesquisa para obtenção de novas entidades terapêuticas (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Os produtos das transformações químicas executadas pelo metabolismo secundário dos seres vivos, tais como compostos terpênicos, alcalóides, glicosídios e outros derivados naturais, têm sido objetos de estudo ao longo de muitos anos (PETROVSKA, 2012; MATOS, 1998). A diversidade de constituintes, oriundos do metabolismo secundário dos vegetais os tornam uma das maiores e mais ricas fontes naturais de novos compostos com inúmeras propriedades farmacológicas. As principais vantagens das moléculas de produtos naturais estão relacionadas com a especificidade nas suas atividades biológicas e a capacidade de se ligar a receptores biológicos (CALIXTO, 2003; VILLAS BOAS e GADELHAS, 2007). Dessa forma, pode-se considerar essas moléculas como promissoras para serem utilizadas na terapêutica das mais diversas enfermidades (BADKE et al., 2012).

O Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta. Esta abundante variedade de vida – que se traduz em mais de 20% do número total de espécies da terra – eleva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países megadiversos (ou de maior biodiversidade). Esse imenso potencial brasileiro tem sido negligenciado no sentido de se obter vantagens competitivas em novos produtos e patentes em relação a outros países do mundo, considerando que 30% de todas as drogas disponíveis para a terapêutica são derivadas de produto naturais (plantas, animais e microorganismos) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016; BASSO et al., 2005; VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007).

3.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são produtos naturais, ricamente distribuídas no reino vegetal, de ampla utilização, empregados em abordagens terapêuticas, frequentemente na aromaterapia e são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (EDRIS, 2007).

São misturas complexas de compostos voláteis, líquidos e geralmente odoríferos. São solúveis em solventes apolares e possuem solubilidade limitada em água; evaporam rapidamente quando expostos ao ar em temperatura ambiente, por isso são chamados de

essências, óleos voláteis ou éteros**.** Podem conter um elevado número de constituintes em diferentes concentrações como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas (SIMÕES et al., 1999, BAKKALI, et al., 2008). Há predominância de duas ou três substâncias (20-70%) e traços dos outros componentes. Esse grupo principal é caracterizado por substâncias de baixo peso molecular, com predominância de: terpenos (monoterpenos) e compostos aromáticos (fenilpropanóides). A composição dos OE pode sofrer influência de determinados fatores, como, origem botânica, ciclo vegetativo, fatores da natureza e método de obtenção (SIMÕES et al., 2007).

Os OE podem ser obtidos de diversas partes das plantas por meio de destilação, utilizando-se as técnicas de extração por arraste a vapor d'água, hidrodestilação, prensação de pericarpos (frutos cítricos), extração com solventes orgânicos, enfloração ou extração por CO_2 supercrítico. Geralmente quando recentemente extraídos, apresentam-se incolores ou amarelados (SIMÕES, et al., 2007; BAKKALI, et al., 2008).

Devido aos seus efeitos biológicos, os óleos essenciais têm atraído grande interesse para fins farmacêuticos e também agrícolas, como por exemplo na busca de bioinseticidas (MARANGONI; MOURA, GARCIA, 2012). No entanto, os óleos essenciais são susceptíveis à degradação devido a vários fatores, como temperatura, oxidação, luz, evaporação e umidade (BASER; BUCHBAUER, 2010). Portanto, polímeros de revestimento, preferencialmente biodegradáveis, têm sido empregadas, a fim de preservar as propriedades químicas de óleos essenciais com potenciais aplicações biológicas (DONSÌ et al., 2011).

A atividade leishmanicida foi estudada em alguns óleos essenciais extraído de plantas, tais como *Chenopodium ambrosioides, Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides, Piper angustifolium*, *Tetradenia riparia*, *Syzygium cumini, Artemisia sieberi* (MEDEIROS, 2011; MONZOTE et al, 2014; BOSQUIROLI et al, 2015; CARDOSO et al, 2015; RODRIGUES et al. 2015, TABARI et al., 2016). O *Chenopodium ambrosioides* foi testado contra *Leishmania amazonensis* e apresentou ação leishmanicida em diferentes vias de administração (MONZOTE et al., 2007, 2009 e 2014; PATRÍCIO et al., 2008).

3.6 Monoterpenos: timol e carvacrol

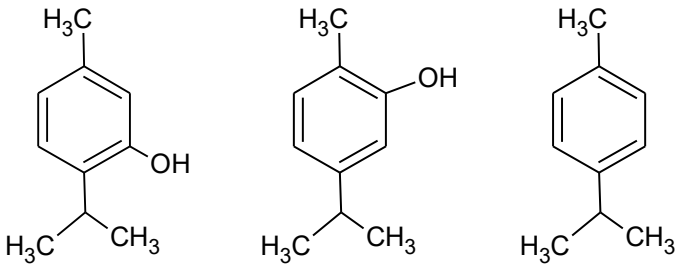
Os terpenóides constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados pelo número de carbonos, o qual é resultado do número de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sequisterpenos (C15), que

cada vez são mais estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (DUBEY et al., 2003).

Além da complexidade em compostos voláteis, o mesmo óleo essencial pode, ainda, apresentar esses compostos nas suas diferentes formas de isômeros óticos, geométricos e posicionais com funções físicas e químicas muito semelhantes (CUNHA et al., 2009). Exemplo disso são os compostos, timol e carvacrol, encontrados no óleo essencial de *Lippia origanoides* H.BK.

O timol, 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol, e o carvacrol, 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, são monoterpenos isômeros encontrados em diversas plantas aromáticas (orégano, tomilho, manjerona) sendo biossintetizados a partir do γ-terpineno e do ρ-cimeno (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015) Ambos possuem fórmulas moleculares iguais a $C_{10}H_{14}O$ e pesos moleculares de 150,22 g/mol. Suas estruturas são muito semelhantes, variando apenas a posição do grupo hidroxila no anel fenólico, como pode ser observado na Figura 3. Em temperatura ambiente, o carvacrol apresenta-se na forma líquida cuja solubilidade em água é de 830 ± 10 ppm, e o timol encontra-se na forma de cristais (HOLLAND et al., 2014; NOSTRO; PAPALIA, 2012; JOCA, 2012; LAMBERT et al., 2001).

Figura 3 - Estrutura molecular do timol, do carvacrol e p-cimeno.



Timol **Carvacrol** **p-cimeno**

FONTE: Autoria própria (2016).

3.7 Gênero Lippia

A família Verbenaceae reúne cerca de 175 gêneros e 2800 espécies, com ampla distribuição em zonas tropicais e temperadas (BRANDÃO et al., 2007; JUDD et al., 1999). Alguns dos seus gêneros vêm se destacando por seus usos medicinais, como *Lantana*, *Stachytarpheta* e, notadamente, o gênero *Lippia* que possui cerca de 200 espécies. O Brasil, um dos maiores centros de diversidade, possui 70-75% das espécies conhecidas (PASCUAL et al., 2001; VICCINI et al., 2006).

Lippia origanoides Humboldt, Bonpland e Kunth (HBK) é um arbusto aromático conhecido como "salva-do-Marajó", nativo da América Central e do norte oeste da América do Sul. No Piauí é conhecida como "alecrim-do-campo" (Figura 4). O termo "origanoides" é atribuído a partir do aroma semelhante ao orégano, e esta espécie é usada como condimento e na medicina popular, no tratamento de problemas gastrointestinais, respiratórias, inflamatórios, bem como um anti-séptico natural. Além disso também posssui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antifúngicas, antimaláricas e antigiárdia (VICUÑA et al., 2011; PASCUAL, et al 2001; FIGUEIREDO, et al. 2014; BARRETO et al, 2014).

Figura 4 - *Lippia origanoides* H.B.K. no campo.



Fonte: CARVALHO (2011).

Muitas vezes as plantas aromáticas apresentam quimiótipos, isto é, dentro da mesma espécie existem variações genéticas que resultam na produção de diferentes produtos. Para além do grande número de compostos, a presença de quimiótipos dentro da mesma espécie vai influenciar as ações biológicas dos óleos essenciais (CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012). Como exemplo disso, estudos já mostraram que a *L. origanoides* apresenta variação significativa na composição fitoquímica de seus óleos essenciais de acordo com os principais constituintes identificados. Ela é representada por três tipos químicos já descritos: dois quimiotipos cujos principais compostos são carvacrol e timol, respectivamente, e um raro quimiotipo caracterizado pela ausência ou conteúdo muito baixo destes compostos (VICUÑA;

STASHENKO, FUENTES, 2010; SANTOS et al., 2004; ROJAS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

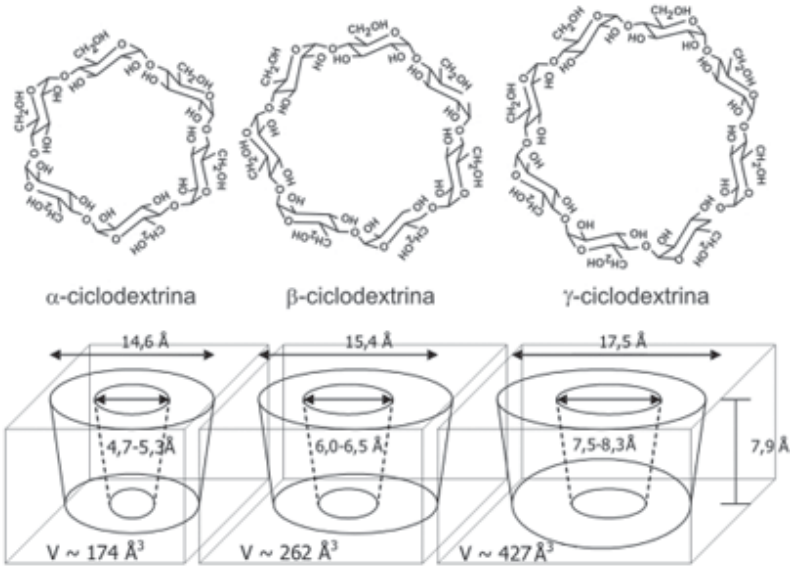
De maneira geral, são poucos os compostos naturais de interesse farmacêutico que apresentam propriedades físico-químicas intrinsecamente adequadas para atravessar as barreiras biológicas, atingir o local de ação e desenvolver a resposta terapêutica. Devendo, portanto ser considerado que as propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos fármacos e dos excipientes interferem no perfil de biodisponibilidade dos medicamentos (KWAN et al., 2001). Em face disto, artefatos tecnológicos, físicos ou químicos são usados para aperfeiçoar a biodisponibilidades dos fármacos, interferindo na solubilidade dos mesmos nas barreiras biológicas, facilitando sua passagem e consequentemente aperfeiçoando a resposta terapêutica (YORK, 2005).

O confinamento de fármaco em sistemas de transportes e direcionamento, como os complexos de inclusões, lipossomas, conjugações com moléculas de baixo peso molecular ou polimérico, são algumas estratégias adotadas que permitam contornar limitações como solubilidade, instabilidade química e direcionamento ao órgão alvo (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007; ARUN RASHEED; ASHOK KUMAR; SRAVANTHI, 2008).

3.8 Ciclodextrinas e complexos de inclusão

As ciclodextrinas (CDs) são hidratos de carbono cíclicos derivados de amido. Os CDs podem conter seis, sete e oito unidade de glucopiranose e são referidos como α, β e γ-CD, respectivamente (Figura 5). São excipientes farmacêuticos compostos de unidades de D-glicopiranose, que formam uma estrutura macromolecular tronco-cônica, em forma de copo de cerca de 1 nm de altura. A disposição espacial e orientação dos grupos hidroxilas para o exterior conferem a esta estrutura propriedades físico-químicas singulares. São capazes de se solubilizarem em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular moléculas lipofílicas no interior de sua cavidade hidrofóbica, formando assim os chamados complexos de inclusão, alterando-lhes a solubilidade, aumentando a estabilidade e, em alguns casos, melhorando a biodisponibilidade (MARQUES, 2010; LOFTSSON; BREWSTER, 2012; ASTRAY et al., 2009).

Figura 5 - Estruturas das ciclodextrinas (α, β e γ).



Fonte: VENTURINI, et al. (2008)

Estes agentes de encapsulação podem formar nano complexos de inclusão com os óleos essenciais, de modo a melhorar as suas características, tal como transformação de compostos líquidos em forma cristalina; mascarar odores e sabores de alguns compostos desagradáveis; melhorando a estabilidade física e/ou química; e estabilizar compostos voláteis, reduzindo ou eliminando perdas por evaporação. (MARQUES, 2010). Dentre elas destaca-se a utilização da βCD, a qual possui uma cavidade capaz de hospedar moléculas de massa molecular entre 200 e 800 g/mol, faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse (WANG et al., 2011).

A capacidade das CDs para estabelecer interações específicas - encapsulamento molecular - com vários tipos de moléculas ocorre através da formação de uma ligação não covalente, quer na fase sólida ou em solução aquosa (MARQUES, 2010). A principal força motriz que favorece essa encapsulação consiste na substituição das moléculas de água que possuem elevada entalpia por moléculas hóspedes de menor entalpia. Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, fatores que contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado. Interações eletrostáticas de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão (LYRA et al., 2010).

As propriedades físico-químicas dos fármacos e das CDs isoladamente são diferentes daquelas apresentadas quando estão complexados; a molécula hóspede experimenta mudanças

nas propriedades físico-químicas quando é incorporada à cavidade da ciclodextrina, por isso é importante a caracterização do material obtido a fim de confirmar a formação do complexo e determinar suas propriedades (SINGH et at., 2010).

Os sistemas farmacêuticos sólidos contendo fármaco e CD são estruturas heterogêneas que podem estar constituídas pelos seus componentes individuais não complexados, e/ou por diferentes tipos de associações entre eles, como na forma de complexos de inclusão de diferentes estequiometrias e níveis de inclusão ou como agregados com variável estado cristalino ou amorfo. Por esta razão, a eficiência de complexação (relação entre fármaco livre e complexado) destes sistemas é completamente dependente do processo de preparação. Os métodos mais comumente utilizados na obtenção de complexos sólidos são: mistura física, malaxagem, liofilização, coprecipitação, fluidificação supercrítica e atomização, sendo este um dos métodos mais empregados para produzir complexos de inclusão a partir de uma solução (VENTURINI et al., 2008; CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

As técnicas de obtenção utilizadas interferem na eficiência da complexação, que pode ser avaliada através dos diferentes métodos de caracterização, incluindo espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia de absorção UV-visível, dispersão rotatória óptica e dicroísmo, fluorescência, espectroscopia no infravermelho/ FT-IR,análise térmica, calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), cromatografia gasosa associada a espectro de massas (CG-MS), difração de raios-X, determinação de água e isoterma de adsorção. Essas técnicas devem ser utilizadas em conjunto para uma melhor caracterização do complexo de inclusão (LIMA; ALVES; SANTANA, 2012; MARQUES, 2010).

3.9 Caracterização dos complexos de inclusão

3.9.1 Infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho (IV) é uma metodologia analítica que pode ser utilizada para a avaliação da ocorrência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido, mediante comparação das bandas da molécula hóspede e do carreador, com a mistura física e o complexo (CORTI et al., 2007; MACEDO, 2010).

É um método indispensável para a caracterização de compostos orgânicos, pois permite detectar grupos funcionais, cuja presença pode ser difícil através de outros métodos. Quando se forma o complexo, pequenos deslocamentos das bandas das ciclodextrinas poderão mascarar a do hospede, se este último estiver presente em pequenas quantidades. No entanto,

se o hospede apresentar grupos funcionais característicos, como no caso do grupo carbonila, a banda será significativamente encoberta e algumas vezes pode ser deslocada após complexação por ciclodextrina (SZEJTLI, 1988).

As bandas do espectro muitas vezes mudam apenas ligeiramente quando há formação do complexo e, se a fração das moléculas hóspedes encapsuladas é inferior a 25%, bandas que poderiam ser atribuídas à parte incluída são facilmente mascaradas pelas bandas do espectro da CD (SINGH et al., 2010).

3.9.2 Difração de Raios-X (DRX)

Através do método de análise por DRX, podem ser detectados compostos de inclusão cristalinos, devido os padrões de difração dos complexos obtidos serem notoriamente diferentes dos obtidos a partir dos componentes individuais. É uma técnica bastante empregada devido sua simplicidade e rapidez. O uso desta técnica se baseia na comparação dos difratogramas das substâncias puras e do complexo. Diferenças nas amostras tratadas, como surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, constituem indícios de formação de complexos (SZEJTLI, 1998; CORTI et al., 2007; CAO; GUO, PING, 2005).

REFERÊNCIAS

ABENA, A.A. et al. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, p.231-236, 2003.

AMARAL, J. F. et al. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biol Pharm Bull**. v. 30, n.7, p.1217-1220, 2007.

ARUN RASHEED; ASHOK KUMAR, C. K.; SRAVANTHI, V. V. N. S. S. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. **Sci Pharm**. v. 76 p. 567–598, 2008.

ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids,** v. 23, n.7, p. 1631–1640, 2009.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K.M.G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4. ed. Elsevier, 2016.

BADKE, M.R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v.21, n.2, p.363-370, 2012.

BAKKALI, F. et l. Biological effects of essential oils-a review. **Food Chem Toxicol**. v.46, n. 2, p.446-475, 2008.

BARRETO, H.M. et al. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by *Lippia origanoides* H.B.K. in Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. **BioMed Research International**, v.2014, p.1-7, 2014.

BASER, K.H.C., BUCHBAUER, G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications.** CRC Press: Boca Raton, FL, 2010.

BASSO, L.A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475-506, 2005.

BORGES, A.R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exp. Parasitol**. v. 132, p.123-128, 2012.
BOSQUIROLI, L. S.S. A. et al. *In vitro* anti-Leishmania infantum activity of essential oil from *Piper angustifolium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 25.p. 124–128,2015
BRANDÃO, A.D.et al. Cytogenetic characterization of Lippia alba and Lantana camara (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**, v.120, p.317-321, 2007.
BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015.** Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>. Acesso: 10 Fev 2017a.
BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015.** Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>. Acesso: 10 Fev 2017b.
BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral .1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.
BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2007. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos)
BILIA, A.R. et al. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** v. 2014, 651593, 2014.
CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Dev Ind Pharm**. v.31, n.8, p.747-756, 2005.
CARDOSO, E.A. et al. Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**. v. 3, 2014.
CARDOSO, B. M. et al. Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.110,n.8, p.1024-1034, 2015.
CARVALHO, M.G.F.M. **Desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas a partir de óleos essências de *Lippia sidoides* Cham. e *Lippia origanoides* H.B.K para tratamento de leishmaniose.** 111f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste em Biotecnologia (RENORBIO). Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2011.
CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease— review. **Fitoterapia,** v.72, n.6, p.599–618, 2001.
CDC. Center of Disease Control. Disponível em: http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html. Acesso em: 12 Nov. 2016.
CORTI, G. et al. Physycalchemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl-β-cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 45, p. 480-486, 2007.
CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**. v. 19, n. 1, p.111-126, 2006.
CUNHA, A. P. et al. Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais). In: Cunha, A.P. (ed.) **Farmacognosia e Fitoquímica.** 2 ed. Lisboa Fundação Gulbenkian, 2009.
CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R., NOGUEIRA, M. T. **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais –Composição e Aplicações.** Editora: Fundação Calouste Gulbenkian, 2012.

CUNHA-FILHO, M.; SÁ-BARRETO, L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DAUMERIE, D.; SAVIOLI, L. Working to overcome the global inpact of neglected tropical diseases: First WHO reporto n neglected tropical diseases. Updated 2011. WHO Geneva. 2010. p.184.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation ofessential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT Food Sci.Technol**. v. 44, p. 1908–1914, 2011.

DUBEY, V.S. et al. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **J. Biosci.,** v. 28, p. 637–646, 2003.

DUTARI, L.C.; LOIAZA, J. R. American Cutaneous Leshmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthropophilic Lutzomyia sand fly species. **Parasit Vectors**. v. 7, p.218, 2014.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian Lippia spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p.184-190, 2010.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ Health Perspect**. v. 109, n.1, p. 69-75, 2001.

FARIAS-JUNIOR, P. A. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from Lippia sidoides Cham. **Biology Research**, v. 45, p. 399-402, 2012.

FIGUEIREDO, G.M. et al. Anti-inflammatory effect of Lippia origanoides. **Planta Med,** v. 80, 2014.

HOLLAND, R. D et al. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. **Rapid Commun Mass Spectrom.** v.28, n.23, p.2617-2626, 2014.

JOCA, H. C. Carvacrol reduz a excitabilidade neural pela inibição dos canais para sódio dependente de voltagem / Humberto Cavalcante Joca. – 2012. 74f.: il. color., enc. ; 30 cm. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2012.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Curr Med Chem**. v.16, n. 15, p.599-614, 2009.

KFOURY, M. et al. Determination of formation constants and structural characterization of cyclodextrin inclusion complexes with two phenolic isomers: carvacrol and thymol**. Beilstein J. Org. Chem.** v.12, p.29–42, 2016.

KWAN, P. et al. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacol. Therapeut**. v. 90, n. 1, p. 21-34, 2001.

LAMBERT, R. J. W. et al. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essencial oil, thymol and carvacrol**. J. Applied Microbiol**., v.91, p.453-462, 2001.

LIMA, J.R.; ALVES, L.D.S.; SANTANA, D.P. Complexos de inclusão como estratégia para veiculação de óleos essenciais. **Rev. Bras. Farm.** v. 93, n.4, p.397-402, 2012.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. **Food Chem. Toxicol**. v. 81, p. 9–27, 2015.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019-3032, 2012.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int J Pharm**. v. 329, n.1-2, p.1-11, 2007.
LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármacociclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.31, n.2, p. 117-124, 2010.
MACEDO, L. F. O. **Preparação e Caracterização de complexo de inclusão entre trimetoprim e 2-Hidroxipropil-Gama-Ciclodextrina**. Dissertação - Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. 2010.
MARANGONI, C.; MOURA, N. F.; GARCIA, F. R. M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos **Revista de Ciências Ambientais.** v.6, n.2, p. 95-112, 2012.
MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, **Flavour Fragr. J.** v. 25, p.313–326, 2010.
MATOS, J.F.A. 1998. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 141p.
MEDEIROS, M. G. F. et al. In vitro antileishmanial activity and citotoxicity of essencial oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasatology Internacional.** v. 60, n.3, p.237-241, 2011.
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade brasileira.** Disponível em: http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira. Acesso em: 20 Nov. 2016.
MONZOTE, L. et al. Effect of Oral Treatment with the Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* against Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c Mice, Caused by *Leishmania amazonensis*. **Forschende Komplementarmedizin**, v. 16, n. 5, p. 334-338, 2009.
MONZOTE, L.; et al. In vitro activity of an essential oil against Leishmania donovani. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 11, p. 1055-1058, 2007.
MONZOTE, L. et al. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine**,v. 21, n. 8-9, p.1048-52, 2014.
MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet,** v. 366, n. 29, p. 1561–77, 2005.
NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
NEVES, L.O.; et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por Leishmania guyanensis. **An Bras Dermatol**. v. 86, n. 6 , p.1092-101, 2011.
NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. Recent Pat. **Antiinfect. Drug Discov**., v. 7, p.28-35, 2012.
OLIVEIRA, V.C.S. Atividade dos óleos essenciais de plantas medicinais contra *Leishmania chagasi*. 68 p. Dissertação de mestrado em Bioquímica pela UFPE, 2002.
OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoide*s HBK. **Food Chem**. v. 101, n.1, p.236-240, 2007.
OLIVEIRA, V.C.S. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**. v. 104, n. 5, p.1053-1059, 2008.
PASCUAL, M.E. et al. Lippia: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.
PATRÍCIO, F.J. et al. Efficacy of the intralesional treatment with Chenopodium ambrosioides in the murine infection by Leishmania amazonensis. **J Ethnophar**, v. 115, p. 313–319, 2008.
PATZ, J.A. et al. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **Int J Parasitol**, v. 30, p.1395-1405, 2000.
PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants usage. **Pharmacognosy Reviews**. v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.
PISSERI, F. et al. Essential oils in medicine: principles of therapy. **Parasitologia**. v.50, p.89-91, 2008.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**. v.7, p.581-596, 2007.
RODRIGUES, K.A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **J Ethnopharmacol.** v. 160, p. 32-40, 2015.
ROJAS, J. J. et al. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* **The official journal of the International Society for Complementary Medicine Research.** v.6, p.2, 2006.
RONDON, F. C. M. et al. In vitro efficacy of Coriandrum sativum, Lippia sidoides and Copaifera reticulata against Leishmania chagasi. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012.
SANTOS, F.J.B. et al. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K**. J. Essent. Oil Res**. v. 16, p. 504-506, 2004.
SANTOS, P. L. et al. Preparation, Characterization, and Pharmacological Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) Leaf Essential Oil of *β*-Cyclodextrin Inclusion Complexes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** v. 2015, p. 1-12, 2015.
SILVA, R. O. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 3, p. 184-192, 2014.
SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1104p.
SIMÕES, C.M.O. et al. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópoles: editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 1999.
SINGH, R. et al. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.2, n. 3, p. 171-183, 2010.
STASHENKO, E.E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **J Sep Sci**, v. 33, p. 93-103, 2010.
SZEJTLI, J. Cyclodextrin inclusion complexes. **Cyclodextrin Technology**, p. 79, 1988.
SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical reviews,** v. 98, n. 5, p. 1743-1754, 1998.
SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**. v. 15, p.137–142, 2004.
TABARI, M. A. et al. Antileashmanial activity of *Artemisia sieberi* essential oil against Leishmania infantum *in vitro*. **Advanced Herbal Medicine**, v.2, n.2, p. 40-46, 2016.
TORRES-SANTOS, E.C. et. al. Selective effect of 2',6'- dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonesis***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 43, p. 1234-1241, 1999.
VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quimica Nova,** v. 28, n.3, 2005.
VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.
VICCINI, L.F et al. Chromosome numbers in the genus Lippia (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**. v.256, p.171-178, 2006.
VICUÑA, G.C.; STASCHENKO, E.E.; FUENTES, J.L. Chemical composition of the Lippia origanoides essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v.81, p.343-9, 2010.
VILLAS BOAS, G. K.; GADELHAS, C. A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cad. Saúde Pública** v.23 n.6, 2007.

WANG, J. et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil-b-cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v.127, p.1680-1685, 2011.

WHO. **Epidemiological situation.** Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> . Consulta em 22 Nov 2016.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M. E., eds. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.1, p.17-28.

CAPÍTULO I

PRODUTOS NATURAIS PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

Jéssica Freire da Silva Figueiredo, Kayo Alves Figueiredo, Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho

Artigo publicado pela Revista Cubana de Farmácia v. 50, n.2, 2016 (Qualis B4)

RESUMO

Introdução: a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, atingindo populações de baixa renda, sobretudo em países em desenvolvimento. Estima-se que 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente por leishmaniose. Devido à grande dificuldade de encontrar fármacos adequados, mais eficazes e menos tóxicos, para o tratamento dessa enfermidade, diferentes produtos naturais vêm sendo estudados na busca de novos agentes terapêuticos. **Objetivo**: realizar uma busca nos últimos 10 anos e apresentar um panorama do atual desenvolvimento científico e tecnológico relacionado ao uso de produtos naturais como alternativas terapêuticas no tratamento da leishmaniose. **Métodos**: a prospecção tecnológica foi realizada com base na busca de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e nos pedidos de patentes depositados em 4 bases de patentes (WIPO, UPSTO, EPO e INPI), utilizando os descritores "Leishmaniose"/"Leishmaniasis" e "Produto(s) natural(is)"/"Natural product(s)", bem como a associação entre eles. **Resultados**: utilizando a associação dos dois descritores, na pesquisa na BVS foram selecionados 48 artigos, e somente uma patente no INPI, a qual não se enquadrou nos critérios. Por isso, considerou-se as 65 patentes encontradas somente pelos descritores " Leishmaniose(s)/Leishmaniasis ", as quais foram submetidas a uma leitura exploratória de seus resumos, e classificadas quanto a finalidade da invenção. Observou-se que somente 8 delas se tratavam de formulações farmacêuticas contendo extratos de produtos naturais. A maior parte das patentes abordavam métodos diagnósticos e inovações com fármacos sintéticos. Os artigos e patentes também foram classificados de acordo com o ano da publicação. **Conclusão:** essa prospecção serve como instrumento de incentivo ao crescimento das pesquisas envolvendo produtos naturais na busca de alternativas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para a leishmaniose.

Palavras-chave: Produtos naturais, Leishmaniose, Prospecção tecnológica, Patentes

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causada por mais de 20 espécies do protozoário do gênero *Leishmania*, que se estabelecem em células do sistema fagocítico mononuclear (REITHINGER et al., 2007). São transmitidas ao homem pela picada de fêmeas infectadas de flebotomíneos (mais de 90 espécies). Estima-se que 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente (WHO, 2016). De acordo com a Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) essas doenças estão presentes em 98 países, e 350 milhões de pessoas se encontram em risco de infecção (DNDi, 2015). As formas clínicas podem ser classificadas em leishmaniose tegumentar e visceral. Seus sintomas vão desde desfiguração cutânea e muco-cutânea a lesões que podem causar destruição das mucosas do baço, fígado e retículo endotelial (TORRES-SANTOS et al., 1999; CARVALHO; FERREIRA, 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose uma das principais doenças negligenciadas no mundo, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2016). Portanto, o interesse comercial na pesquisa de novos compostos farmacêuticos para estas doenças é limitado porque o seu tratamento tem de ser acessível para garantir o acesso da população afetada (TROUILLER et al., 2002; RENSLO; MCKERROW, 2006; CRUZ et al., 2009).

Os produtos naturais representam uma fonte importante de novas moléculas bioativas com potencial farmacêutico. Através deles, pode-se compreender eventos complexos relacionados à biologia celular e molecular, possibilitando o desenvolvimento de medicamentos mais seletivos e eficazes contra várias patologias. Das inúmeras vantagens desse segmento de pesquisa, podemos citar, grande diversidade de estruturas químicas, economia de tempo e recursos (SHU, 1998; CALIXTO, 2003; MINDELL, 2009).

Diante disso, existem muitos estudos envolvendo a aplicação de espécies vegetais no tratamento das doenças negligenciadas (BORGES et al., 2012) e alguns produtos naturais vem demonstrando atividade contra alguns protozoários (CARNEIRO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015). Devido à dificuldade de encontrar medicamentos adequados para o tratamento das leishmanioses, com maior eficiência e menor toxicidade, diferentes produtos naturais vêm sendo estudados. Na busca de alternativas terapêuticas, espécies vegetais foram investigadas quanto à sua ação leishmanicida (RUIZ et al., 2004; MESQUITA et al., 2005; MEDEIROS, M. G. F. et al., 2011) na expectativa de que seus metabólitos secundários possuam atividade antiparasitária e ausência ou baixa citotoxicidade. Substâncias isoladas não só derivadas de

vegetais, mas também provenientes de outros seres vivos (TEMPONE et al., 2007; AWAAD et al., 2014) , são objetos de estudo para o tratamento destas doenças (CORO et al., 2005; ROLDOS et al., 2008).

A presente prospecção teve por objetivo realizar uma busca nos últimos 10 anos e apresentar um panorama do atual desenvolvimento científico e tecnológico relacionado ao uso de produtos naturais como alternativas terapêuticas no tratamento da leishmaniose, com busca de patentes em bases nacionais e internacionais, além da busca da produção científica voltada para esse tema.

2 METODOLOGIA

A prospecção tecnológica foi realizada com base na busca de pedidos de patentes depositados em diversas regiões do mundo e na pesquisa de artigos na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). As bases de patentes utilizadas foram: European Patent Office (EPO); World Intellectual Property Organization (WIPO); base americana - United States Patent and Trademark Office (USPTO); base brasileira - Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). A pesquisa foi realizada em 15 de julho de 2015. Foram utilizados os seguintes descritores: "Leishmaniose(s)"/ "Leishmaniasis" e "Produto(s) natural(is)" /"Natural products", bem como a associação entre eles. Foi realizada a leitura exploratória dos títulos e dos resumos e foram selecionados os pedidos de patentes e artigos nos últimos 10 anos que contemplassem resultados de desenvolvimento tecnológico de produtos naturais para o tratamento da leishmaniose.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No âmbito de sistemas de Ciência, Tecnologia e Inovação (CT&I), os exercícios de prospecção tecnológica têm sido considerados fundamentais para promover a criação da capacidade de organizar sistemas de inovação que respondam aos interesses da sociedade, identificando quais são as oportunidades e necessidades mais relevantes para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) no futuro (SANTOS et al., 2004).

A busca na base de patentes nacional (INPI) encontrou 65 patentes quando se utilizou o descritor "leishmaniose" (também em inglês e plural), e somente uma patente foi encontrada utilizando-se a combinação com o descritor "produtos naturais" (**Tabela 1**). Tal invenção trata-se de uma metodologia *in vitro* para prospecção pré-clínica de produtos naturais no tratamento de doenças negligenciadas, o qual não se enquadra nos critérios desse trabalho. As outras patentes descrevem métodos diagnósticos (REED; GOTO, 2007), vacinas (SALES et

al., 2010), formulações inovadoras de drogas já conhecidas com o objetivo de otimizar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, como os lipossomas (RIBEIRO et al., 2013; REZA et al., 2015), nanopartículas (MAINARDES et al., 2011), complexos de inclusão (CABALLERO; SOUZA, 2005) e até mesmo novas moléculas obtidas por química medicinal (BARREIRO et al., 2012; COOKE et al., 2012; OLADAPO et al., 2014).

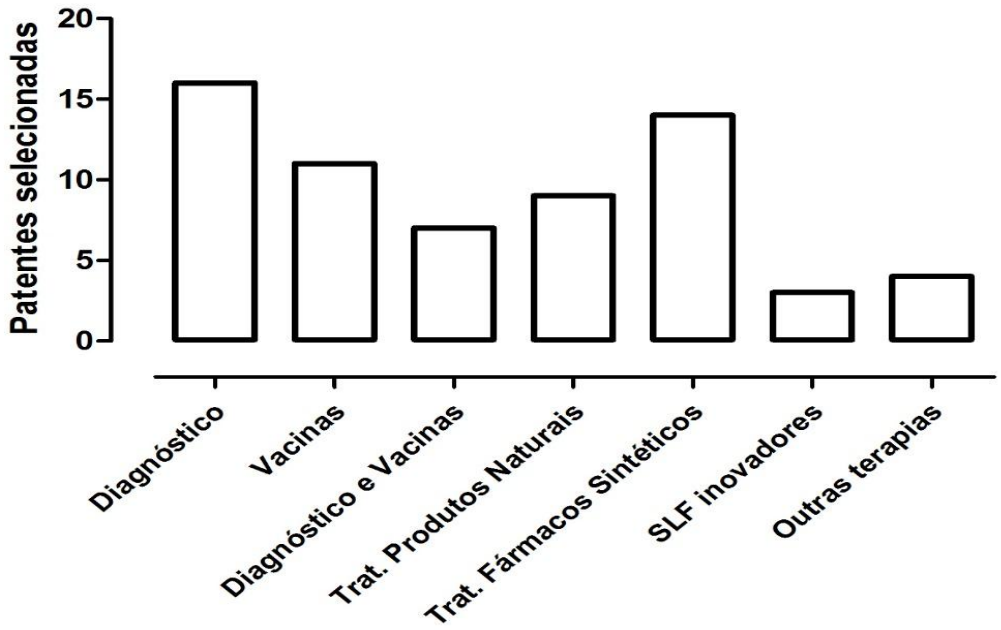
Tabela 1 - Resultado da pesquisa nas bases de patentes e na BVS no período 2005- 2015.

DESCRITORES	BVS	WIPO	USPTO	EPO	INPI
"Leishmaniose"	8.500	206	0	19	53
"Leishmanioses"	341	46	2	3	12
"Leishmaniasis"	10.645	389	54	20	0
"Produto natural"	23	35	0	0	19
"Produtos naturais"	8.985	55	0	0	43
"Natural product"	6.425	2.664	81	37	0
"Natural products"	18.469	2.768	85	29	0
"Produto natural" AND "leishmaniose"	0	0	0	0	0
"Produto natural" AND "leishmanioses"	0	0	0	0	0
"Produtos naturais" AND "leishmaniose"	33	0	0	0	0
"Produtos naturais" AND "leishmanioses"	2	0	0	0	1
"Natural product" AND "leishmaniasis"	12	0	0	0	0
"Natural products" AND "leishmaniasis"	72	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria (2015).

Foi realizada uma leitura exploratória dos resumos das 65 patentes do INPI. Estas foram classificadas quanto a finalidade da invenção (**Fig. 1**). Observou-se que os métodos diagnósticos (24,6%) e inovações tecnológicas com fármacos sintéticos (21,5% - novas moléculas ou drogas já conhecidas) vem sendo os principais objetos de pesquisa e proteção patentária por parte das universidades e institutos de pesquisa no Brasil e no Mundo. A frequência de classificação das outras patentes foi a seguinte: vacinas (16,9%), tratamento com produtos naturais (13,8%), diagnóstico e vacinas (10,8%), sistemas de liberação de fármacos inovadores (4,6%), outras terapias (7,7%).

Figura 1 - Classificação das patentes selecionadas na base do INPI de acordo com a finalidade da invenção.

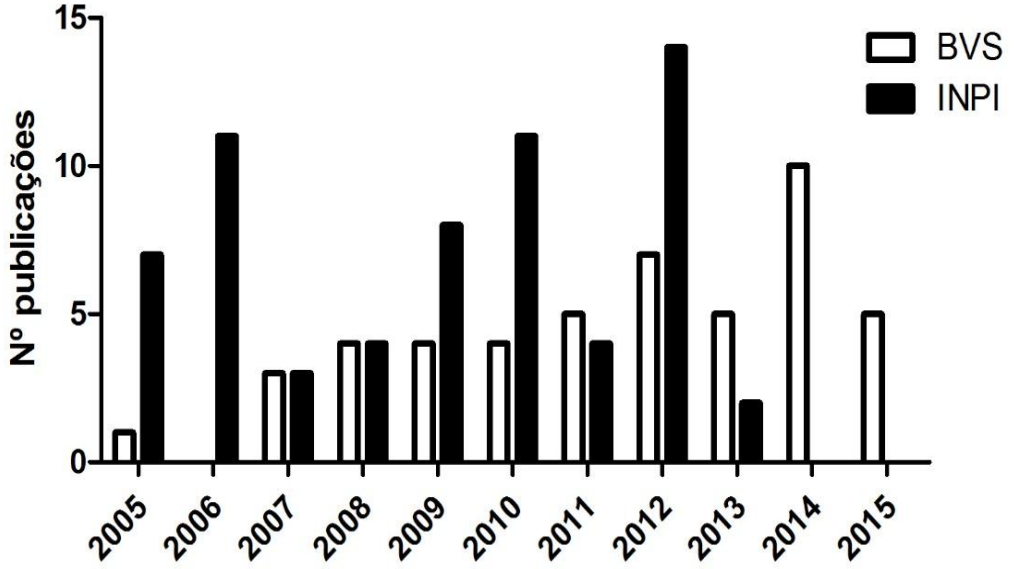


Legenda: SLF- Sistema de Liberação de Fármacos.Fonte: Autoria própria (2015).

Com a utilização do descritor "produtos naturais" em várias combinações, conforme **Tabela 1**, não foi possível encontrar depósitos de patentes, tendo em vista que o referido descritor não se encontrou presente nos seus resumos e/ou títulos. Nesse caso, ao se analisar as patentes encontradas, outros descritores estão relacionados a produtos naturais, como: formulação/composição farmacêutica, extratos vegetais, óleo essencial, frações, entre outros.

Observando ainda a **Tabela 1**, na pesquisa na BVS foram pré-selecionados 119 artigos utilizando as combinações dos descritores. Entretanto, 37 desses estavam repetidos, 24 eram de revisão, 6 se encontravam fora do tema e 3 se tratavam de teses. Assim, foram selecionados 48 artigos, que foram classificados de acordo com o ano da publicação (**Fig. 2**). Observou-se que nos últimos cinco anos a pesquisa voltada para o tratamento da leishmaniose tem aumentando consideravelmente com destaque para o ano de 2014, em que houve maior quantidade de artigos encontrados (n=10).

Figura 2 - Classificação dos artigos e das patentes selecionadas na BVS e na base do INPI de acordo com o ano, respectivamente.



Fonte: Autoria própria (2015).

Pode-se observar ainda o crescente registro de inovações relacionadas ao diagnóstico, prevenção e tratamento da leishmaniose. No entanto, entre os anos de 2013 a 2015, houve poucos registros de patentes (**Fig. 2**). Dessa forma, apesar de crescente, tanto as pesquisas experimentais quanto o registro de inovações (9 documentos no INPI nos últimos 10 anos) contendo produtos naturais para tratamento da leishmaniose ainda são muito incipientes, necessitando, assim de mais incentivo a novas pesquisas.

Em relação ao panorama mundial dos trabalhos da BVS conforme nacionalidade do autor principal do artigo, o Brasil apresentou cerca de 43% dos resultados, com 67% do continente americano (**Tabela 2**). Outros países como EUA, Cuba e Índia foram responsáveis por 9,5% cada. Apesar da leishmaniose ser endêmica em alguns países do continente africano, apenas 2,4% das pesquisas foram concentradas nesta região.

As publicações encontradas na pesquisa na BVS foram concentradas cerca de 30% em periódicos de diversos países cujo escopo inclui a pesquisa com produtos naturais, como a *Acta Toxicológica Argentina, Phytotherapy Research, Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Journal of Natural Products, Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* e *Natural Products Communications.*

Tabela 2 - Panorama mundial do resultado da pesquisa na base de patente no INPI e na BVS no período 2005 - 2015.

	ARTIGOS BVS		PATENTES INPI	
CONTINENTE	PAÍS	%	PAÍS	%
AMÉRICA	Brasil	42,9	Brasil	75,4
	EUA	9,5	EUA	7,7
	Cuba	9,5	Cuba	1,5
	Colômbia	4,8	-	-
	Total	***66,7***	***Total***	***84,6***
EUROPA	Grécia	2,4	Alemanha	3,1
	Bélgica	2,4	França	6,2
	Espanha	2,4	Espanha	3,1
	Total	***7,1***	***Total***	***12,4***
ÁSIA	Índia	9,5	Índia	3,1
	Irã	4,8	-	-
	Israel	2,4	-	-
	Cazaquistão	2,4	-	-
	Turquia	2,4	-	-
	Malásia	2,4	-	-
	Total	***23,8***	***Total***	***3,1***
ÁFRICA	Marrocos	2,4	-	-
	Total	***2,4***	***Total***	***-***

Em relação aos depósitos de patentes no INPI, o Brasil liderou novamente com 75,4%. Outros países como EUA e França apresentaram participação significativa na quantidade de patentes encontradas

. Os depósitos foram realizados tanto por laboratórios farmacêuticos como por centros de pesquisa e universidades desses países. Somente as universidades e centros de pesquisa pertencentes ao estado de Minas Gerais/Brasil foram responsáveis por aproximadamente 1/3 dos documentos.

Na **Tabela 3**, estão descritas as patentes encontradas que se baseiam no efeito de diversas formulações farmacêuticas contendo extratos de produtos naturais para o tratamento

da leishmaniose (n=8). A maior parte delas se referem a utilização de espécies vegetais (n=6), mas também foi encontrado um derivado animal (própolis) e um extrato derivado de fungo.

Tabela 3 - Resultados de algumas patentes encontradas na base do INPI utilizando o descritor "Leishmaniose(s)"/"Leishmaniasis" nos últimos 10 anos e que descrevem a utilização de produtos naturais.

PRODUTO NATURAL	DESCRIÇÃO	Nº PATENTE/ ANO
Extrato e suas frações do fungo *Agaricus blazei*	Formulações para uso tópico e oral, na forma de gel, creme, pomada, pastas, emulsões, soluções em geral, comprimidos ou e cápsulas para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral em cães e humanas.	PI1002067-5 (2010)
Extratos derivados da espécie vegetal *Strychnos pseudoquina*	Composições farmacêuticas compreendendo extratos derivados de cascas do caule da espécie vegetal *Strychnos pseudoquina,* obtidos após extração em hexano e acetato de etila. Apresentam elevada atividade leishmanicida sobre *Leishmania amazonensis*, não apresentam nenhuma citotoxicidade sobre células de mamíferos e são eficazes no tratamento de macrófagos infectados com os parasitas.	BR1020120305488 (2012)
Extrato de *Zingiber Officinalis Roscoe* e suas frações derivadas	Composições farmacêuticas compreendendo extrato aquoso de gengibre (*Zingiber Officinalis Roscoe*) e frações purificadas, apresentam elevada atividade leishmanicida sobre *Leishmania amazonensis*, não apresentam citotoxicidade sobre células de mamíferos e são eficazes no tratamento de macrófagos infectados com tal espécie do parasita.	BR1020120220164 (2012)
Óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K	Formulações farmacêuticas à base do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K., de seus complexos de inclusão de β-ciclodextrina com o óleo essencial, para uso humano e veterinário, destinados a administração pelas vias oral e tópica, com aplicações no tratamento de infecções microbianas e parasitárias, em especial as leishmanioses.	PI1105457-3 (2011)
Extrato e frações ativas das folhas de *Tephiosia cinerea*	Uso terapêutico da composição para o controle da progressão da infecção por *Leishmania* e no tratamento das lesões através da aplicação diária da referida formulação tópica. O produto revela ser uma alternativa mais segura e eficiente em relação à terapêutica atual para o tratamento da leishmaniose	PI1104710-0 (2011)

	tegumentar.	
Extrato de *Calophyllum brasiliense* e de seus princípios ativos	A formulação administrada por via intraperitoneal e tópica diminuiu os volumes das lesões decorrentes de infecção experimental por leishmaniose e reduziu o número de parasitas nos órgãos. Além disso, o extrato da *Calophyllum brasiliense* inibiu o crescimento das formas promastigotas e amastigotas. A fração hexano diminuiu o volume das lesões decorrentes da infecção experimental por leishmaniose e inibiu o crescimento das formas promastigotas e amastigotas.	PI0904042-0 (2009)
Própolis brasileira	Uso de composições a base de própolis e de seus componentes ativos (isolados ou combinados) reduziu a infecção de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis, Leishmania braziliensis, Leishmania chagasi e Leishrnania donovani*. A presente invenção revela ser uma alternativa mais econômica e eficiente em relação aos medicamentos existentes no estado da técnica no tratamento da leishmaniose.	PI0601863-7 (2006)
Xarope fitoterápico	Produto composto por extratos e ingredientes naturais extraídos da flora brasileira em proporções definidas, como extrato de embaúba, tintura de jalapa, entre outros. Aplicável ao tratamento em cães.	PI0604885-4 (2006)

Fonte: Autoria própria (2015).

Tabela 4 - Alguns artigos encontrados com produtos naturais para tratamento de leishmaniose.

PRODUTO NATURAL	DESCRIÇÃO	REFER.
Extrato do fungo *Drechslera rostrata e Eurotium tonpholium*	Compostos isolados di-2- etilhexil ftalato (1) e 1,8- di-hidroxi- 3-metoxi-6-metil-antraquinona (6) mostraram boa atividade quando comparada com a droga anti-leishmaniose Pentostam® (125 mg/kg). A atividade dos extratos e compostos (1) de *D. rostrata* e (6) de *E. tonpholium* foi obtida após 13-17 dias de tratamento, enquanto que a atividade de cura completa de Pentostam® foi obtido após 28 dias.	AWAAD et al, 2014
Extrato etanólico de *Pterodon pudescens* (PPE)	Teste *in vitro* em amastigotas de *L. amazonensis* mostrou que macrófagos infectados expostos a 150, 300, 450 e 600 µg/ml de PPE mostrou redução consistente de células infectadas em 73,2; 68,2; 60 e 30,1%, respectivamente.	ARRAIS-SILVA et al., 2014
Extratos de folhas de *Piper arboreum*	Os resultados da atividade antiparasitária indicaram uma maior atividade da fração hexânica observando a morte de 62% e 51% de células epimastigotas e de 100% e 92% de células promastigotas, respectivamente.	FIGUEREDO et al., 2014
Cavacrol e a-pineno	Foram avaliados os potenciais leishmanicida e tripanocida. O carvacrol apresentou um percentual de inibição de 38,34% e 74,12% para as formas promastigotas e epimastigotas respectivamente, na concentração de 100 µg/mL, apresentando uma citotoxicidade de 21,62%. O *a*-pineno apresentou 100% e 5,30% de inibição para as formas epimastigota e promastigota na concentração de 100 µg/mL, com citotoxicidade de 87,88%.	SOBRAL-SOUZA et al., 2014
Extratos de *Lygodium venustum*	A melhor atividade foi observada usando fração metanólica com percentagem de inibição de 63% das formas promastigotas de *L. braziliensis in vitro* a uma concentração de 500 µg/mL. As frações acetato de etila e metanol demonstraram um elevado potencial citotóxico.	MORAIS-BRAGA et al., 2013
Extrato aquoso de *Agaricus blazei Murill* (AbM)	Animais tratados com o AbM apresentaram 60% de redução na inflamação do coxim plantar em relação aos animais não tratados. Apresentaram ainda 60 e 66% de redução na carga parasitária na pata e nódulos linfáticos, respectivamente. Além disso, os parasitas não foram encontrados no baço após o 14º dia de tratamento.	VALADARES et al., 2012
Extrato etanólico de *Mentha arvensis*	O extrato etanólico apresentou 47% de inibição na concentração de 500 µg/mL contra *Leishmania braziliensis*.	SANTOS et al., 2012

Óleos essenciais de *Lippia sidoides* (LSEO)	O óleo essencial e timol mostraram atividade significativa contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com IC_{50} / 48 h de 44,38 e 19,47 ng/mL, respectivamente. Timol mostrou toxicidade contra macrófagos peritoneais e baixa seletividade contra os promastigotas quando comparado com o LSEO bruto. Nenhum efeito citotóxico foi observado em macrófagos tratados com o óleo essencial bruto. A incubação de macrófagos infectados com *L. amazonensis* com LSEO mostrou uma redução acentuada na sobrevivência amastigota dentro dos macrófagos.	MEDEIROS et al., 2011
Extrato metanólico de *Echinaster (Othilia) echinophorus*	Em testes com as formas promastigotas e amastigotas, o IC50 do extrato foi 62,9 e 37,5 µg/mL, respectivamente. O extrato também tem toxicidade moderada em macrófagos de camundongos BALB/c. O tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* com doses diárias de 100 mg/kg/dia via intraperitoneal durante 15 dias mostrou-se relativamente efetivo no controle da infecção.	PARRA et al., 2010
Secreção cutânea do Caramujo gigante africano, *Achatina fulica*	A secreção bruta apresentou CE50 de 98,37 µg/mL contra promastigotas de *L.(L.) chagasi*. Por meio de ensaios enzimáticos, foi detectada a atividade L-aminoácido oxidase (L-AAO) na secreção bruta, e também foi demonstrado que o H_2O_2 gerado por esta enzima é um dos compostos responsáveis pelo efeito anti-*Leishmania.*	TEMPONE, 2007
Óleo essencial de *Matricaria chamomilla*)	Atividade contra formas amastigotas de *L. panamensis* and *L. braziliensis* (EC_{50} de 2,87 e 10,30 µg/mL, respectivamente). Mostrou-se ser potencialmente tóxico para as células de mamíferos (CL_{50} 30,21 µg/mL), com toxicidade semelhante a exibida por anfotericina B (CL_{50} 31,39 µg/mL).	VALADARES et al., 2012

Fonte: Autoria própria (2015).

Na **Tabela 4,** selecionaram-se artigos recentes sobre algumas espécies vegetais e seus extratos e derivados que demonstraram resultados significativos quanto a inibição das formas amastigotas e promastigotas de várias espécies de *Leishmania spp*. (MEDEIROS et al., 2011; FIGUEREDO et al., 2014) (66,7% dos mesmos utilizaram metodologias com as espécies *L. amazonensis, L. donovani* e *L. brasilienses*), bem como outros produtos naturais com promissora atividade leishmanicida, como secreção cutânea de caramujo, e extratos de fungos (TEMPONE, 2007; AWAAD et al., 2014).

A maioria dos artigos encontrados se tratam de pesquisas básicas e não aplicadas, ainda se tratando de ensaios *in vitro* (75% dos trabalhos) e 25% se referem a ensaios pré-

clínicos, que precisam de continuidade para que se tornem alternativas terapêuticas mais seguras e acessíveis que os fármacos disponíveis (**Tabela 4**). Um destes trabalhos baseia-se no estudo de constituintes majoritários isolados de uma planta medicinal (SOBRAL-SOUZA et al., 2014), o que já é um avanço para os estudos de atividade antileishmania.

Analisando os resultados obtidos sobre patentes e artigos, verificou-se que a pesquisa está voltada para o desenvolvimento tecnológico de drogas já conhecidas, como por exemplo, formulações inovadoras utilizando sistemas de liberação de fármacos. Dessa forma, percebe-se um déficit de estudos científicos com produtos naturais em fases mais avançadas, como ensaios clínicos, na busca de novos agentes terapêuticos menos tóxicos, mais eficazes e acessíveis.

4 CONCLUSÃO

Essa prospecção mostrou um panorama do atual desenvolvimento científico e tecnológico sobre aplicação de produtos naturais no tratamento da leishmaniose, servindo como instrumento de incentivo ao crescimento das pesquisas na busca de alternativas terapêuticas mais seguras. Percebeu-se que a maior parte dos estudos não chegam a fase clínica, e que o número de depósitos de pedidos de patentes ainda é incipiente, não acompanhando a demanda por novos agentes leishmanicidas menos tóxicos.

REFERÊNCIAS

ARRAIS-SILVA, W.W. et al. Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of Pterodon pudescens. **Rev Bras Plantas Med.** v.16, n.3, p.561-565, 2014.

AWAAD, A.S. et al. Anti-leishmanial activities of extracts and isolated compounds from *Drechslera rostrata* and *Eurotium tonpholium*. **Phytother Res.** v.28, n.5, p.774-780, 2014.

BARREIRO, E.J.L. et al. Compostos hidrazida-N-acilidrazonas, processo de obtenção de compostos hidrazida-N-acilidrazonas, uso de compostos a partir de hidrazina-N-acilidrazonas para tratamento de leishmaniose e doença de chagas e composições farmacêuticas obtidas. Brasil patente INPI BR102012019095, 2012 Jul 31.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and citotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology.** v. 132, n. 2, p. 123–128, 2012.

CABALLERO, N.E.D.; SOUZA, A.O. (inventor). Processo de formulação do complexo de inclusão do 3-(4'-bromo-[1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-bromofenil)-n,n-dimetil-2-propen-1-amina e ß-ciclodextrina e atividade tripanossomicida, antileishimaníase e antimicobacteriana. Brasil patente PI0502172-3, 2005 Jun 13.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc Cult.** v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CARNEIRO, S.M.P. et al. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits ofAzadirachta indica(A Juss.). **Biological Research.** v. 45, n. 2, p. 111–116, 2012.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease— review. **Fitoterapia.** v. 72, n. 6, p. 599–618, 2001.
COOKE, N.G. et al. Use of inhibitors of the activity or function of pi3k. France patent WO2013088404A1, 2012 Dec 14.
CORO, J. et al. Synthesis and antiprotozoan evaluation of new alkyl linked bis(2thioxo[1,3,5]thiadiazinan3yl) carboxylic acids. **Bioorg Med Chem**. v.13, n.10, p.3413-3421, 2005.
CRUZ, A.K. et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania spp. and Plasmodium spp*.: a review. **Curr Drug Targ**. v.10, n.3, p.178–192, 2009.
DNDi. Drugs for Neglected Diseases iniciative. Leishmaniasis. Disponível em: http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl.html. Acesso: 2 jul. 2015.
FIGUEREDO, F.G. et al. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v.35, n.1, p.149-154, 2014.
MAINARDES, M. et al. Processo de obtenção de nanopartículas poliméricas contendo o fármaco anfotericina B. Brasil patente INPI PI 1107205-9, 2011 Dec 22.
MEDEIROS, M. G. F. et al. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol Int.** v. 60, n.3, p. 237-241, 2011.
MESQUITA, M.L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 100, n.7, p. 783-787, 2005.
MINDELL, D.P. Evolution in the everyday world. **Scientific American.** v.300, p. 82-89, 2009.
MORAIS-BRAGA, M.F.B. et al. Phenol composition, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activities of Lygodium venustum SW. (Lygodiaceae). **Experimental Parasitology.** v.134, n.2, p.178–182, 2013.
OLADAPO, B. et al. Methods for treating leishmaniasis. United States patent US2014336187, 2014 Nov 13.
PARRA, M.G. et al. Leishmanicidal activity of Echinaster (Othilia) echinophorus crude extract. **Rev Inst Med Trop S Paulo**. v.52, n.2, p.89-93, 2010.
REED, S.G.; GOTO, Y. (inventor). Compostos e métodos para diagnóstico e tratamento de leishmaniose. Brasil patente INPI PI0710155-4, 2007 Apr 10.
REITHINGER, R et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** v. 7, n.9, p. 581-596, 2007.
RENSLO, A.R.; MCKERROW, J.H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nat Chem Biol**. v. 2, n.12, p.701–710, 2006.
REZA, J.M. et al. Topical liposomal compositions for delivering hydrophobic drugs and methods preparing same. United States patent US2015147382, 2015 May 28.
RIBEIRO, R.R. et al. Composição farmacêutica contendo lipossomas convencionais e lipossomas de circulação prolongada para o tratamento da leishmaniose visceral. Brasil patente INPI BR1020130056014A2, 2013 Mar 08.
RÍOS, Y. K. et al. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla). **Rev Colomb Cienc Quím Farm**. v.37, n.2, p.200-211, 2008.
RODRIGUES, K.A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **J Ethnopharmacol.** v. 160, p. 32-40, 2015.
ROLDOS, V. et al. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi: In silico, *in vitro* and *in vivo* activity studies. **Eur J Med Chem.** v.43, n.9, p.1797-807, 2008.
RUIZ, P.G. et al. Actividad Leishmanicida y Tripanocida de algunas plantas reportadas como medicinales en Colombia. **Biofarbo**. v.12, n.12, p. 27-30, 2004.

SALES, S.S. et al. Uso e formulações do antígeno imunoprofilático da fração flagelar de promastigota de *Leishmania amazonensis* imunomodulada com bacilo colmett guerin (BCG) contra leishmaniose visceral canina (LVC). Brasil patente INPI PI1003830-2, 2010 Oct 21.

SANTOS, K.K.A. et al. Evaluation of the anti-Trypanosoma and anti-Leishmania activity of Mentha arvensis and Turnera ulmifolia. **Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromát**. v.11, n.2, p.147-153, 2012.

SANTOS, M. M. et al. Prospecção de tecnologias de futuro: métodos, técnicas e abordagens. In: Silva, E.M.P. et al. **Parcerias Estratégicas**. n. 19. Brasília: CGEE, 2004.

SHU,Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J Nat Prod**. v.61, n.8, p.1053-1071, 1998.

SOBRAL-SOUZA, C.E. et al. Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário in vitro do apineno e carvacrol. **Acta Toxicol Argent**. v.22, n.2, p.76-81, 2014.

TEMPONE, A.G. Cutaneous secretion from the giant African snail, Achatina fulica, as a source of Antileishmanial compounds. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v.66, n.1, p.73-77, 2007.

TORRES-SANTOS, E.C. et al. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonesis*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 43, n.5, p.1234-1241, 1999.

TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficiente market and a public-health policy failure. **The Lancet**. v.359, n.9324, p. 2188–2194, 2002.

VALADARES, D.G. et al. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of Agaricus blazei Murill against Leishmania amazonenses. **Parasitol Res**. v.111, n.4, p.1807–1816, 2012.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/. Acesso: 2 jul. 2016.

CAPÍTULO II

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Lippia origanoides H.B.K* E SEUS MAJORITÁRIOS EM BETACICLODEXTRINA

RESUMO

Lippia origanoides H.B.K, é uma espécie bastante utilizada na medicina popular no tratamento de diversas patologias. Estudos anteriores apontam que o óleo essencial extraído de suas partes aéreas é rico em timol e carvacrol. Sabe-se que os óleos essenciais apresentam como características a volatilidade e a instabilidade quando expostos ao oxigênio, luz e calor. Estas características podem ser melhoradas através da formação de complexos de inclusão (CIs) com ciclodextrinas (CDs). Foram preparados complexos de inclusão do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K (OELO), timol e carvacrol em betaciclodextrina (β-CD) por dispersão em solução hidroalcoólica e posterior secagem por atomização (*spray drying)*, obtendo assim um material particulado que foi comparado às misturas físicas com β-ciclodextrina. Através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foi realizada a identificação dos constituintes químicos do OELO e obtida a eficiência de complexação (EC) dos CIs. Os constituintes majoritários identificados do OELO foram timol (30,55%), carvacrol (20,28%) e p-cimeno (11,68 %). Os valores de EC obtidos foram 81,9 % para o CI do timol e 78,1 % para o do carvacrol.Também foram utilizados Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) e difração de raios-X(DRX) na caracterização dos CIs. De acordo com as ferramentas de caracterização utilizadas podemos inferir a formação dos complexos de inclusão (OELO/β-CD , timol/ β-CD e carvacrol / β-CD) de acordo com as diferenças nas propriedades físico-químicas observadas entre as substâncias isoladas e os complexos.

Palavras-Chave: timol, carvacrol, *Lippia origanoides* H.B.K, complexo de inclusão.

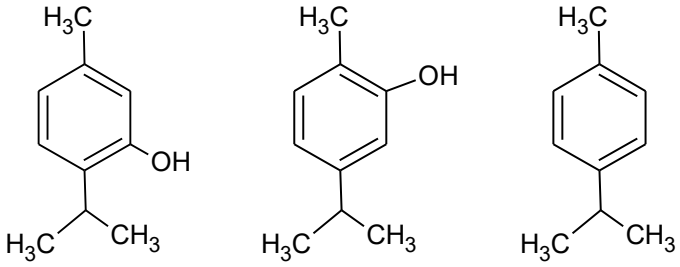
1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por plantas medicinais. São misturas complexas de compostos voláteis, líquidos e geralmente odoríferos. Apresentam como características a volatilidade e a instabilidade quando expostos ao oxigênio, luz e calor. Tem um largo espectro de atividades biológicas, tais como: antiviral, fungicida, inseticida, antimicrobiana, entre outros, sendo utilizados através dos séculos no tratamento de diversas patologias A maioria dessas atividades são atribuídas aos monoterpenos (PISSERI et al., 2008; AMARAL et al., 2007; SILVA et al., 2014).

Lippia origanoides é um é um arbusto aromático que pode atingir até 3m de altura, pertencente à família Verbenaceae, nativo das regiões semi-áridas do Brasil. Está amplamente dispersa nas regiões Norte e Nordeste, sendo popularmente conhecida como alecrim-do-campo no Estado do Piauí, e Salva-de-Marajó e Alecrim-d'Angola, no Pará e bastante utilizado em fitoterapia, no tratamento de problemas gastrointestinais, respiratórias, inflamatórios, bem como um anti-séptico natural. Esse arbusto contém um óleo essencial extremamente rico em timol, um dos principais ingredientes ativos extraídos de suas partes aéreas por arraste a vapor d'água/hidrodestilação (MATOS, 2002; OLIVEIRA et al., 2007; ANDRADE et al., 2014).

O timol, 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol, e o carvacrol, 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol, são monoterpenos isômeros encontrados em diversas plantas aromáticas sendo biossintetizados a partir do γ-terpineno e do ρ-cimeno (LLANA-RUIZ-CABELLO et al., 2015). A fórmula molecular e o peso molecular desses isômeros é $C_{10}H_{14}O$ e 150,22 g/mol, respectivamente. A diferença estrutural está na posição do grupo hidroxila no anel fenólico, como pode ser observado na Figura 2. Em temperatura ambiente, o carvacrol apresenta-se na forma líquida cuja solubilidade em água é de 830 ± 10 ppm, e o timol encontra-se na forma de cristais (LAMBERT et al., 2001; NOSTRO; PAPALIA, 2012; JOCA, 2012; HOLLAND et al., 2014).

Figura 1 - Estruturas químicas do timol, carvacrol e p-cimeno.



Timol **Carvacrol** **p-cimeno**

Fonte: Autoria própria.

Elaborar complexos de inclusão entre óleos essenciais e betaciclodextrina (β-CD) é um método bastante efetivo para proteção do complexante contra a oxidação, degradação térmica e evaporação (BHANDARI et al., 1998; WANG et al., 2011).

O agente complexante, β-CD faz parte da classe das ciclodextrinas, é formada por sete unidades de D-(+)-glicopiranose unidas por ligações α-1,4. Possui em sua estrutura grupos hidroxila primários e secundários orientados para o exterior, assim seu exterior é hidrofílico e sua cavidade interna é hidrofóbica. Essa ciclodextrina é muito utilizada, pois sua cavidade pode hospedar moléculas de massa molecular entre 200 e 800 g/mol, faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse, como por exemplo o timol e o carvacrol (FRACETO et al., 2007; MARQUES, 2010; WANG et al., 2011).

Portante, o objeto deste trabalho foi realizar a obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão do óleo essencial da *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) e seus majoritários em betaciclodextrina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e reagentes

O óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) foi obtido por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger das partes aéreas de *Lippia origanoides* H.B.K coletadas no dia 21/02/2015, no período da manhã, na cidade de José de Freitas (latitude 04º45'23" sul e longitude 42º34'32"oeste), Estado do Piauí, Brasil. A exsicata foi depositada no Graziela Barroso Herbário da Universidade Federal do Piauí, sob o número TEPB09205. O carvacrol (98%), o timol (99%), o hexano e a betaciclodextrina foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA. O álcool etílico foi adquirido da Vetec.

2.2. Análise química do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K

A análise química foi realizada utilizando uma cromatografia em fase gasosa (GC) acoplada a espectrometria de massa (MS) no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os espectros de massa foram registados num Shimadzu GC-17A / MS QP5050A - A GC / MS do sistema (modo El 70 eV, temperatura da fonte 270 ° C, massa digitalizados variaram 43-350 u). As condições de operação foram como se segue: DB-5 (J & W Scientific, 30 m x 0,25 milímetros de diâmetro interno x 0,10 milímetros de espessura de filme); hélio como gás de transporte, taxa de fluxo de 1,0 mL min-1 e com razão de separação de 1:30; a partir de 50 ° C (5 min.) a 180 ° C a 4 ° C / min e, em

seguida, a partir de 180 ° C (4 min.) a 260 ° C a 10 ° C / min, com uma retenção de 10 min a 260 ° C.

Os constituintes do óleo foram identificados por comparação dos índices de gás experimental cromatográficas de retenção (RI exp) e o padrão de espectros de massa com os padrões previamente publicada ou apresentado na biblioteca Willey. Uma solução padrão de n-alcanos (C7-C26) foi utilizado para obter os índices de retenção Kovat's (RI) EXP.

2.3. Preparo dos complexos

2.3.1. Preparo da Mistura Física (MF)

O OELO (300 mg, baseado no peso molecular dos constituintes do OELO) e a β-CD (2260 mg) foram misturados mecanicamente na razão molar de 1:1 em condições ambientes. O mesmo procedimento foi realizado para obter misturas físicas do timol e do carvacrol. Posteriormente os produtos foram armazenados em dessecador até a realização das análises.

2.3.2. Obtenção dos complexos de inclusão pelo método de secagem por *spray drying*

Quantidades equimolares de OELO e β-CD foram solubilizadas em temperatura ambiente em mistura de etanol P.A. em água destilada (1:3). As soluções foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético por 30 minutos. As soluções foram posteriormente injetadas no aparelho *spray-drying* de bancada (BUCHI B-290) com uma pressão de entrada de 0,9 Bar, temperatura de entrada de 95 °C e fluxo da amostra de 3 mL/min, no laboratório do Núcleo de Tecnologia farmacêutica da Universidade Federal do Piauí (NTF /UFPI), Teresina. Os mesmos procedimentos anteriores foram realizados para timol e carvacrol. Em seguida, os complexos foram armazenados em dessecador até a realização das análises de caracterização.

2.4. Caracterização dos complexos de inclusão

2.4.1. Análise do teor do óleo e padrões complexados e eficiência de complexação

2.4.1.1. Preparo da curva de calibração do timol e carvacrol

Pesou-se 25 mg de timol, solubilizou-se em hexano, transferiu-se em seguida para balão volumétrico de 5 mL. Foram realizadas as diluições necessárias para obter as seguintes concentrações: 50, 100, 150, 200 e 250 μL mL^{-1}. Transferiu-se as diluições para *vials* e analisou-se por CG-EM. Os procedimentos foram realizados em triplicata. O mesmo preparo foi realizado para o carvacrol.

2.4.1.2. Preparo das amostras

A análise do teor do OELO e dos padrões de carvacrol e timol presentes nos complexos de inclusão (CI) foram determinados pelo método de extração com solvente proposto por HARANGI e NÁNÁSI (1984).

Pesou-se o equivalente a 10 mg de OELO e dos padrões de carvacrol e timol presente nos CI. Transferiu-se para frasco de vidro com tampa rosqueada e solubilizou-se com 8 mL de água destilada, em seguida acrescentou-se 4 mL de n-hexano. A mistura foi aquecida em banho-maria à temperatura de 80 ± 2ºC por 15 minutos, com agitação intermitente. Em seguida, foi resfriada à temperatura ambiente. A fase n-hexânica contendo os compostos do óleo essencial e dos padrões foram recolhidas com auxílio de uma pipeta de vidro e a fase aquosa foi submetida a duas novas extrações sucessivas com n-hexano (2 x 4 mL). Os extratos combinados foram secos com sulfato de sódio anidro, diluídas com n-hexano e analisados por CG-EM.

2.4.1.3. Doseamento por cromatografia gasosa

As análises foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) utilizando equipamento SHIMADZU, modelo MDGC/GCMS 2010, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 μm). O volume injetado foi de 1 μL e a amostra foi carreada por gás hélio; velocidade de fluxo 1 $mL.min^{-1}$, modo de divisão 1/10. A temperatura do injetor e do detector foram 260 ºC e 250 ºC, respectivamente. A temperatura da coluna foi mantida inicialmente por 1 minuto a 50 ºC, seguida de uma taxa de aquecimento de 5 °C min^{-1} até a temperatura de 200 ºC, seguida de uma nova rampa de aquecimento de 10 ºC min^{-1} até 260 °C, permanecendo 5 minutos. Os espectros de massas foram obtidos na faixa de 45 a 400 m/z, utilizando uma fonte de ionização por impacto de elétrons (70 eV).

O teor foi obtido através da interpolação dos dados nas curvas de calibração obtidas. A eficiência de complexação (EC) dos padrões foi obtido através da equação 1 abaixo.

Equação 1:

$$EC = \frac{Conc.Experimental}{Conc.Teórica} \times 100$$

2.4.2. Difratograma em Raios X

A difração em raios-X foi obtida em difratômetro Shimadzu®, modelo XRD- 6000, equipado com ânodo de cobre, usando voltagem de 40 KV e corrente de 30 mA. As amostras, com exceção do OELO e do carvacrol, foram analisadas no intervalo de ângulo 2θ de 5 – 75° a uma velocidade de digitalização de 2°/min. Utilizaram-se suportes de vidro com fina camada de material em pó sem solvente. A análise foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

2.4.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de Infravermelho com transformada de *Fourrier* (IV-TF) do OELO, Timol, Carvacrol, β-CD, MF e CI foram obtidos na região do IV médio (4000 a 650 cm^{-1}) em um espectrômetro Cary 630 (Agilent), utilizando o acessório para Reflectância Total Atenuada (RTA). Aproximadamente 5 μL das amostras líquidas ou 5 mg dos sólidos foram colocados diretamente na superfície do acessório para RTA, aplicado leve pressão para promover um contato íntimo entre a amostra sólida e a superfície do cristal. Os espectros foram obtidos a partir de 64 varreduras, com uma resolução de 4 cm^{-1}. Os espectros de IV-TF foram suavizados e a linha de base foi corrigida automaticamente utilizando o *software* do espectrofotômetro. As análises foram realizadas no Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por comparação dos seus índices de retenção no CG-EM. O padrão para identificação foi obtido pelo Índice de Kovats, um índice que descreve o comportamento de retenção do composto de interesse comparativamente ao de uma mistura de hidrocarbonetos saturados de diferentes números de átomos de carbono. Este índice fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais. O IK calculado para cada composto foi comparado com valores da literatura (ALENCAR et al., 1990; ADAMS, 2007).

Pelo menos três quimiotipos diferentes já foram identificados para o OLEO dois quimiotipos cujos principais compostos são carvacrol e timol, respectivamente, e um raro quimiotipo caracterizado pela ausência ou conteúdo muito baixo destes compostos (VICUÑA;

STASHENKO; FUENTES, 2010). Como pode ser observado na Tabela 1, através de análises CG-MS foram identificados vários terpenóides na composição química do OELO, sendo o timol (30,55%), carvacrol (20,28%) e p-cimeno (11,68%) seus principais constituintes.

. **Tabela 1 -** Composição química do óleo essencial de partes aéreas de *L. origanoides* HBK.

TR(min)	Composto	IK (lit.)	IK (calc.)	Área (%)
5,660	*α*-pineno	939	931	0,70
6,065	*camphene*	953	946	0,11
7.207	mirceno	991	1991	1,61
7.682	α- felandreno	1005	1004	0,16
7,882	Careno	1011	1009	0,35
8,084	α- terpineno	1018	1015	0,21
8,378	p- cimeno	1026	1023	11,68
8,607	1,8 cineol	1033	1029	1,49
9,580	*γ*-terpineno	1054	1056	0,15
10,755	benzeno 1- isopropenil-2-nafitil	--	1087	0,27
11,121	Linalol	1098	1098	0,76
14,432	4-terpineol	1177	1176	2,76
14,990	*α*-terpineol	1189	1189	0,33
16,934	Timil-metil-eter	1232	1233	5,34
17,328	Carvacrol-metil-eter	1244	1242	0,35
19,250	Fenol-5-metil-2-(1-metileter)-timol	--	1286	0,63
19,628	Timol	1290	1294	30,55
20, 065	Carvacrol	1298	1304	20,28
22,220	Acetato de timila	1355	1356	4,53
22,804	Cicloisotirano	--	1367	0,10
23,007	Acetato carvacrol	1371	1372	0,70
23,170	*α*-copaeno	1376	1375	1,40
25,078	*trans*-cariofileno	1418	1419	6,28
25,176	*α*-bergamoteno	1436	1435	0,46
26,006	2-metoxi-4-etil-6-metilfenol	--	1442	0,37
26,510	*α*-humuleno	1454	1454	2,31
27,471	Nafitaleno	1441	1476	0,16
27,817	3-terc-butil-4-metoxifenol	--	1484	1,29
28,472	*α*- muuruleno	1499	1500	0,25
28,744	*β*-bisaboleno	1509	1508	0,44
29,418	*δ*-cadineno	1524	1524	0,96
31,859	Oxido de cariofileno	1581	1584	1,49
32,899	Oxido de humuleno	1606	1610	0,41
35,429	1,6-dimetilnaftaleno	--	1676	0,19
Total				99,231 %

Fonte: Laboratório de Geoquimica Orgânica – UFPI. 2016. IK= índice de Kovats. TR= tempo de retenção.

A complexação dos óleos essenciais com ciclodextrinas pode evitar a exposição a condições indesejáveis de temperatura e umidade, luz e oxidação, e sua consequente degradação (HEDGES, 1998; SZENTE; SZEJTLI, 2004).

De acordo com HARANGI e NÁNÁSI (1984) existe diferença de afinidade entre os componentes dos óleos essenciais à β-CD. A força da ligação é altamente influenciada pela

complementaridade entre convidado e a cavidade da CD. As moléculas com estruturas em anel aromático se encaixam melhor dentro da cavidade da β-CD, como é o caso do timol e o carvacrol (KFOURY, et al., 2016).

Os sistemas farmacêuticos sólidos contendo fármaco e CD são estruturas heterogêneas que podem estar constituídas pelos seus componentes individuais não complexados, e/ou por tipos de associações entre eles, como na forma de complexos de inclusão de diferentes estequiometrias e níveis de inclusão ou como agregados com variável estado cristalino ou amorfo. Por esta razão, a eficiência de complexação (relação entre fármaco livre e complexado) destes sistemas é completamente dependente do processo de preparação, bem como da afinidade química (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

Os métodos mais comumente utilizados na obtenção de complexos sólidos são: mistura física, malaxagem, liofilização, coprecipitação, fluidificação supercrítica e atomização, sendo este um dos métodos mais empregados para produzir complexos de inclusão a partir de uma solução (VENTURINI et al., 2008; CUNHA-FILHO, M.; SÁ-BARRETO, 2007).

O método de mistura física baseia-se na simples mistura dos componentes sem adição de água. Em geral, é um método de complexação pouco eficiente, restrito a princípios ativos líquidos (HEDGES, 1998).

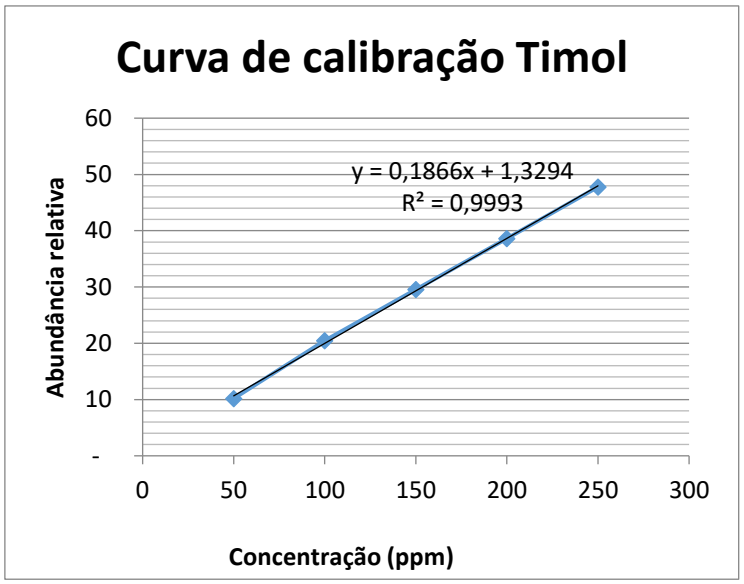
O método por atomização representa um dos métodos mais empregados para produzir complexos de inclusão a partir de uma solução. A mistura parcial do sistema e a rápida eliminação de água propiciam uma eficiência de complexação elevada. Além disso, esta técnica permite controlar o tamanho de partículas obtido em intervalos bastante estreitos (VOZONE; MARQUES, 2003). O baixo rendimento e o estresse térmico são algumas das limitações desta técnica (CUNHA-FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). O método de secagem por *spray drying* baseia-se no princípio da atomização, sendo o método escolhido para o preparo dos complexos de inclusão OELO/β-CD, carvacrol /β-CD e timol/ β-CD.

A secagem por *spray drying* envolve a atomização de uma solução, suspensão ou emulsão. O líquido são atomizados usando-se um sistema centrífugo ou de alta pressão, onde as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto (MASTERS, 1997).

No doseamento por cromatografia gasosa, primeiramente foram obtidas as curvas de calibração (Figuras 2 e 3) dos padrões utilizados (timol e carvacrol) para o doseamento dos CI. A forma mais usual de se executar a calibração de um instrumento é através da curva

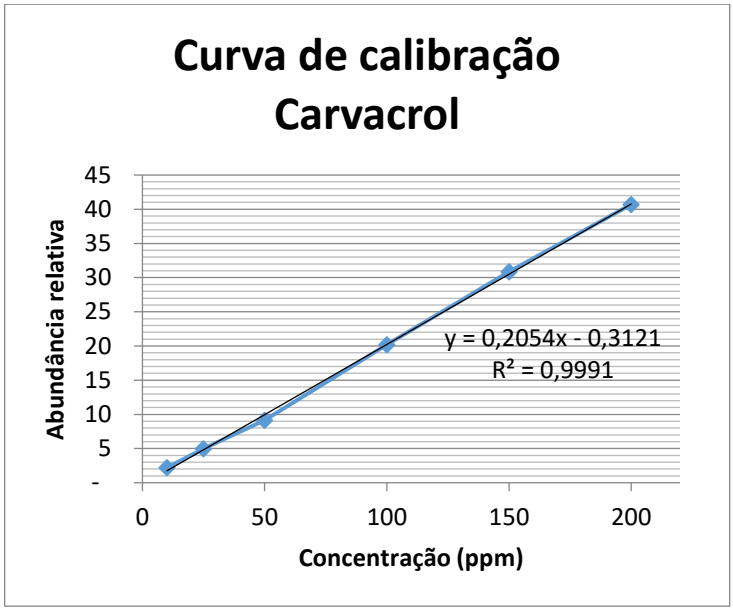
analítica (ou curva de calibração), que consiste em preparar padrões com concentrações conhecidas do analito e matriz (amostra menos o analito) o mais próximo da realidade da amostra em estudo. Na maioria das vezes, existirá uma relação linear entre concentração do analito e sinal de resposta do equipamento (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996). Segundo recomendações da RE nº 899/2003, o coeficiente de correlação (R) deve ser como mínimo igual a 0,99 (BRASIL, 2003) o que foi observado tanto na curva de calibração do timol quanto na do carvacrol.

Figura 2 - Curva de calibração do Timol.



Fonte: Laboratório de Geoquimica Orgânica – UFPI. 2016.

Figura 3 - Curva de calibração do Carvacrol.



Fonte: Laboratório de Geoquimica Orgânica – UFPI. 2016.

Tabela 2 - Teor do OELO e padrões complexados obtidos por CG/MS.

Amostra	**Teor (µg.mL^{-1})**
CI-OELO (Timol)	496,8
CI-OELO (Carvacrol)	159,1
CI-Timol	798,7
CI-Carvacrol	761,8

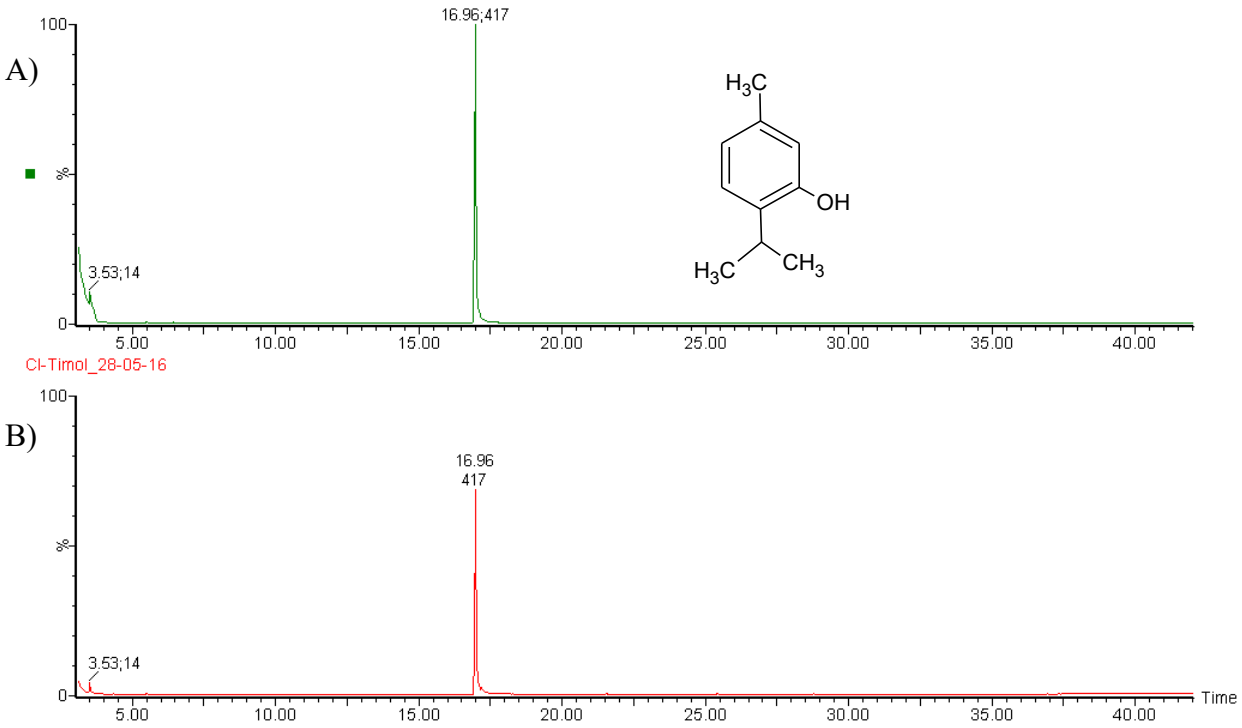
FONTE: Autoria própria. Laboratório de Geoquímica Orgânica - UFPI.

O teor de timol e carvacrol foi calculado para 100 mg de CI, conforme pode ser visto na Tabela 2. Já a eficiência de complexação foi determinada conforme a Equação 1, sendo os valores de EC para o Timol de 81,9 % e Carvacrol de 78,1 %. Para o OELO não foi possível calcular a eficiência exata de complexação, tendo em vista que em sua composição há vários constituintes, que apresentam diferentes afinidades pela cavidade da betaciclodextrina. Observou-se que para cada 10 mg de CI do OELO foi detectado 496,8 µg/ml de timol e 159 µg/ml de carvacrol**.**

Nas Figuras 4, 5 e 6 podem ser observados os cromatogramas do timol, do carvacrol e dos seus CI, os cromatogramas do timol e do carvacrol demostram que tratam-se de padrões

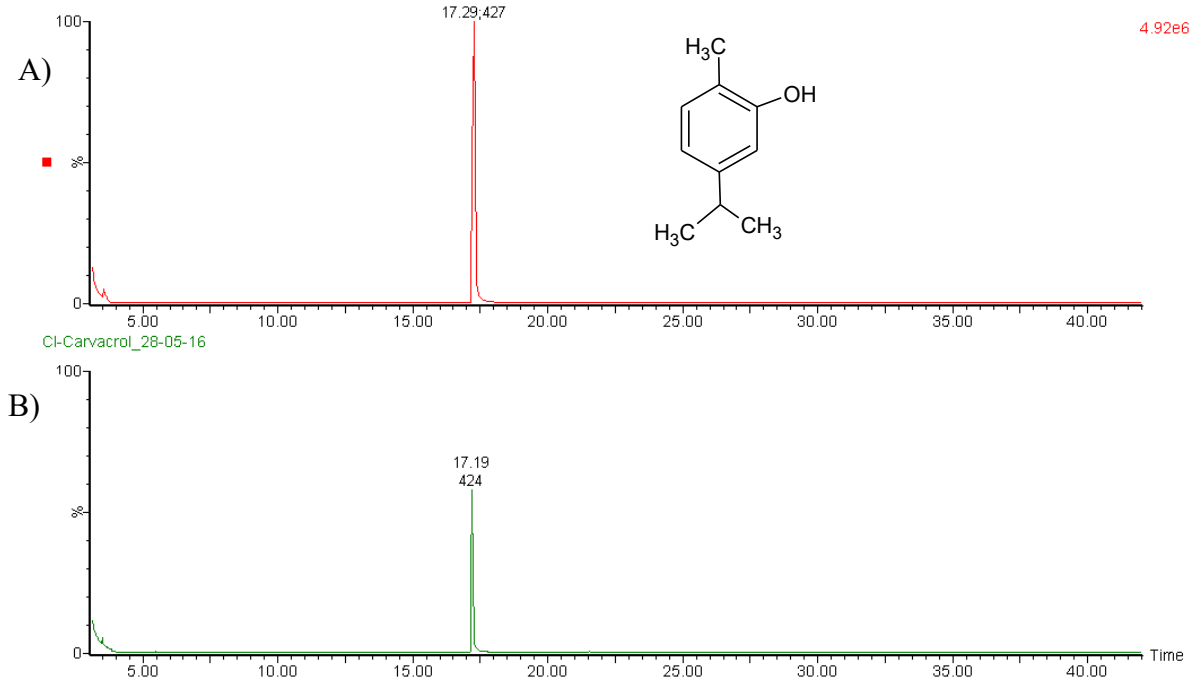
de qualidade com alto grau de pureza. O mesmo pode ser observado para os cromatogramas de seus complexos de inclusão. Já para o cromatograma do CI do OELO, nota-se a presença de vários picos que correspondem aos seus inúmeros constituintes, com destaque para o carvacrol e timol, que são os majoritários. Observa-se que as intensidades dos picos foram menores quando foram avaliados os CI, tendo em vista que a EC não foi 100%.

Figura 4 - Cromatogramas obtidos por CG/MS do marcador Timol (A) e Timol CI (B).



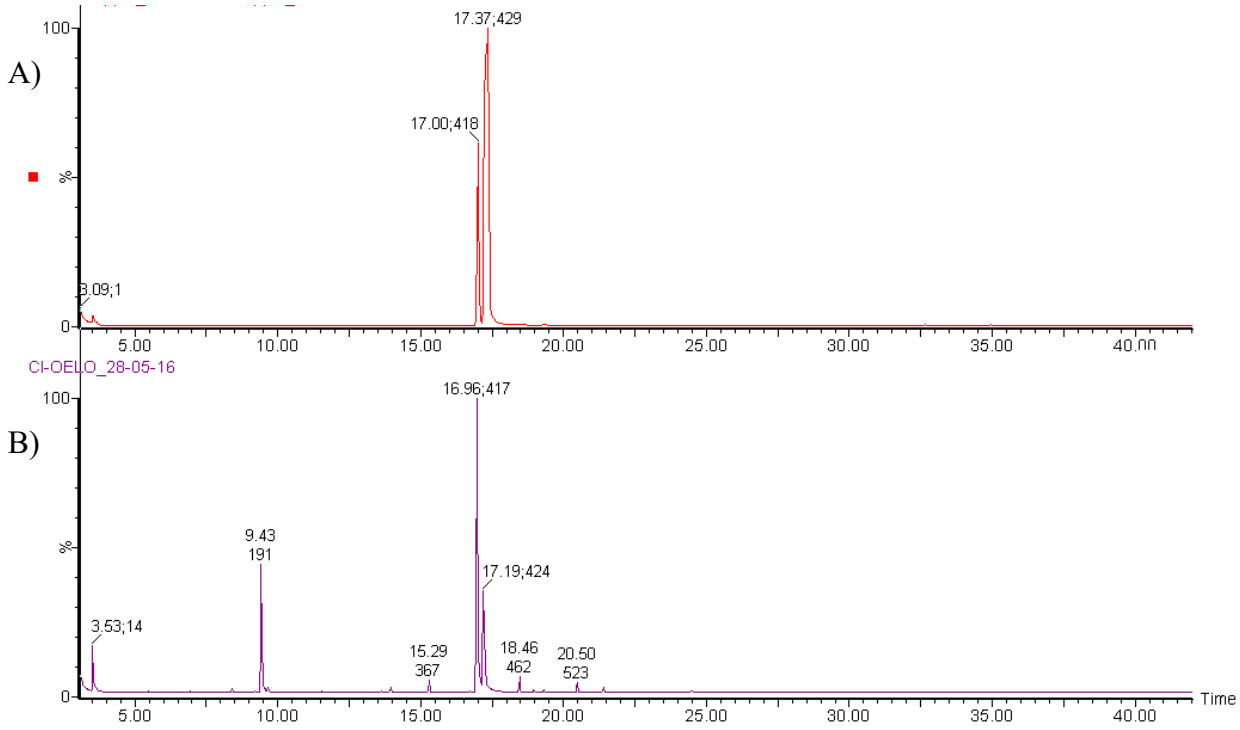
FONTE: Autoria própria. Laboratório de Geoquímica Orgânica - UFPI.

Figura 5 - Cromatogramas obtidos por CG/MS do marcador Carvacrol (A) e Carvacrol CI(B).



FONTE: Autoria própria. Laboratório de Geoquímica Orgânica - UFPI.

Figura 6 - Cromatogramas obtidos por CG/MS dos marcadores timol/carvacrol (A) e do OELO CI (B).



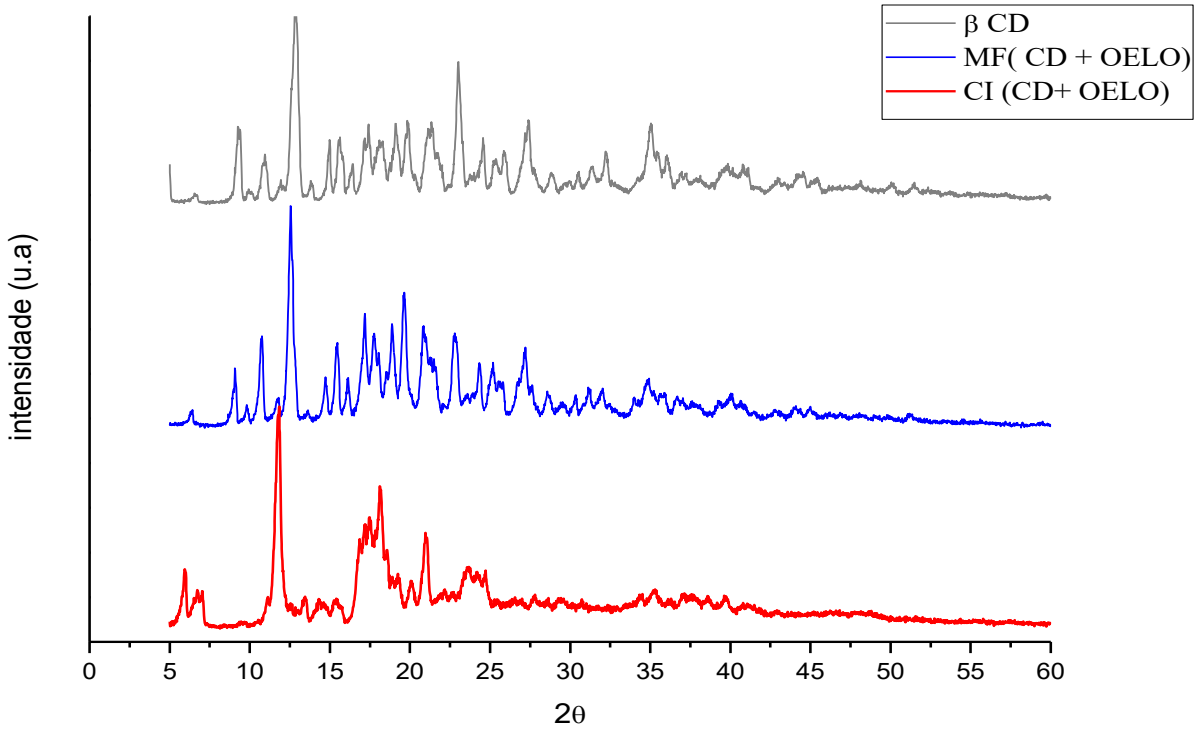
FONTE: Autoria própria. Laboratório de Geoquímica Orgânica - UFPI.

A caracterização adequada de sistemas sólidos de CD e fármaco e a avaliação da formação real de um complexo de inclusão no estado sólido requer a utilização conjunta de diferentes técnicas analíticas cujos achados devem ser examinados e avaliados juntos. O emprego combinado de várias ferramentas analíticas permitiria uma compreensão apropriada e em profundidade das interações de estado sólido hóspede-convidado e ajudaria na seleção correta da CD mais adequado para uma determinada molécula hóspede, bem como da técnica de preparação mais eficaz (MURA, 2015).

A difração de raios X determina a natureza cristalina de materiais sólidos, apresentando-se como uma técnica simples e rápida para a caracterização de complexos de inclusão. A técnica é baseada no espalhamento coerente da radiação X por estruturas organizadas (cristais), possibilitando um estudo morfológico das substâncias, sua estrutura cristalina e/ou sua fração cristalina. Uma comparação dos difratogramas do sistema tratado com o perfil difratométrico dos seus componentes separados e em mistura física (MF) é realizada. Diferenças nas amostras tratadas, como surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, constituem indícios de formação de complexos (CAO; GUO; PING, 2005; VEIGA et al., 2006).

Observa-se na Figura 7 os difratogramas da β-CD e dos complexos de inclusão do OELO obtidos por mistura física e *spray-drying*. Quanto a β-CD, os picos de alta intensidade observados nos diferentes ângulos de difração, tendo os mais acentuados em 2θ = 12,86; 23,02; 27,04 e 35,04 indicam uma estrutura cristalina. Na MF, observa-se a um padrão de difração semelhante ao da β-CD, mas com picos diferentes e com maior intensidade em 2θ = 12,54; 17,18; 19,64 e 20,84, sugerindo a existência de pequena interação entre o OELO e a β-CD. Quando ocorre a formação do CI, observa-se a alteração dos padrões de difração, com o desaparecimento destes picos e o aparecimento de novos picos nos ângulos de difração 2θ = 11,84; 18,12 e 20,96 sugerindo a formação de uma nova estrutura cristalina, reforçando os indícios da formação do complexo de inclusão. De acordo com TAKAHASHI et al., 2012, a complexação poderá ser avaliada por mudanças nos picos característicos do complexo em relação às moléculas isoladas, quando analisadas por difração de raios X.

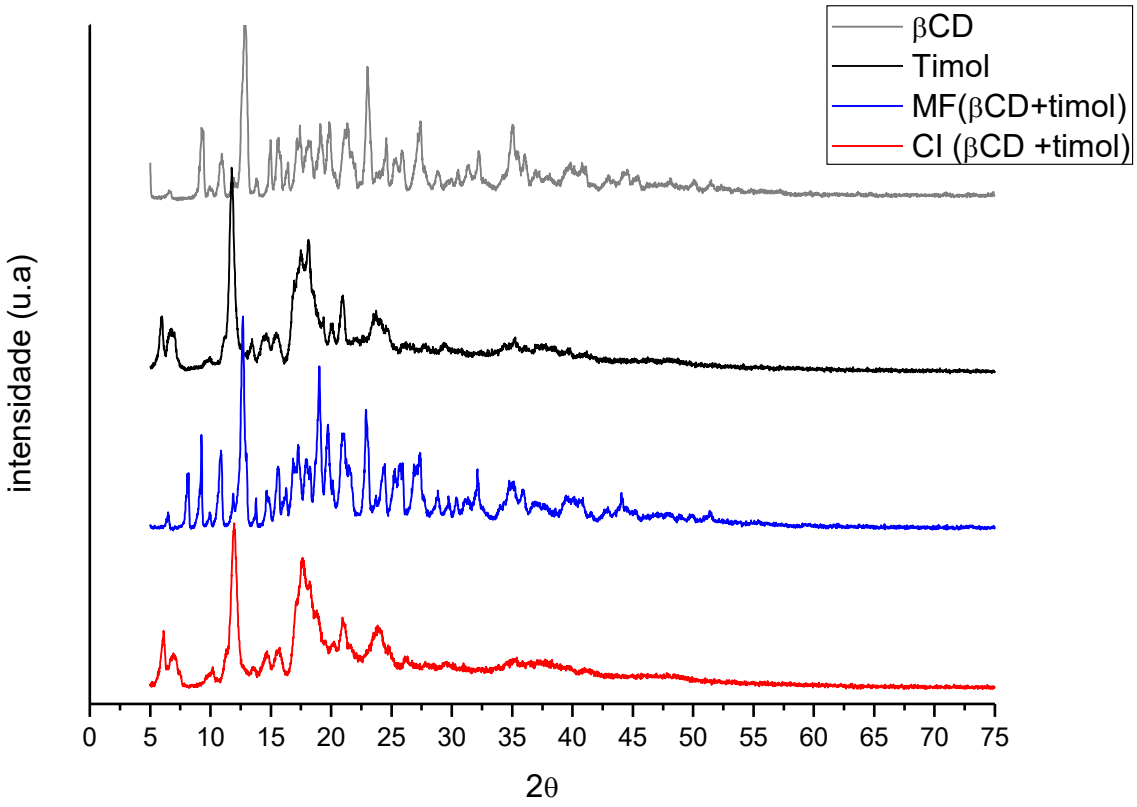
Figura 7 - Difratograma de raios-X da betaciclodextrina, da mistura física e complexo de inclusão entre β-ciclodextrina e OELO.



FONTE: Autoria própria. Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados - UFPI.

A técnica de análise estrutural por raios X se baseia na presença de uma rede cristalina ou na periodicidade do arranjo atômico. Esta é a principal limitação da técnica, ou seja, a técnica de difração de raios X não se aplica a materiais sólidos totalmente amorfos como os vidros ou polímeros e nem a líquidos (CALLISTER, 2009). Dessa forma não se obteve difratogramas para o OELO e o carvacrol (Figuras 8 e 10).

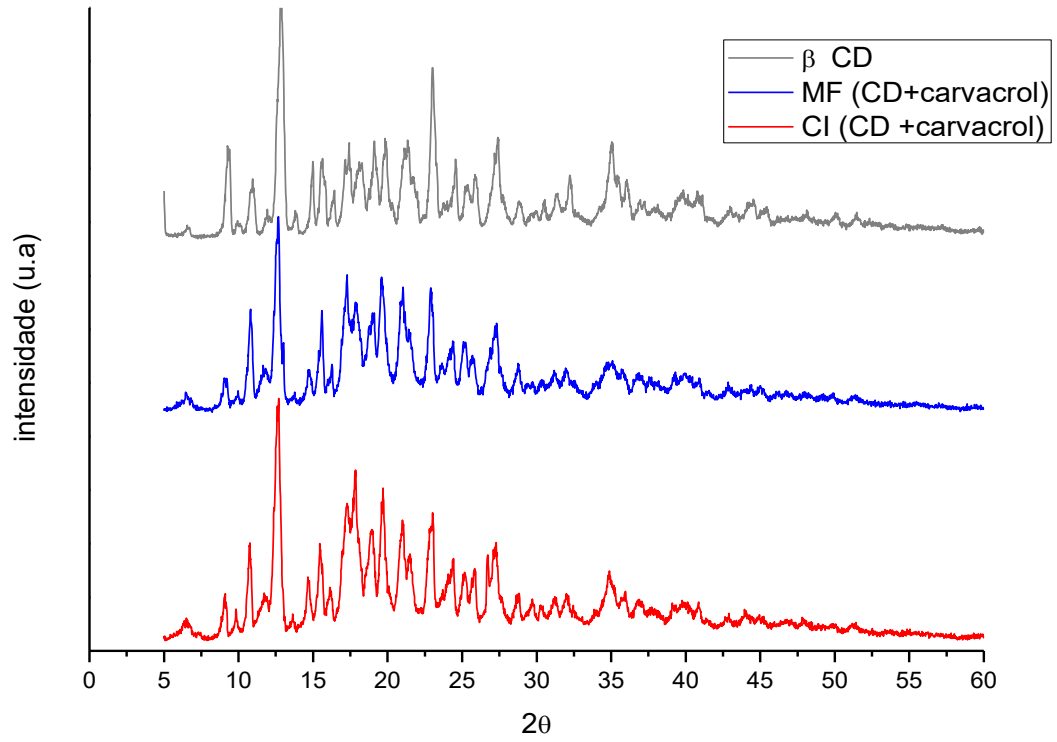
Figura 8 - Difratograma da β-CD, do timol e da mistura física e complexo de inclusão entre β-CD e timol.



FONTE: Autoria própria. Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados - UFPI.

Os difratogramas do timol, da β-CD e dos complexos de inclusão obtidos por mistura física e *spray-drying* podem ser observados na Figura 8. O timol apresentou maiores picos em 2θ = 11,76, 17,48 e 18,10. Na mistura física (MF), observa-se um padrão de difração semelhante ao da β-CD, sugerindo a existência de pequena interação entre o timol e a β-CD, mas com picos diferentes e com maior intensidade em 2θ = 12,68; 19,02 e 22,08. No difratograma do CI com timol, há alteração dos padrões de difração e aparecimento de novos picos em 2θ= 11,96, 17,60; 20,96 e 23,84 sugerindo a formação de complexo.

Figura 9 - Difratograma da β-ciclodextrina, da mistura física (MF) e complexo de inclusão da entre β-ciclodextrina e carvacrol.



FONTE: Autoria própria. Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados - UFPI.

Na Figura 9, são mostrados os difratogramas da β-CD e dos complexos de inclusão com carvacrol obtidos por mistura física e *spray-drying*. Na MF, observa-se a um padrão de difração com picos de maior intensidade em 2θ = 12,68; 19,02 e 22,08. No CI com carvacrol, o difratograma apresenta alteração dos padrões de difração e aparecimento de novos picos, sendo os de maior intensidade em 2θ= 12,7; 17,86 ;19,68 e 23,02, sugerindo também a formação de uma nova estrutura cristalina.

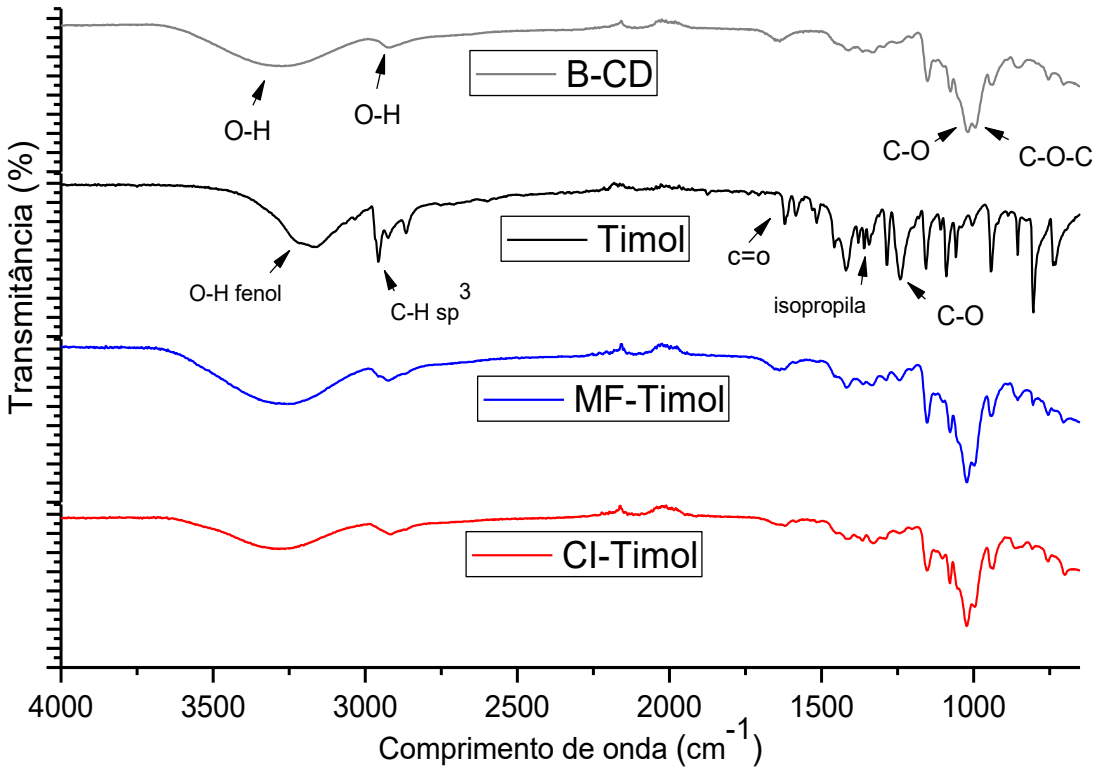
A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem sido utilizada na análise de complexos de inclusão. É aplicada para vibrações assimétricas, grupos polares e bandas heteroatômicas, tais como C=O e O-H (LYRA et al., 2010). Após complexação com a molécula-hóspede, ocorrem mudanças no espectro. Há interferências nos espectros da ciclodextrina, e algumas das alterações são muito sutis, exigindo interpretação cuidadosa do espectro (HEDGES, 1998).

Nos espectros de infravermelho da betaciclodextrina (Figuras 10, 11 e 12), foram observadas bandas de absorção de 3273 cm^{-1} (estiramento O-H), 2918 cm^{-1} (estiramento C-H), 1156 cm^{-1} (estiramento C-O), 1026 cm^{-1} (estiramento C-O-C).

No espectro do timol (Figura 10) foram observadas bandas de absorção de 3169 cm^{-1} (estiramento O-H fenol), 2969 cm^{-1}(estiramento C-H sp^3), 1620 cm^{-1} (estiramento C=C),1363 (grupamento isopropila), 1235 (estiramento C-O fenol). Já no espectro do carvacrol (Figura 11) observou-se as bandas de 3367 cm^{-1} (estiramento O-H do fenol), 2932-2875 cm^{-1} (estiramento C-H sp^3), 1351 cm^{-1} (grupamento isopropila), 1241cm^{-1} (estiramento C-O fenol).

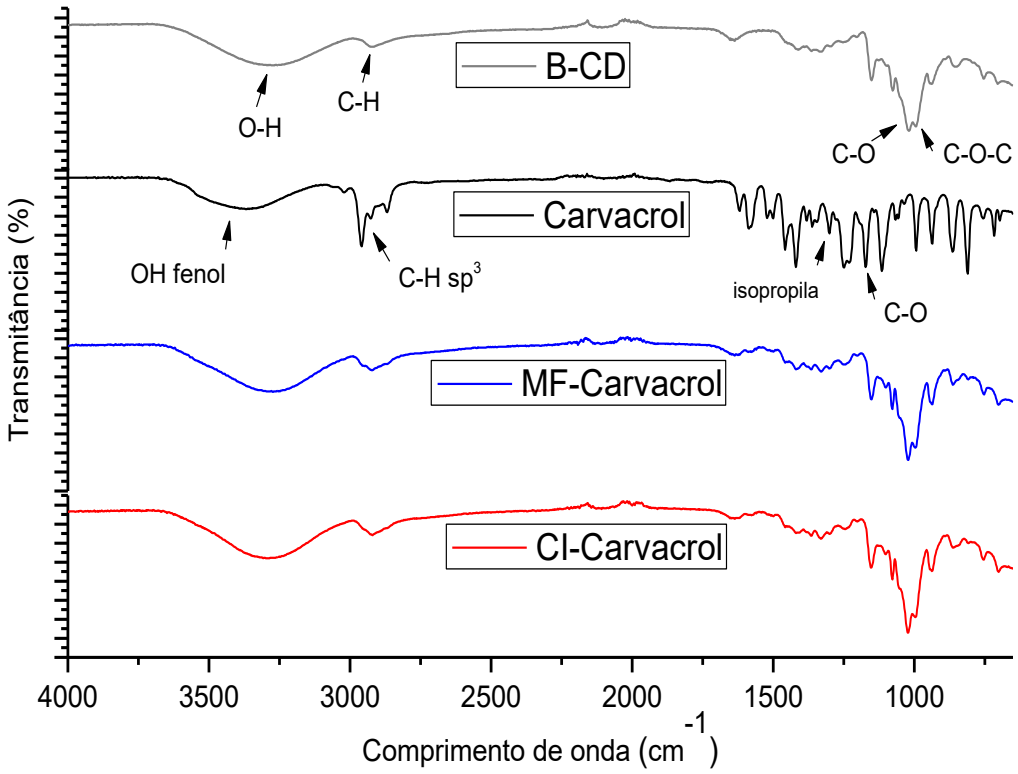
Nas Figuras 10, 11 e 12 observou-se mudanças no desaparecimento de bandas do OELO, timol e carvacrol. Nas análises de infravermelho ocorre a complexação quando as bandas mudam de posição, diminuem ou até mesmo desaparecerem (CORTI et al., 2007). Dessa forma, sugere-se que houve a formação dos CIs obtidos por *spray drying*, pois quando a molécula-hóspede ocupa a cavidade da ciclodextrina suas bandas não aparecem no CI, no entanto as bandas características da CD ficam inalteradas (VEIGA; MERINO, 2002).

Figura 10 - Espectros de FTIR das moléculas de β-CD, timol, mistura física (MF) e complexo de inclusão (CI).



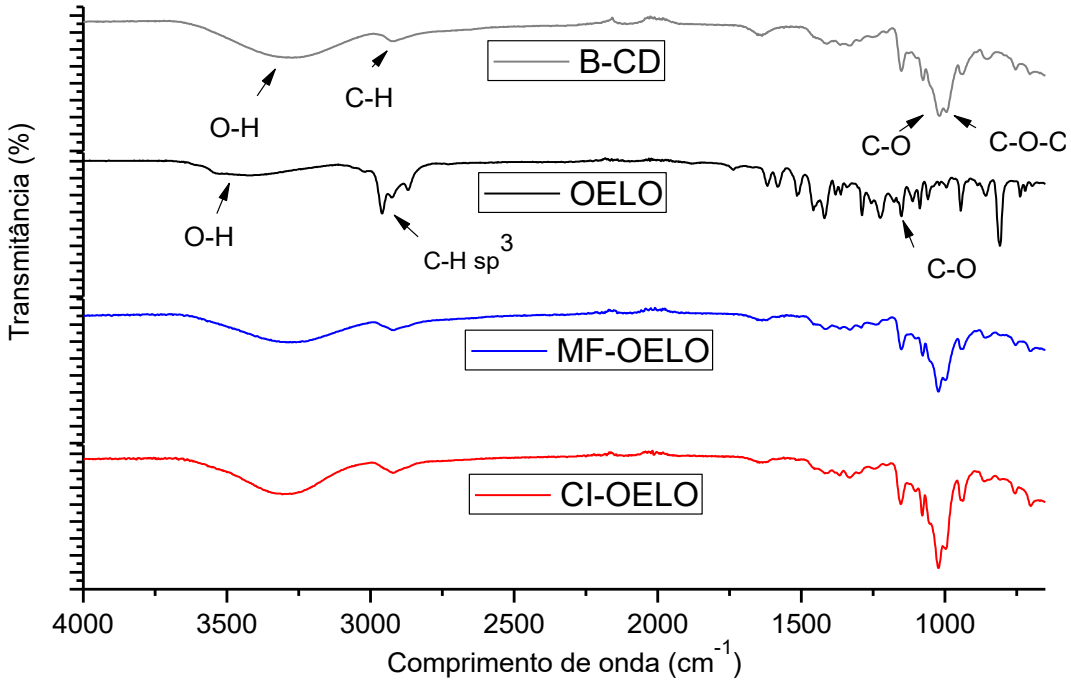
FONTE: Autoria própria. Laboratório de Geoquímica Orgânica - UFPI.

Figura 11 - Espectros de FTIR das moléculas de β-ciclodextrina (B-CD), carvacrol, mistura física (MF) e complexo de inclusão(CI).



FONTE: Autoria própria. Laboratório de Geoquímica Orgânica - UFPI.

Figura 12 - Espectros de FTIR das moléculas de β-ciclodextrina (B-CD), OELO, mistura física (MF) e complexo de inclusão(CI).



FONTE: Autoria própria. Laboratório de Geoquímica Orgânica - UFPI.

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos inferir que foi possível a formação dos complexos de inclusão entre a β-ciclodextrina e OELO, carvacrol e timol pelo método de secagem por *spray drying,* possibilitando uma melhor estabilidade por tratar-se de uma molécula volátil. Os resultados da espectroscopia de IV, DRX demonstram diferenças nas propriedades físico-químicas entre o OELO, seus majoritários e seus complexos, sugerindo a formação dos mesmos.

REFERENCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas cromatography/mass spectroscopy, 4th Edition. Allured Publ. Corp, Carol Stream, 2007.

ALENCAR, J. W. et al. Kovats` índices simulation in essencial oils analysis. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.

ANDRADE, V. A. et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesq. Vet. Bras**. v. 34, n.12, p.1153-1161, 2014.

BHANDARI, B. R. et al. Lemon Oil to β-Cyclodextrin Ratio Effect on the Inclusion Efficiency of β-Cyclodextrin and the Retention of Oil Volatiles in the Complex. **Food Chemistry**, n. 46, p. 1494-1499, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilânica Sanitária**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Brasília: Anvisa, 2003.

CALLISTER JR, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais**. Editora LTC: São Paulo, 2009.

CAO, F., GUO, J., PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Dev Ind Pharm.** v.31, n.8, p.747-56, 2005.

CORTI, G. et al. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl-β-cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**. v. 45, p.480-486, 2007.

CUNHA-FILHO, M.; SÁ-BARRETO, L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

FRACETO, L. F. et al. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:β-ciclodextrina. **Química Nova**, n. 30, p. 1203-1207, 2007.

HARANGI, J.; NÁNÁSI, P. Measurement of the essential oil in inclusion complexes with cyclodextrin by means of capillary gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.166, p.103-109, 1984.

HEDGES,A.R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chem Rev.** 1998; 98 (5):2035- 2044.

HOLLAND, R.D. et al. Thymol treatment of bacteria prior to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis aids in identifying certain bacteria at the subspecies level. **Rapid Commun Mass Spectrom.** 2014 Dec 15;28(23):2617-26.

JOCA, H. C. Carvacrol reduz a excitabilidade neural pela inibição dos canais para sódio dependente de voltagem / Humberto Cavalcante Joca. – 2012. 74f.: il. color., enc. ; 30 cm. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde,

Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2012. Área de Concentração: Fisiologia

KFOURY, M.;LANDY, D.; RUELLAN,S.; AUEZOVA,L.; GREIGE-GERGES,H.; FOURMENTIN,S. Determination of formation constants and structural characterization of cyclodextrin inclusion complexes with two phenolic isomers: carvacrol and thymol**.** *Beilstein* **J. Org. Chem.** 2016, *12,* 29–42.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essencial oil, thymol and carvacrol. **J. Applied Microbiol**., v.91, p.453-462, 2001.

LIMA, G. S. et al. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomed.,** v.22, n.12, p.1133-1137, 2015.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M. et al. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. **Food Chem. Toxicol**. v. 81, p. 9–27, 2015.

LYRA, M. A. M. et al. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármacociclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.31, n.2, p. 117-124, 2010.

MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, **Flavour Fragr. J.** v. 25, p. 313–326, 2010.

MASTERS, K. Spray Drying Handbook. 3 Ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1997.

MATOS, F.J.A. **Farmácias Vivas**. 4ª ed. EUFC: Fortaleza, 2002.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 113, p. 226–238, 2015.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov**., v. 7, p. 28-35, 2012.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoide*s HBK. **Food Chem**. v. 101, n.1, p.236-240, 2007.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**. v. 19, n.3, 1996.

PISSERI, F. et al. Essential oils in medicine: principles of therapy. **Parasitologia**. v. 50, p.89-91, 2008

SILVA, R. O. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 3, p. 184-192, 2014.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science & Technology**. v.15, p.137–142, 2004.

TAKAHASHI, A.I. et al. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization–part II: X-Ray diffraction, infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 12, n. 1, p. 8-15, 2012.

VEIGA, M.D.; MERINO, M. Interactions of oxyphenbutazone with different cyclodextrins in aqueous medium and in the solid state. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 28, n. 5, p. 973-982, 2002.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica.** Coimbra: Minerva Coimbra, 2006.

VENTURINI, C. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VICUÑA, G.C.; STASCHENKO, E.E.; FUENTES, J.L. Chemical composition of the Lippia origanoides essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v.81, p.343-9, 2010.

VOZONE, C.M.; MARQUES, H.M.C. Complexation of budesonide in cyclodextrins and particle aerodynamic characterization of the complex solid form for dry powder inhalation. **J Incl Phenom Macroc Chem.** v.44, n.1-4, p.111-5, 2003.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) E DE SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS EM COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM BETACICLODEXTRINA

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas, com mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, que afetam cerca de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo e outras 200 milhões estão sob risco, principalmente no Brasil e outros países tropicais. Há uma necessidade de novas alternativas terapêuticas e, desde 1940, os antimônios pentavalentes compostos por estibogluconato de sódio (Pentostan®) e Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) são a principal linha quimioterapêutica para o tratamento das leishmanioses, limitando-se a via de administração parenteral. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) e de seus constituintes majoritários em complexo de inclusão com betaciclodextrinas frente a formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis.* Realizou-se a complexação do OELO e seus constituintes majoritários (timol e carvacrol) com a molécula de betaciclodextrina pelo método de *spray drying* na proporção de 1:1, obtendo-se os complexos de inclusão (CI). Foi avaliada a atividade contra promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis,* assim como sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis.* Para a análise da citotoxicidade, foram realizados testes de atividade em macrófagos murinos e sobre hemácias de carneiro. Com o propósito de se avaliar possíveis mecanismos de ação, testou-se a atividade imunomoduladora das preparações através dos protocolos de avaliação de ativação de macrófagos, tais como a indução da síntese de óxido nítríco (NO), além de alterações estruturais, como a capacidade fagocítica e volume lisossomal. OELO e seus constituintes majoritários apresentaram efeito antileishmania sobre formas promastigotas, amastigotas axênicas e obtiveram efeito sobre a macrófagos infectados por *L. amazonensis*, Apresentaram tais efeitos mesmo quando foram complexados com betaciclodextrinas. A formação dos CI reduziu de forma significativa a citotoxicidade sobre macrófagos murinos e hemácias de carneiro. Além disso, os compostos testados apresentaram efeito imunomodulador com o aumento da indução de NO, da capacidade fagocítica e do volume lisossomal em macrófagos. Os resultados deste trabalho evidenciam o potencial uso do OELO e seus constituintes majoritários timol e carvacrol em CI como uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: timol, carvacrol, Lippia, atividade antileishmania, citotoxidade.

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas de mais de 20 espécies de *Leishmania* que afetam principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, e está associada a desnutrição, deslocamento da população, moradias pobres, sistema imunológico fraco e falta de recursos. As leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo e outras 200 milhões estão sob risco, principalmente no Brasil e outros países tropicais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 90% dos casos globais de leishmaniose visceral (LV) ocorreram em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão e 70% dos casos de leishmanioses cutâneas (LC) ocorreram em dez países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria. Endêmicas em mais de 98 países e territórios com uma ocorrência anual de novos casos de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV e de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LC em todo o mundo (WHO, 2016).

As leishmanioses apresentam 4 formas principais da doença: a leishmaniose visceral (também conhecida como calazar); leishmaniose dérmica pós-calazar; leishmaniose cutânea; leishmaniose mucocutânea. Enquanto a leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral é a doença mais grave e pode ser fatal se não tratada (WHO, 2016).

O tratamento disponível para as leishmanioses é considerado insuficiente, tendo em vista a falta de inovação tecnológica na terapia antileishmania, bem como a falta de monitorização e controle do uso das terapias existentes, conduzindo ao surgimento de resistência (SUNDAR; SINGH; SING, 2014). Portanto, há necessidade de novos fármacos, desde 1940, os antimônios pentavalentes compostos por estibogluconato de sódio (Pentostan®) e Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) são a principal linha quimioterápica para o tratamento das leishmanioses, limitando-se a via de administração parenteral que, é invasiva, além de ser uma terapia de longa duração e que apresenta alta toxicidade e diminuição crescente da resposta terapêutica. Dessa forma, a falta de eficácia, as reação adversas e o alto custo dos tratamentos tradicionais vêm sendo um estímulo na busca de alternativas terapêuticas (PHAM; LOISEAU; BARRAT, 2013; KEDZIERSKI et al, 2009).

Um dos maiores e mais importantes fatores para esse interesse em novos compostos com propriedades farmacológicas é a enorme diversidade de constituintes químicos que podem ser selecionados, devido à complexidade da constituição química das plantas (BADKE et al., 2012). Os produtos das transformações químicas executadas pelo metabolismo

secundário dos seres vivos, tais como compostos terpênicos, alcalóides, glicosídios e outros derivados naturais, têm sido objetos de estudo ao longo de muitos anos (MATOS, 1998).

Com o objetivo de identificar novos compostos com atividade antileishmania, há vários anos, uma diversidade de pesquisas com plantas abordando várias classes químicas de compostos incluindo alcalóides quinoleínicos e derivados (COSTA, 2006; CORREA, 2006), chalconas (TORRES-SANTOS, 1999), quinonas e naftoquinonas (KAYSER, 2000), neoligninas (BARATA, 2000), alcalóides cantin-6-ona (FERREIRA, 2002), terpenos (LIMA et al., 2015) foram realizadas, trazendo excelentes resultados contra várias espécies de leishmania.

Os fármacos como a anfotericina B e a meglumina tem sido alvo das pesquisas no sentido da viabilização para uso por via oral, bem como associar a tecnologias utilizando carreadores de fármacos a fim de melhorar a biodisponibilidade (BITENCOURT et al., 2016; RUIZ et al., 2014; DEMICHELI et al., 2004).

Compostos naturais e sintéticos vem sendo estudadas em complexo de inclusão com ciclodextrinas como estratégia de inovação no desenvolvimento de produtos para o tratamento da leishmaniose (NARDELLO-RATAJ, V.; LECLERCQ, 2014; PHAM; LOISEAU; BARRAT, 2013; ROJAS-AGUIRRE et al., 2011).

A espécie vegetal *Lippia origanoides,* pertencente a família Verbenaceae, é encontrada em toda América Central, America do Norte, América do Sul e Antilhas, nativa de países como o México, Guatemala, Cuba, Guiana, Venezuela, Brasil e Colômbia (MEDEIROS et al., 2011). É uma planta medicinal conhecida no estado do Piauí como "alecrim-do-campo". As folhas têm sido utilizadas na culinária e na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e antissépticos gerais para a boca, garganta e ferimentos (STASHENKO et al., 2010; PASCUAL et al., 2001).

Algumas espécies de *Lippia* são constituídas por uma larga variedade de compostos quimicamente variáveis e compostos voláteis que apresentam diversas propriedades biológicas (PASCUAL et al., 2001; MENEZES et al., 2009; MESA et al., 2009).

O óleo essencial de *L. origanoides* (OELO) tem sido estudado quanto a sua composição química, atividade farmacológica e toxicológica, sendo encontrados efeito antigenotóxico em células bacterianas, atividade antioxidante, bem como atividade antimicrobiana e antiparasitária (SANTOS et al., 2004; VICUNA; STASHENKO; FUENTES, 2010; MEDEIROS et al., 2011; OSPINA et al., 2011; TANGARIFE-CASTANO et al., 2011; CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2012; BORGES et al., 2012). O OELO apresenta composição fitoquímica diferente evidenciando a

existência de vários quimiotipos, que se diferenciam quanto a presença dos majoritários p-cimeno, carvacrol e timol (SARRAZIN et al., 2015; ESCOBAR et al., 2010).

Considerando que diversos óleos essenciais e seus compostos isolados vem demonstrando atividade antileishmania (MEDEIROS et al., 2011; BARROS et al., 2016; MAHMOUDVAND et al., 2016) além do potencial do OELO como produto natural que contem substâncias bioativas com potencial atividade antiparasitária, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antileishmania do óleo essencial de *Lippia origanoides* H.B.K (OELO) e de seus constituintes majoritários (timol e carvacrol) em complexos de inclusão com betaciclodextrina frente a formas promastigotas, amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* e amastigotas internalizadas em macrófagos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias químicas e reagentes

O carvacrol, o timol e a betaciclodextrina foram adquiridos na Sigma-Aldrich, EUA. Dimetilsulfóxido (DMSO, 99% de pureza) foi adquirido na Merck Chemical Company (São Paulo, SP, Brasil). Meios de cultura de Schneider e RPMI 1640, soro fetal bovino (SFB), sal de tetrazólio (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-brometo de tetrazólio - MTT), azul alamar (Resazurina®), antibióticos Penicilina e Estreptomicina, e outros reagentes de cultura de células, incluindo tioglicolato, zimosan, vermelho neutro (NR) e foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Alderich Brasil). O antibiótico anfotericina B e panótico rápido foram adquiridos da Cristália (São Paulo).

2.2 Células e animais

Para obtenção macrófagos foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c machos e fêmeas (4-5 semanas de idades), com peso variando entre 20 e 30 g, do biotério das Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, (NPPM/CCS/UFPI), Teresina, Brasil. Os animais foram mantidos a 25 ± 1 °C, em ciclos claro/escuro de 12 h com água e ração *ad libitum***.**

Cerca de 72 horas antes da coleta de macrófagos, realizou-se inoculação intraperitoneal de 1,5 mL tioglicolato de sódio nos camundongos. No dia da coleta, primeiramente os animais foram sedados por injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (80 mg/Kg), e posteriormente realizado o deslocamento cervical. Então procedeu-se a retirada dos macrófagos da cavidade peritoneal dos animais.

Para a realização do teste de atividade hemolítica foi coletado sangue de carneiro (9 meses de idade) do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPI) localizado em Teresina, PI.

A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) obtida do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI) foi utilizada para avaliação da atividade antileishmania. As formas promastigotas foram cultivadas em meio de Schneider's supplementado, pH 7 (10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina, incubadas em estufa B.O.D a 26°C). Formas amastigotas extracelulares foram obtidas por transformação *in vitro* de promastigotas de *L. amazonensis* em crescimento estacionário e aumentando a temperatura para 32 °C e diminuindo o pH para 4,6 (CARNEIRO et al., 2012).

Todos os testes de atividade antileishmania, imunomoduladora e citotoxicidade e foram realizados no Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, (NPPM/CCS/UFPI), Teresina, Brasil. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (CEEAPI nº 091/2015).

2.3 Material vegetal

As partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K foram coletadas em 21/02/2015, no período da manhã, na cidade de José de Freitas (latitude 04º45'23" sul e longitude 42º34'32"oeste), Estado do Piauí, Brasil. A exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso, na Universidade Federal do Piauí, sob o número TEPB09205.

2.4 Obtenção do óleo essencial (OELO)

As partes aéreas de *L. origanoides* H.B.K, após secagem foram submetidas ao processo de trituração a fim de aumentar a superfície de contato do material vegetal, depois submetidos a hidrodestilação por um período de quatro horas. Após extração o óleo foi armazenado em temperatura abaixo de 0ºC, e posteriormente caracterizado.

2.5 Obtenção dos complexos de inclusão (CI)

Realizou-se a complexação do OELO e seus constituintes majoritários (timol e carvacrol) com a molécula de betaciclodextrina pelo método de *spray drying* na proporção de 1:1, obtendo-se os complexos de inclusão (CI), no laboratório do Núcleo de Tecnologia farmacêutica da Universidade Federal do Piauí (NTF /UFPI), Teresina. Quantidades equimolares de OELO e β-CD foram solubilizadas em temperatura ambiente em etanol P.A. e em água destilada (1:3), respectivamente. A solução foi homogeneizada com o auxílio de um agitador magnético por 30 minutos. Posteriormente, essa solução foi injetada no aparelho *spray-drying* de bancada (BUCHI B-290) com uma pressão de entrada de 0,9 Bar,

temperatura de entrada de 95 °C e fluxo da amostra de 3 mL min^{-1}. Em seguida, o complexo foi armazenado em dessecador até a realização dos testes. O mesmo procedimento foi realizado com o timol e o carvacrol separadamente.

2.6. Atividade antileishmania sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento e formas amastigotas axênicas obtidas através da transformação em cultivo das formas promastigotas na fase estacionária. Os parasitos foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider´s suplementado, na quantidade de $1x10^6$ leishmania/100µL de meio. Em seguida o OELO, timol, carvacrol, betaciclodextrina e os complexos de inclusão foram adicionados aos poços em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo oito faixas de concentrações finais desejadas (800 até 6,25 µg/mL). A placa foi incubada em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de 26ºC para as formas promastigotas e 34ºC para as formas amastigotas axênicas, por 48h. Restando 6 h para o término deste período, foram adicionados 20 µL de resazurina $1x10^{-3}$mol/L, quando incubou-se novamente a placa. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorbância Biotek (modelo Elx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de inibição de crescimento (%).

O controle positivo foi realizado com 2 µg/mL de anforericina B diluído em meio Schneider´s contendo 1 x 10^6 promastigotas ou amastigotas axênicas por poço. O controle negativo equivaleu ao meio Schneider´s contendo 1 x 10^6 promastigotas ou amastigotas axênicas por poço e, neste caso, a viabilidade foi de 100% para o parasito (SOARES et al.,2007; VALADARES et al.,2011**;** OLIVEIRA et al.,2017).

2.7. Determinação da citotoxicidade

2.7.1 Citotoxicidade nos macrófagos e o cálculo do índice de seletividade (IS)

A avaliação da citotoxicidade foi efetuada em placas de 96 poços usando o ensaio de MTT. Aproximadamente $1x10^6$ macrófagos por poço foram incubadas in 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado a 37 ºC e 5% de CO_2 durante 4 h para a adesão celular. As células não aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI 1640. OELO, carvacrol, timol e seus respectivos complexos de inclusão foram diluídos em meio RPMI 1640 suplementado, adicionada a um intervalo de concentrações, e incubados a 37ºC com 5% de CO_2 durante 48h.

Após a incubação, a citotoxicidade foi avaliada pela adição de MTT (5 mg/mL). O sobrenadante foi rejeitado e os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100 uL de DMSO. Por fim, a absorvância a 550 nm foi medida utilizando um leitor espectofotômetro de placa. O IS de cada tratamento foi calculado pelo quociente da concentração de citotoxicidade de 50% (CC_{50}) obtida em macrófagos peritoniais pela concentração inibitória média (CI_{50}), medidos para diferentes formas evolutivas de leishmania.

2.7.2 Atividade hemolítica sobre hemácias de carneiro

A atividade hemolítica foi avaliada através da mistura de 80 µL de uma suspensão a 5% de eritrócitos de carneiro em salina tamponada com fosfato (PBS) com 20 µL de diferentes concentrações de OELO, timol, carvacrol e seus CI e incubando a 37ºC durante 1 h. A reação foi desacelerada por adição de 200 µL de PBS e a suspensão foi centrifugada (1000g durante 10 min. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a lise celular foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm, como descrito previamente (LÕFGREN et al., 2008). Para o cálculo da hemólise máxima e do controle foram substituidas a amostra por um volume igual de de água destilada e PBS, respectivamente. A porcentagem de hemólise foi calculada através da seguinte equação:

Hemólise (%) = (absorbância (ABS) da amostra - ABS do controle/ABS da hemólise máxima ABS do controle) X 100.

2.8. Atividade sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis*

Os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 24 poços numa concentração de 2 $x10^5$ células/ poço em 500µL de RPMI suplementado, contendo lamínulas redondas estéreis de 13 mm. As placas de cultura foram incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2 durante 4 h para a adesão celular. Os macrófagos aderidos foram então incubados com um novo meio contendo amastigotas axênicas numa razão de 10 amastigotas /macrófago a 5% de CO_2 e 37ºC, *overnight*. Passado esse período, o meio foi subsequentemente aspirado para remover parasitas não internalizados. A cultura infectada foi incubada com os valores correspondentes a ½ $CI_{50;}$ CI_{50} e 2 x CI_{50} do OELO, timol, carvacrol, betaciclodextrina e seus complexos, sobre as formas amastigotas axênicas. Para o controle positivo, a concentração de anfotericina b testada foi de 0,2µg/mL. Após este período, as lamínulas foram removidas e coradas utilizando panótipo rápido. Para cada tratamento, contou-se o número de macrófagos infectados (infecção) e a carga parasitária (infectividade) percorrendo os campos das amostras

até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando microscopia óptica (CARNEIRO et al., 2012).

2.9. Atividade imunomoduladora

2.9.1 Produção de óxido nítrico (NO)

Os macrófagos foram retirados da cavidade peritoneal dos camundongos após aplicação prévia de tioglicolato a 3%. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na quantidade de 2×10^5 macrófagos por poço e incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C durante 4 h, para completa adesão das células na placa. Após esse período, o sobrenadante foi removido e acrescentou-se OELO, timol, carvacrol e seus respectivos CI nas concentrações de 800 a 6,25 µg/mL. A placa foi incubada por 24 h e após esse período, foram removidos 50µL do sobrenadante de cada concentração e transferiu-se para uma nova placa contendo 50µL de reagente de Griess®. O controle positivo foi dado pela indução de NO pelo lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). Em seguida, realizou-se a leitura da placa um leitor espectofotômetro de placa em 550 nm.

2.9.2 Capacidade fagocítica

Os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços na quantidade de 2×10^5 macrófagos por poço e incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C. Após 48 h de incubação, foram adicionados 10 µL de zimosan corado com vermlho neutro e as células foram incubadas a 37ºC durante 30 min. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador de Baker para paralisar o processo de fagocitose e, 30 min depois, a placa foi lavada com salina 0,9 % a fim de remover o zimosan 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).

2.9.3 Atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço numa placa de 96 poços e incubados com os compostos testados e realizadas diluições seriadas, atingindo cinco faixas de concentrações finais. Após 48 h de incubação em estufa a 37 ºC e a 5% de CO_2, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incubou-se por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37 ºC 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 ELISA (BONATTO et al., 2004).

2.10 Analise estatística

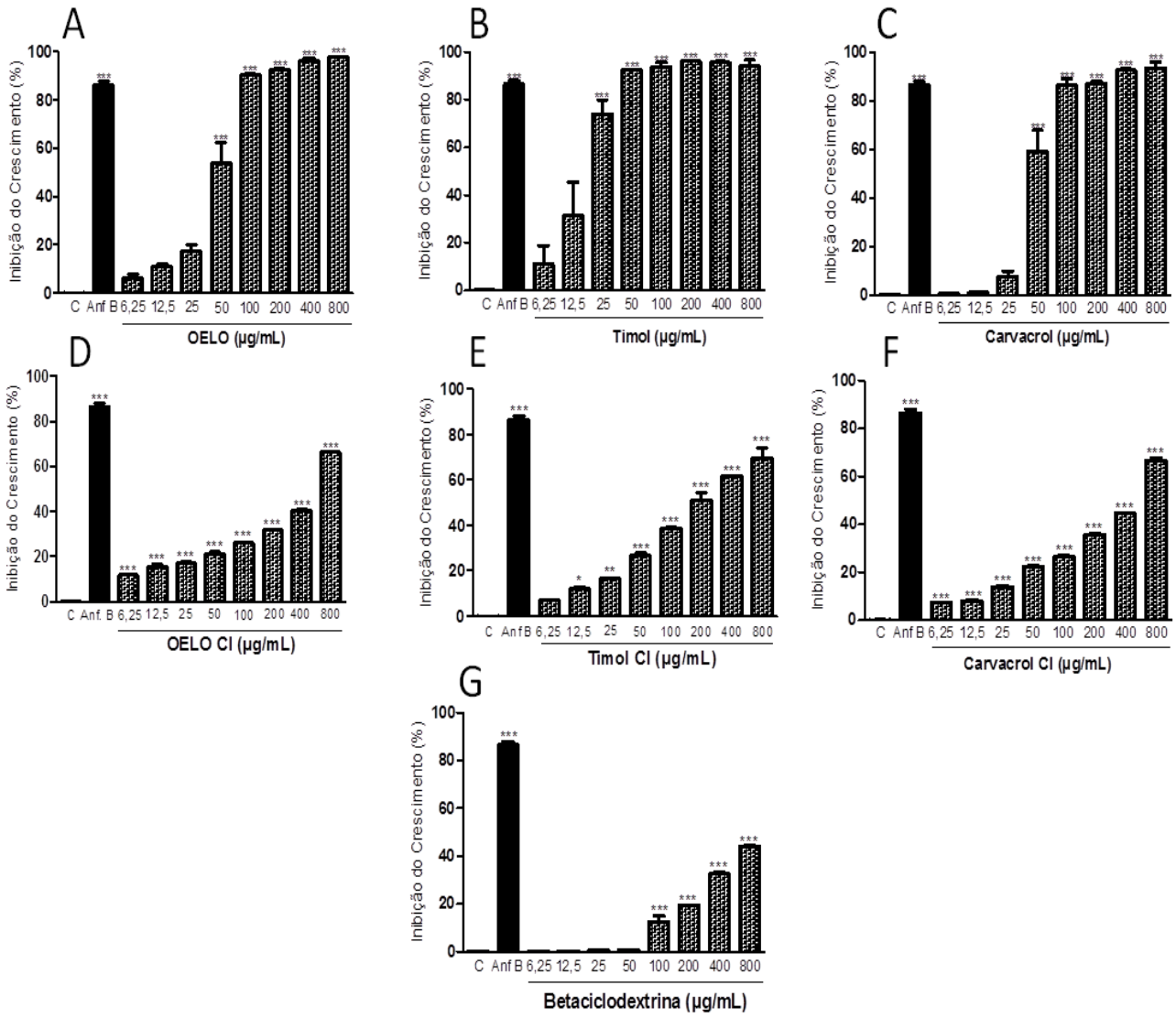
Os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o valor $p<0,05$ como estatisticamente significativo. Os valores da concentração inibitória média (CI_{50}) e da concentração citotóxica média (CC_{50}) foram calculados por regressão de probitos, utilizando o programa SPSS® versão 22 e assumindo um nível de confiança de 95% ($p<0.05$). Para análises de variância utilizou-se oneway ANOVA e o pós-teste de Bonferroni ($p<0,05$) no software GraphPad Prism® 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos avaliados neste trabalho contendo óleo essencial de *L. origanoides* H.B.K. (OELO) e seus constituintes majoritários incorporados ou não em complexo de inclusão (CI) apresentaram um potencial citotóxico sobre as formas amastigotas e promastigotas de leishmania. A atividade antileishmania do OELO e de seus produtos derivados foram demonstradas em cepas de *L. amazonensis*, espécie de parasita causador da leishmaniose cutânea, cutânea-difusa, mucocutânea e leishmaniose visceral, no homem e em outros mamíferos.

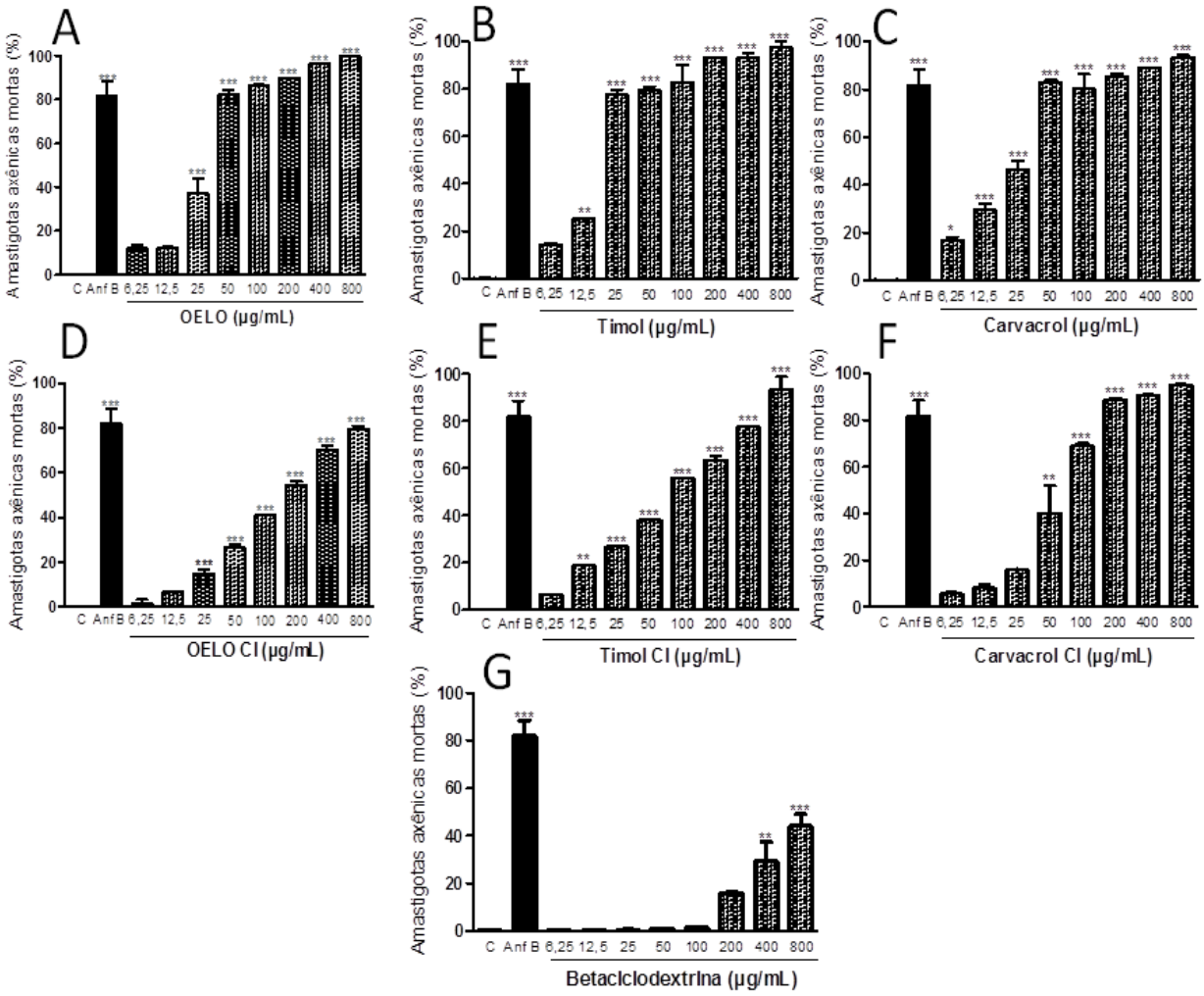
Na avaliação da atividade antileishmania neste trabalho, foram avaliados o efeito do OELO, timol, carvacrol e seus respectivos complexos com β-ciclodextrina frente a sua citotoxicidade sobre as formas evolutivas promastigota e amastigota axênica. Na Figura 1, observamos o efeito sobre a inibição do crescimento de formas promastigotas do parasita com inibição próximo a 100% na maior concentração. O efeito antileishmania dos compostos em CI na concentração de 800 μg/mL apresentaram 66,3%, 69,7% e 66,7% de inibição do crescimento sobre as formas promastigotas para OELO, timol e carvacrol respectivamente. Betaciclodextrina apresentou 44,1% de inibição, demonstrando efeito citótoxico sobre *L. amazonensis*.

Figura 1 - Atividade antileishmania de OE de *Lippia origanoides* (OELO), β-CD, timol e carvacrol livres e complexados contra formas promastigotas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle (C). Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Bonferroni.



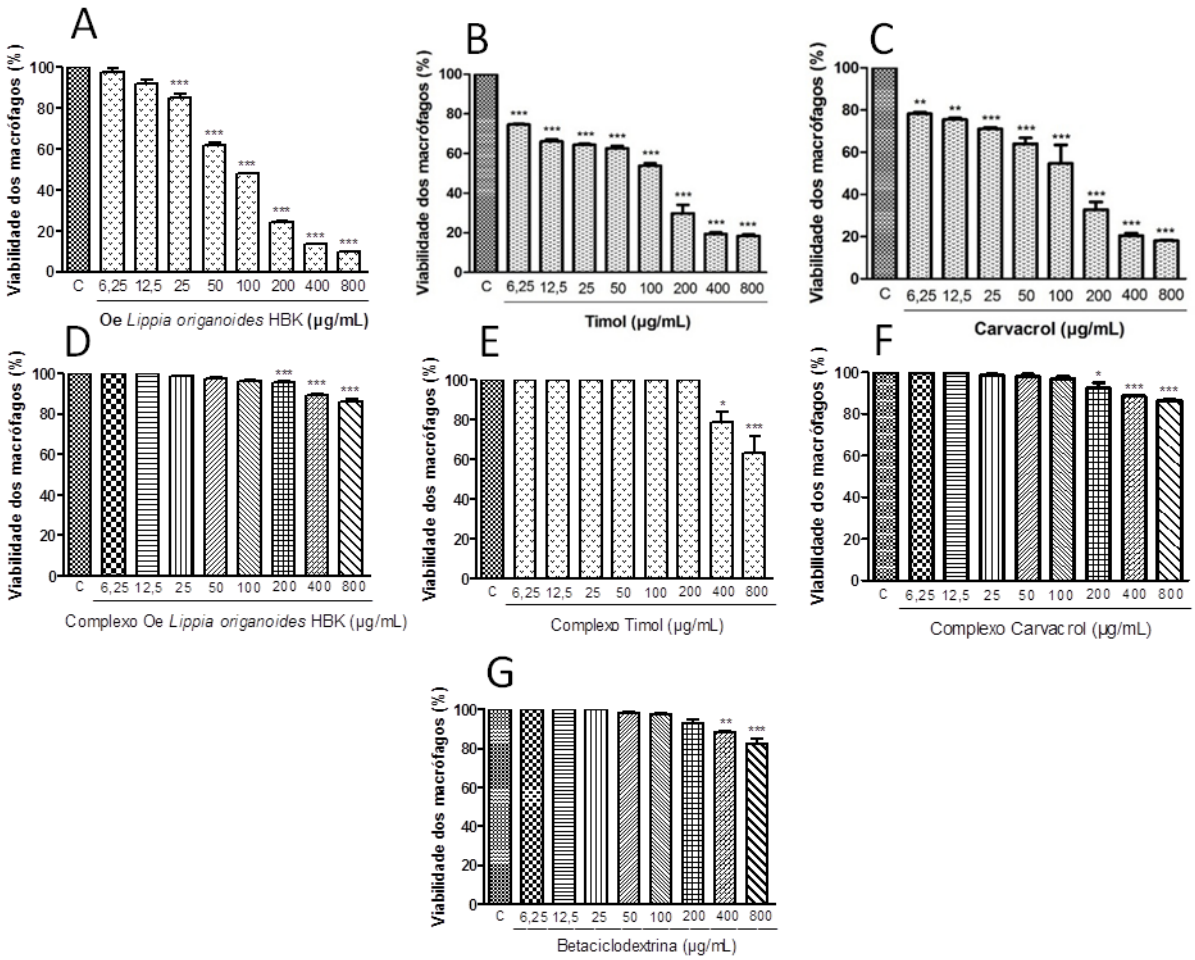
Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E = timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina. Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Figura 2 - Atividade antileishmania de OE de *Lippia origanoides* (OELO), β-CD, timol e carvacrol livres e complexados contra amastigotas axênicas. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle (C). Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Bonferroni.



Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E = timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina. Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Figura 4 - Teste de citotoxicidade do OE de *Lippia origanoides* (OELO), β-CD, timol e carvacrol livres e complexados sobre macrófagos murinos. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle (C). Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Bonferroni.



Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E = timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina. Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

O timol, OELO e o carvacrol apresentaram atividade significativa contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, com IC_{50}/48 h de 17,423 µg/mL, 59,43 µg/mL e 64,709 µg/mL respectivamente (Tabela 1 e Figura 2). Em estudos anteriores, o óleo essencial de outra espécie de *Lippi*a, *L. sidoides*, bem como um dos seus constituintes majoritários, timol, apresentaram atividade significativa contra formas promastigotas de *L. amazonenses*, com IC_{50}/48 h de 44,38 e 19,47 µg/mL respectivamente (MEDEIROS et al., 2011). Em outro estudo, OELO apresentou uma IC_{50} de 13,7 µg/mL em promastigotas de *L. chagasi* e não

exibiu qualquer toxicidade em células de mamífero (ESCOBAR et al, 2010). Drogas clássicas utilizadas no tratamento da leishmaniose como a anfotericina B apresentam CI_{50}/48h sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* de 0,16 µg/mL. Apesar desta alta potência, tais drogas apresentam alta toxicidade sobre macrófagos murinos, com CC50 de 0,9 µg/mL (DUARTE et al., 2016), demonstrando baixo índice terapêutico.

MELO et al (2013) demonstrou que o óleo essencial de dois genótipos de *L. gracilis* apresentou atividade sobre formas promastigotas de *L. chagasi*. Contudo, a IC_{50} (77,26 µg/mL) obtida para o óleo essencial rico em carvacrol foi ligeiramente inferior à IC_{50} (86,32 µg/mL) para aquele rico em timol. Além disso, também foram testados os majoritários, onde o IC_{50} do timol mostrou-se inferior ao obtido para o timol.

Tabela 1 - Efeito antileishmania e citotóxico de OELO, timol , carvacrol e betaciclodextrina livres e em CI.

Compostos	**Macrófagos**	**Promastigotas**		**Amastigotas**		**Amastigota internalizada**	
	CC_{50} (µg/mL)	**CI_{50} (µg/mL)**	**IS**	**CI_{50} (µg/mL)**	**IS**	**CI_{50} (µg/mL)**	**IS**
Timol	69,27±2,68	17,42±2,38	3,97	22,58±0,29	3,06	8,55	8,10
Timol CI	999,25±65,87	208,76±14,14	4,78	82,58±4,43	12,1	3,75	266,46
Carvacrol	63,91±4,63	64,71±7,68	0,98	26,11±4,51	2,44	18,49	3,46
Carvacrol CI	*	422,58±16,29	-	63,14±9,43	-	4,82	-
OELO	99,12 ±7,86	59,43±3,93	1,66	31,13±2,12	3,18	13,53	7,33
OELO CI	*	567,08±1,10	-	163,99±3,14	-	5,77	-
Beta-CD	*	996,19±16,22	-	817,63±12,81	-	ND	-
Anf. B	8,75[a]	1,74[a]	5,02[a]	0,16[a]	54,6[a]	0,16[a]	54,68[a]

Legenda: IS_{50} = índice de seletividade = CC_{50} / CI_{50}. CI = complexo de inclusão. OELO: = óleo essencial de *Lippia origanoides* HBK. CI_{50} = concentração inibitória média. CC_{50} = concentração citotóxica média. OBS: Os valores * representam valores incalculáveis, ou seja, não houve citotoxicidade. ND= não determinado. [a] (OLIVEIRA, et al, 2017). Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Ao observarmos os resultados do efeito dos compostos testados sobre macrófagos murinos, pode-se observar que a complexação com ciclodextrina diminuiu consideravelmente a citotoxidade do OELO e dos terpenos timol e carvacrol, conforme já foi demonstrado com CI com outros compostos (BHATTACHARYA et al., 2016; SILVA et al., 2016a). Na realização do teste de citotoxicidade sobre macrófagos, foi possível o cálculo do índice de seletividade (IS) para cada produto. Na complexação do timol com ciclodextrina, houve

aumento da seletividade para cerca de 4 vezes para promastigota e 12 vezes para formas amastigotas. Timol demonstrou a maior potencia dentre os compostos testados. Estudos de cromatografia gasosa demonstram que ele representa 30% da composição do OELO (dados não mostrados), sendo assim responsável por grande parte do efeito antileishmania do OELO juntamente com o carvacrol (cerca de 20% da composição).

Para os compostos carvacrol CI, OELO CI e betaciclodextrina não foi possível o cálculo da citotoxicidade e, portanto, do IS. Desta forma, os constituintes avaliados apresentaram baixa toxicidade e IS variando de cerca de 1 a 12,1, o que significa que a composição foi mais tóxica para o parasita do que para a célula hospedeira (macrófago). Quanto maior este índice, mais seletiva é a droga para o parasita e, conseqüentemente, menor efeito tóxico que ela apresenta sobre a célula hospedeira do mamífero.

O OELO apresentou CC_{50} de 99,12 µg/mL, e IS de 3,18 para amastigotas axênicas e 7,33 para amastigotas internalizadas, demostrando maior seletividade para o parasita do que para os macrófagos. Outros óleos essenciais ricos em terpenóides também apresentaram bons resultados, como *P. aduncum* que obteve IS > 5,52 para amastigotas axênicas *de L. amazonensis* (BERNUCI et al, 2016). Segundo alguns estudos, o índice de seletividade para amastigotas internalizados deve ser próximo ou superior a 20 (OSORIO, et al. 2007; CARNEIRO, et al, 2012). Observando os resultados, o Timol CI apresentou IS bem acima desse valor (266,46). Para o OELO CI e Carvacrol CI, não foi possível calcular tal índice, tendo em vista a ausência de citotoxicidade de tais complexos (Tabela 1).

O OELO, o carvacrol e seus respectivos complexos obtiveram maior atividade sobre as formas amastigotas do que sobre as formas promastigotas, tendo como parâmetro o valor da IC_{50} obtido sobre ambas as formas evolutivas do parasita. Somente o timol obteve melhor atividade sobre promastigotas quando comparada com as amastigotas. No entanto, seu complexo apresentou IC_{50} menor para as amastigotas axênicas em relação a promastigotas. Nos CI, houve inibição máxima sobre crescimento de amastigotas axênicas de 79,5%, 88,1% e 95,3% para OELO CI, timol CI e carvacrol CI, respectivamente. Betaciclodextrina inibiu 49,0% do crescimento de amastigotas axênicas.

OELO apresentou resultados semelhantes a atividade antiparasitária frente a diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (BORGES et al., 2012). O timol e S-carvona, dois dos principais componentes dos óleos essenciais de espécies de *Lippia* avaliados por ESCOBAR et al. (2010), foram ativos contra a forma amastigota intracelular de *T. cruzi*, com CI_{50} 3,2±0,4 µg/ml e 6,1±2,2 µg/ml, respectivamente. O *Tripanossoma sp.* e a *Leishmania sp.* pertencem a mesma família, a *Tripanosomidae*, apresentando duas formas evolutivas em comum, a

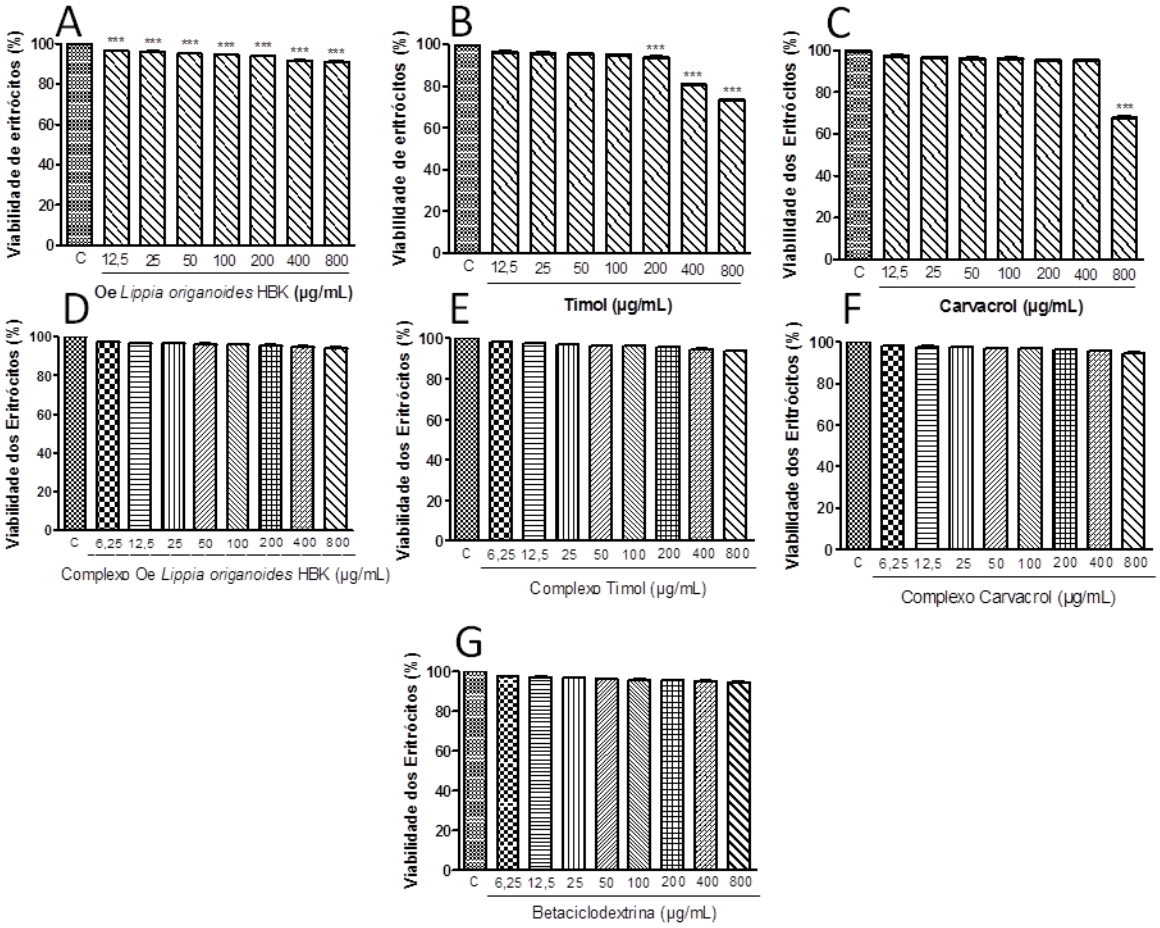
promastigota e a amastigota (NEVES, 2004). Além disso, *Leishmania sp. e Trypanosoma sp.* apresentam algumas semelhanças bioquímicas e potenciais alvos para inibição, como, por exemplo, as enzimas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo (BERNARDES; ZANI; CARVALHO, 2013).

Além da citotoxicidade sobre macrófagos murinos, com o objetivo de avaliar o perfil de segurança dos compostos avaliados, avaliou-se ainda sua toxicidade sobre hemácias de carneiro (Figura 4). Em laboratórios, o teste de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de derivados de plantas medicinais (RODRIGUES et al., 2015). A hemólise pode ocorrer como consequência de compostos presentes nos produtos naturais (PAULA et al, 2014) ou até mesmo por fármacos amplamente utilizados e que são tóxicos às membranas dos eritrócitos, dentre eles alguns antimicrobianos e antiparasitários (CITAK et al., 2002; SHEKALAGHE et al., 2010).

Pesquisas iniciais geralmente utilizam a forma promastigota do parasita devido a facilidade de cultivo e manipulação. No entanto, como o promastigota é a forma do parasita no inseto vetor, não sendo o alvo apropriado para um fármaco antileishmania. O advento da cultura *in vitro* bem-sucedida de amastigotas axênicas permite o desenvolvimento de um rastreio primário rápido e fácil como o modelo promastigota, mas ainda representativa da situação *in vivo*, uma vez que utiliza a fase parasitária relevante, que está presente no hospedeiro vertebrado (CALLAHAN, H.L. et al, 1997; FUMAROLA; SPINELLI, BRANDONISIO, 2004; DE MUYLDER et al, 2011).

Na Figura 4, observamos praticamente 100% de viabilidade dos eritrócitos quando os compostos foram complexados com betaciclodextrinas, demonstrando a redução da sua toxicidade sobre a membrana de tais células.

Figura 5 - Teste de hemólise sobre hemácias de carneiro.

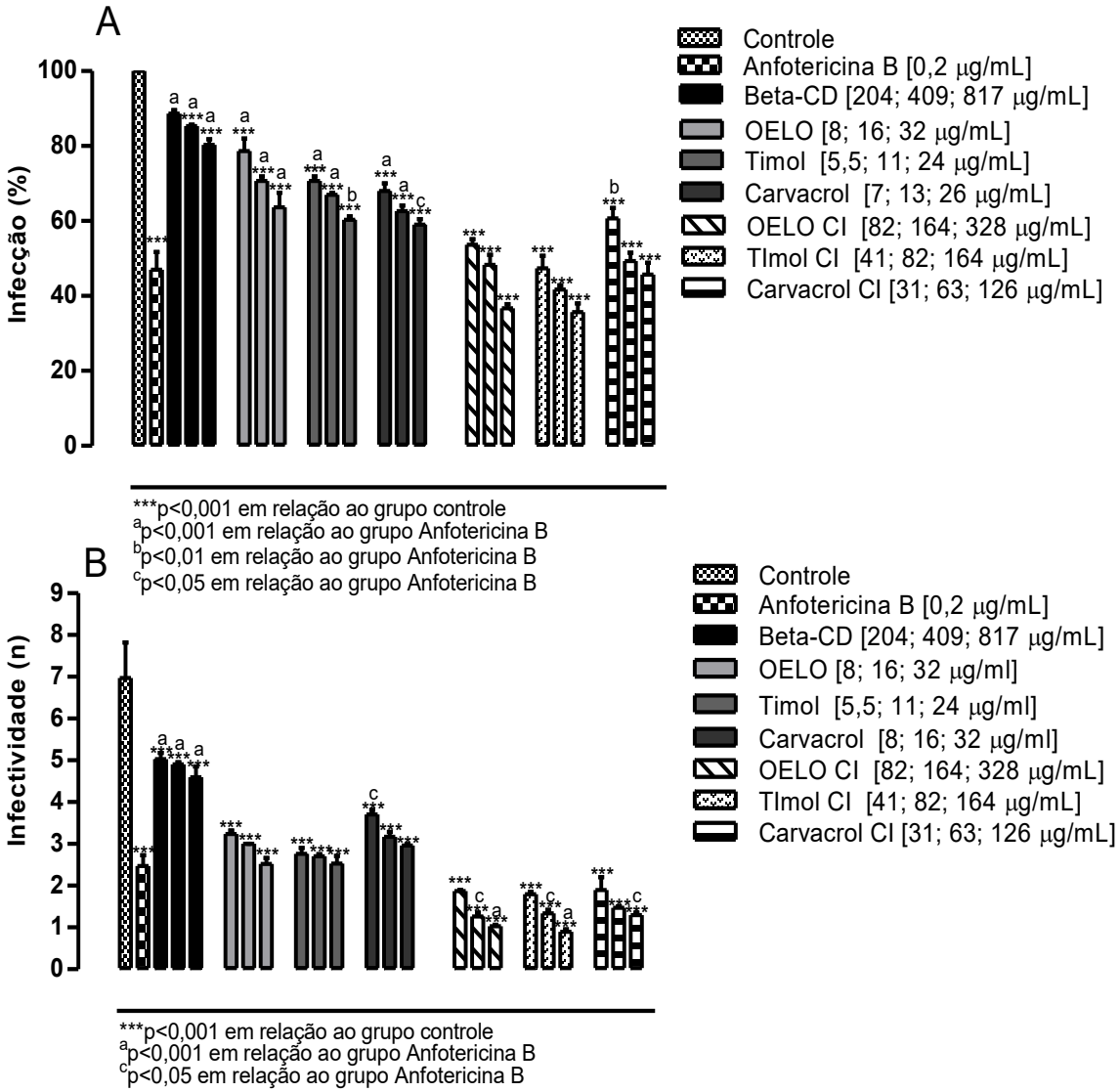


Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E=timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina. Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Com o propósito de se avaliar o mecanismo de atividade antileishmania frente as formas amastigotas axênicas, a atividade imunomoduladora das preparações foi testada através dos protocolos de avaliação de ativação, tais como a indução dos macrófagos a sintetizarem óxido nítrico (NO), além de aumento de sua capacidade fagocítica e de seu volume lisossomal.

Para elucidar o efeito da droga sobre a produção de NO pelos macrófagos, a concentração de NO no sobrenadante de cada poço contendo meio de cultura foi quantificada. O NO tem papel importante sobre o processo inflamatório. Sua secreção em altos níveis por macrófagos ativados e neutrófilos exercem efeito citotóxico na defesa contra células tumorais, parasitas, fungos e outros microorganismos (IGNÁCIO et al., 2001).

Figura 5 - Efeito do OELO, timol, carvacrol e seus complexos de inclusão para avaliar a infecção (A) (% macrófagos infectados) e infectividade (B) (nº amastigotas por macrófago) sobre macrófagos murinos infectados por *L. amazonensis.* As células foram tratadas durante 48 h de incubação com concentrações correspondentes ao valores de [1/2 CI_{50} ; 1x CI_{50} ;2x $CI_{50\ s}$] do OELO, timol, carvacrol e seus complexos de inclusão obtidos sobre as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Os resultados correspondem a Média±EPM (n=3). Teste de Bonferroni.



Legenda: CI = complexo de inclusã. Beta-CD = β-ciclodextrina. OELO = óleo essencial de *Lippia origanoides.* Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Amastigotas isoladas de macrófagos têm mostrado diferenças em vários processos celulares, incluindo o transporte intracelular, metabolismo, e a resposta ao estresse oxidativo. Estas observações realçam a importância do macrófago hospedeiro na condução do parasita para adaptações específicas. O modelo amastigota axênico tem, portanto, limitações, pois não abrange muitos aspectos do desenvolvimento do parasita intracelular (BUCKNER, WILSON, 2005; DE MUYLDER et al, 2011). Dessa forma, o modelo experimental de amastigotas internalizadas em macrófagos tem sido utilizado em alguns estudos, objetivando retratar de forma mais fidedigna, *in vitro*, a infecção que ocorre no hospedeiro vertebrado (CARNEIRO et al., 2012; RODRIGUES et al, 2015; OLIVEIRA et al, 2017)**.**

Na avaliação do efeito do OELO, timol, carvacrol e seus complexos sobre formas amastigotas internalizadas (Figura 5, 6 e 7), o controle negativo mostrou 100% de macrófagos infectados, enquanto que a anfotericina B, na concentração de 0,2 µg/mL, foi capaz de reduzir a taxa de infecção em 53% em relação ao grupo controle. Observou-se que a redução dos macrófagos infectados tratados foi dependente da concentração testada. O OELO, o timol, o carvacrol e a betaciclodextrina, livres e complexados foram capazes de reduzir a infecção e infectividade em macrófagos parasitados por *L. amazonensis*, nas concentrações testadas.

A betaciclodextrina na maior concentração testada (817 µg/mL) apresentou taxa de infecção em torno de 80%, demonstrando que mesmo em concentrações elevadas, exerceu a menor atividade dentre os compostos testados. Já o timol, nas maiores concentrações testadas, reduziu a taxa de infecção para 60 %. Enquanto o Timol CI, apresentou a melhor atividade dentre os compostos testados, reduzindo para 35% a taxa de infecção.

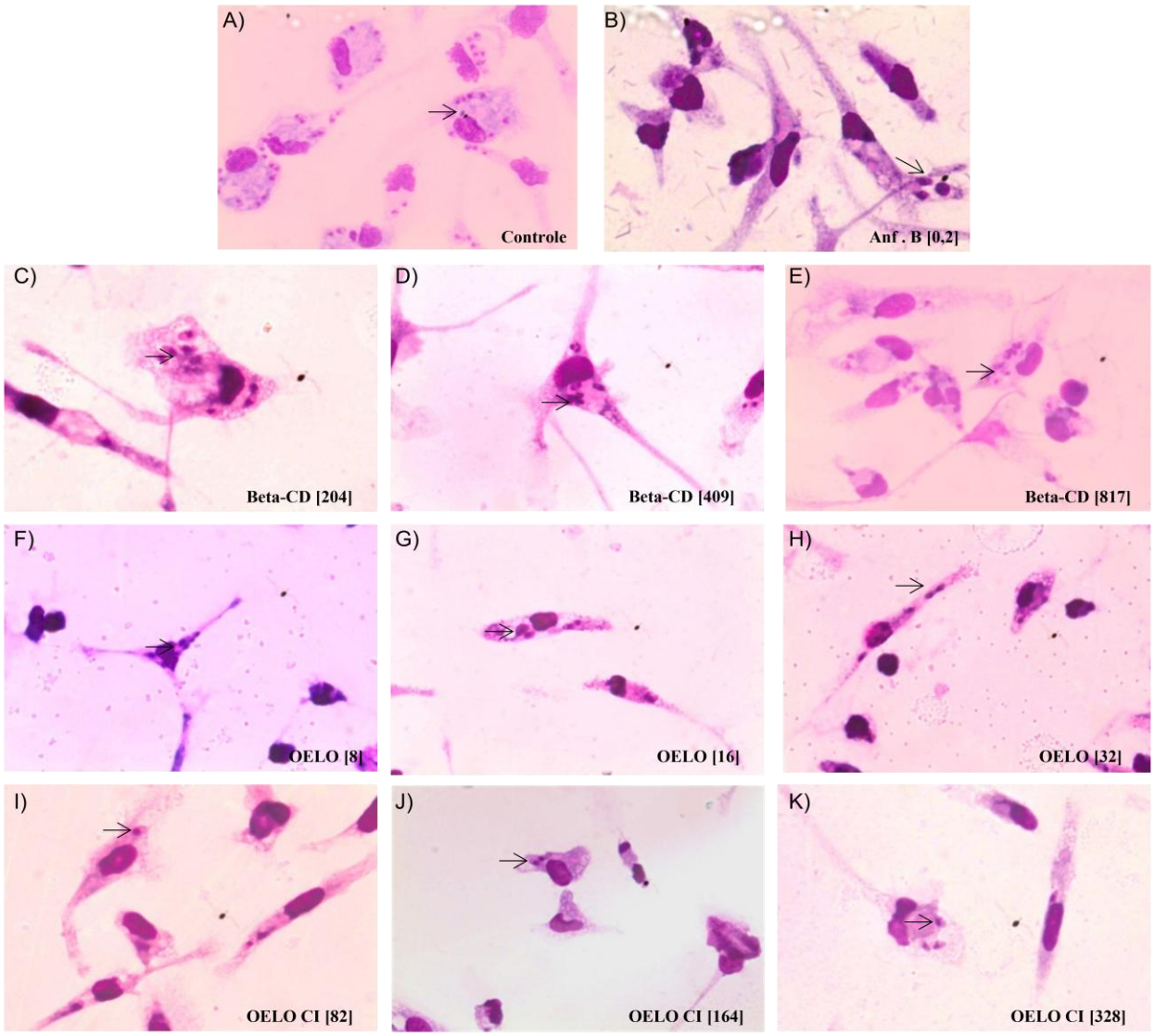
O OELO mostrou taxa de infecção em torno de 63%, na concentração de 32 µg/mL. Já o OELO CI reduziu para 36% a taxa de infecção na concentração de 328 µg/mL. O carvacrol demostrou melhor atividade que o OELO, reduzindo a taxa de infecção para em média 59% na maior concentração testada de 26 µg/mL. Já carvacrol CI (126 µg/mL) reduziu para 45% a infecção.

Com relação a infectividade, o controle mostrou em média 7 amastigotas/macrófago. A anfotericina B (0,2 µg/mL) reduziu esse índice para aproximadamente 2,5 amastigotas /macrófago. Nas maiores contrações testadas, o OELO e o timol reduziram a infectividade para a média de 2,5 amastigotas/macrófago, enquanto o OELO CI mostrou uma média de 1 amastigota /macrófago, e para o timol complexado, a média de amastigotas/macrófagos foi de 0,9.

O tratamento com betaciclodextrina reduziu a média de amastigotas/macrófago para 4,8 na concentração de 817 µg/mL A redução na infectividade obtida no tratamento com

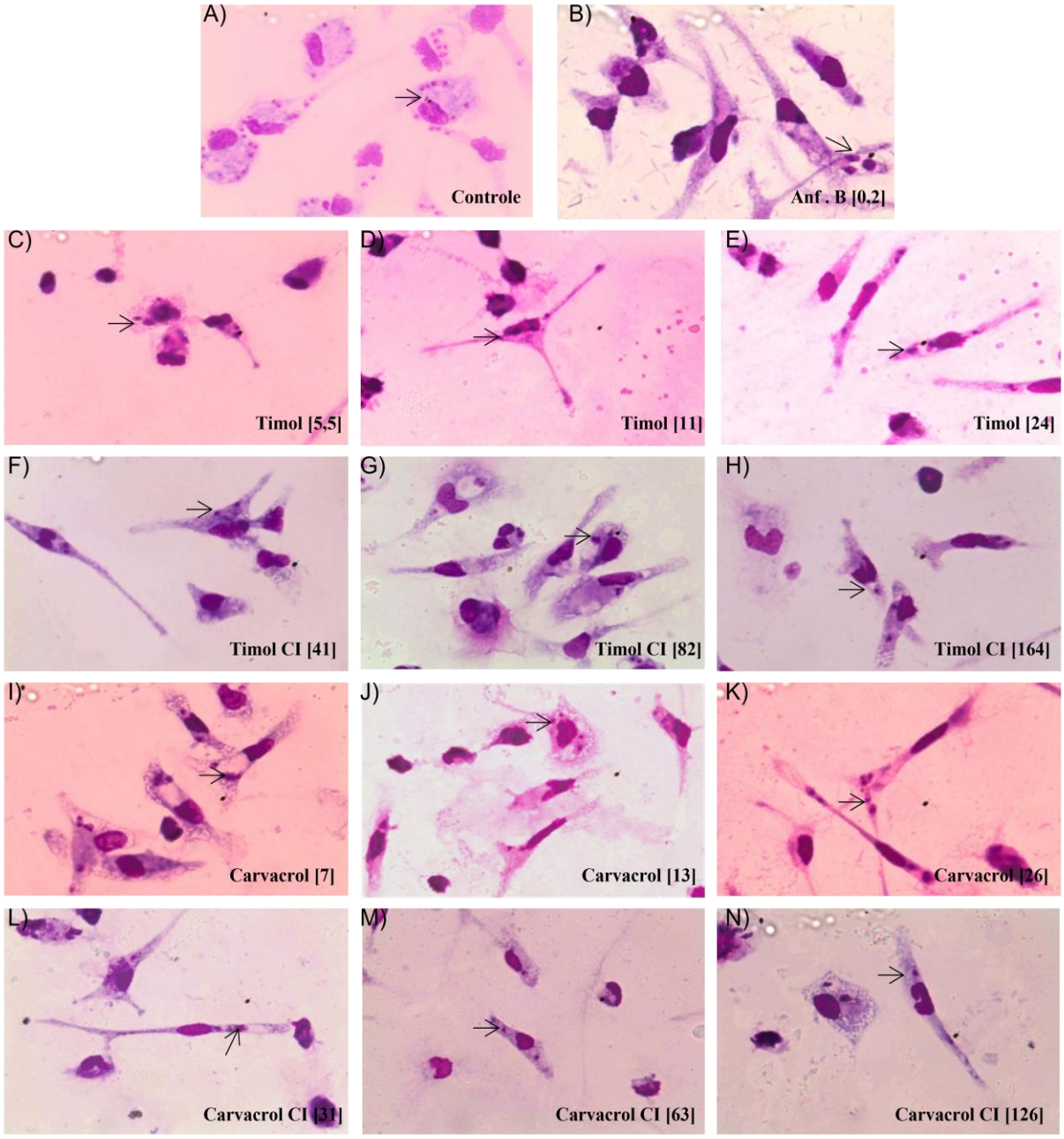
carvacrol (2,9 amastigotas/macrófagos em 32 µg/Ml) e seu complexo, foi inferior aos resultados obtidos com o timol e OELO.

Figura 6 - Macrófagos experimentalmente infectados por *L. amazonensis* e tratados com betaciclodextrina (Beta-CD), OELO e OELO CI. As células foram tratadas durante 48 h de incubação com concentrações correspondentes aos valores [1/2CI_{50} ;1x CI_{50} ;2x CI_{50}] em µg/mL do OELO e seu complexo de inclusão obtidos sobre as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Aumento de 1000x.



Legenda: CI = complexo de inclusã. Beta-CD = β-ciclodextrina. OELO = óleo essencial de *Lippia origanoides.* Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Figura 7 - Macrófagos experimentalmente infectados por *L. amazonensis* e tratados com timol, timol CI, carvacrol e carvacrol CI. As células foram tratadas durante 48 h de incubação com concentrações correspondentes aos valores [1/2CI_{50} ;1x CI_{50} ;2x CI_{50}] em µg/mL do timol, carvacrol e seus complexos de inclusão obtidos sobre as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Aumento de

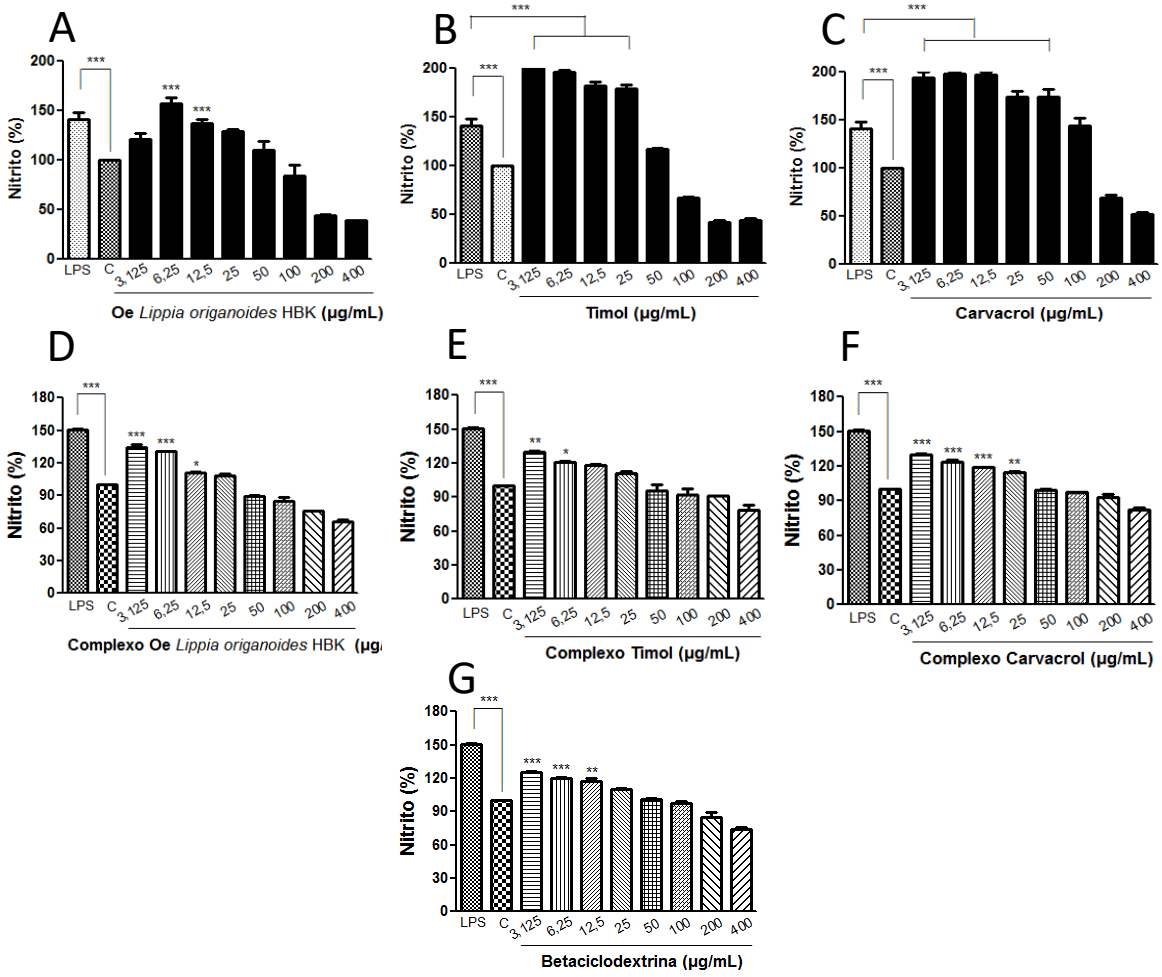


1000x.

Legenda: CI = complexo de inclusã. Beta-CD = β-ciclodextrina. OELO = óleo essencial de *Lippia origanoides.* Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Estudos mostram que, devido a interação com colesterol da membrana plasmática, as ciclodextrinas são capazes de reduzir a infecção de macrófagos por promastigotas de *L. amazonensis* provavelmente por afetar a ligação do parasita à superfície celular e uma redução no número de parasitas intracelulares na forma amastigota é observado (PUCADYIL; CHATTOPADHYAY, 2006).

Figura 8 - Teste de óxido nítrico. a: p<0,001 quando se comparou grupo controle em relação a LPS; b: p<0,05 a p<0,001 em relação ao grupo LPS; c: p<0,05 a p<0,001 em relação ao grupo controle (C). Teste de Bonferroni. Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E = timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina; LPS: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.



Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E=timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina. Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Conforme se observa nos resultados, lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) foi utilizado como controle positivo e foi capaz de induzir em todos os grupos o aumento significativo de NO em relação ao grupo controle (Figura 8). Todos os compostos foram capazes de induzir aumento de NO em relação ao grupo controle, com significância estatística variável entre os grupos em relação as maiores concentrações. Timol e carvacrol foram capazes de induzir o aumento de NO de forma estatisticamente superior ao LPS.

Parâmetros de ativação de macrófagos e imunomodulação, como o aumento do volume lisossomal e da fagocitose, foram avaliadas com base na retenção do vermelho neutro e fagocitose de zymosan internalizados nos macrófagos. Conforme observado nas Figuras 7 e 8, somente os grupos OELO e cavacrol foram capazes de aumentar de forma estatisticamente significativa a retenção do vermelho neutro nas vesículas secretórias de macrófagos nas concentrações de 6,25 a 50 μg/mL. Timol e grupos em CI não foram capazes de aumentar a retenção de vermelho neutro de forma estatisticamente significativa, mas acentuaram a fagocitose de zymozan em macrófagos para as menores concentrações dos compostos.

De formas geral, no presente trabalho, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, as formas amastigotas de *Leishmania* apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com os compostos utilizados do que as formas promastigotas. Diferenças metabólicas e bioquímicas entre tais formas evolutivas (GUPTA et al., 2001) podem explicar tais resultados, além da sua capacidade imunomoduladora e de ativação dos macrófagos (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005). Esse resultados indicam ainda que o aumento da capacidade fagocítica associado ao aumento do compartimento lisossomal possa contribuir para a atividade antileishmania dos macrófagos induzida pelos compostos testados. Os macrófagos apresentaram produção aumentada de NO comparado ao controle, o que não ocorreu nas maiores concentrações possivelmente devido ao efeito citotóxico nas maiores concentrações de todos os compostos testados (Figura 3).

A capacidade de ativação da fagocitose de zimosan e o aumento do volume lisossomal variou entre os grupos, principalmente em relação ao timol que não apresentou aumento significativo da capacidade fagocítica. Além disso, tais compostos em CI foram capazes de aumentar de forma significativa o volume lisossomal. Já para a capacidade fagocítica, os compostos em CI induziram de forma significativa a fagocitose de zimozan. Estudos demonstram que algumas betaciclodextrinas podem apresentar efeitos sobre mecanismo de reprogramação celular e atividade antiinflamatória em macrófagos humanos (ZIMMER et al., 2016).

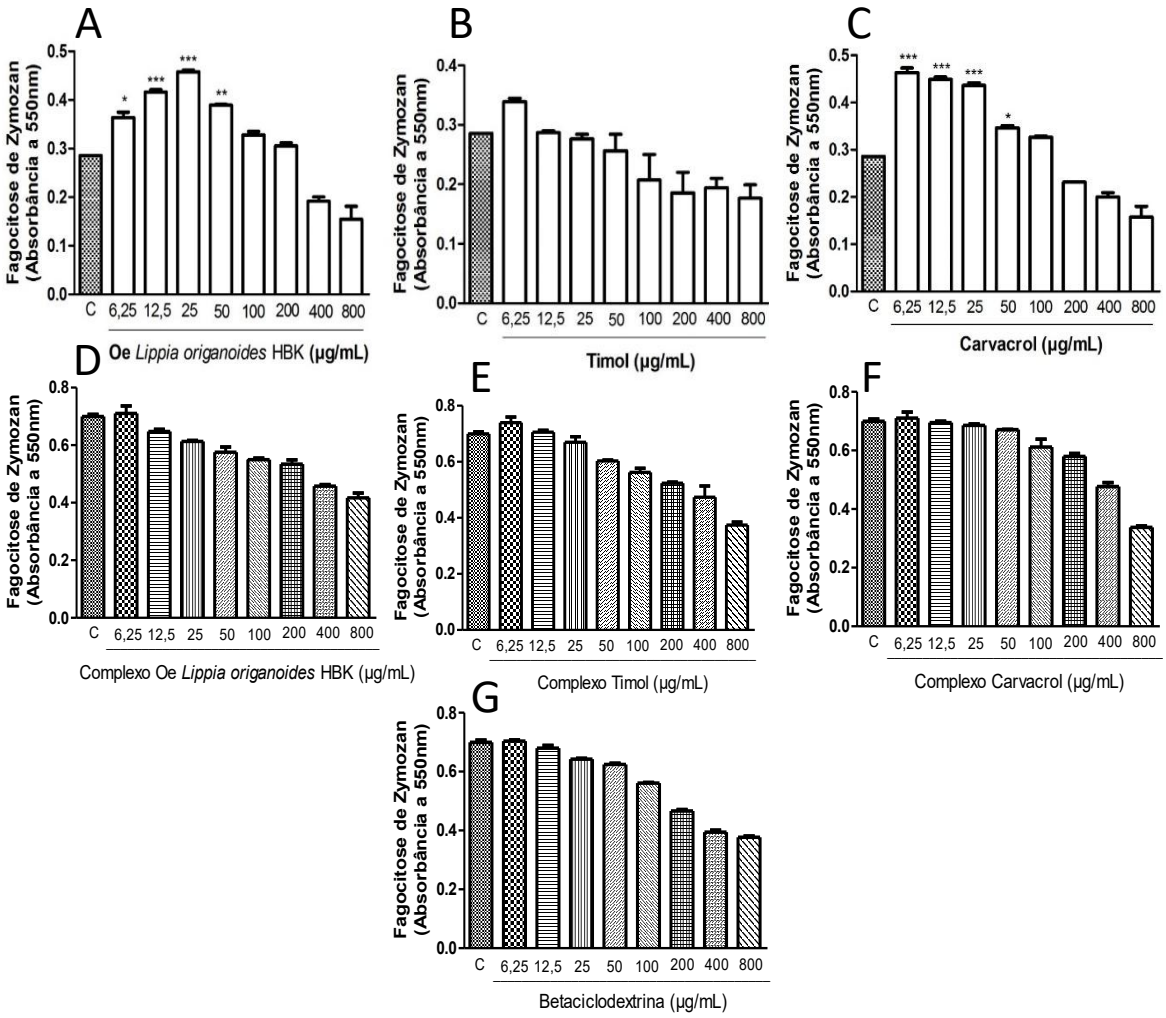
Outros componentes do OELO podem atuar sobre o efeito antileishmania deste óleo essencial tanto de forma sinérgica ou até mesmo antagônica, além de poderem atuar em diferentes receptores celulares nas células imunológicas e nos parasitas (BAKKALI et al., 2008).

Quanto maior foi a concentração de composto utilizado neste trabalho, maior foi sua capacidade citotóxica sobre os macrófagos, o que pode explicar a redução da atividade imunomoduladora observada para as maiores concentrações (Figuras 8-10). Além disso, componentes de óleos essenciais são conhecidos por apresentarem efeito citotóxico através da interação com ácidos graxos e fosfolipídeos das membranas celulares (LIANG et al., 2012; BAKKALI et al., 2008) e, de certa forma, a betaciclodextrina pode ter reduzido a interação dos compostos utilizados sobre as membranas celulares dos macrófagos.

De acordo com estudos prévios, OELO e seus constituintes majoritários avaliados apresentaram eficiência de incorporação em torno de 80%, o que justifica a reduzida potência sobre formas promastigotas e amastigostas axênicas quando tais compostos estão em CI (dados não mostrados). Apesar disto, tais compostos quando em CI demonstraram significativa redução de citotoxicidade sobre macrófagos murinos e hemácias de carneiro e mantendo sua atividade antileishmania variando de 66,3% até 95,3% (com resultados próximos aos compostos sem betaciclodextrinas).

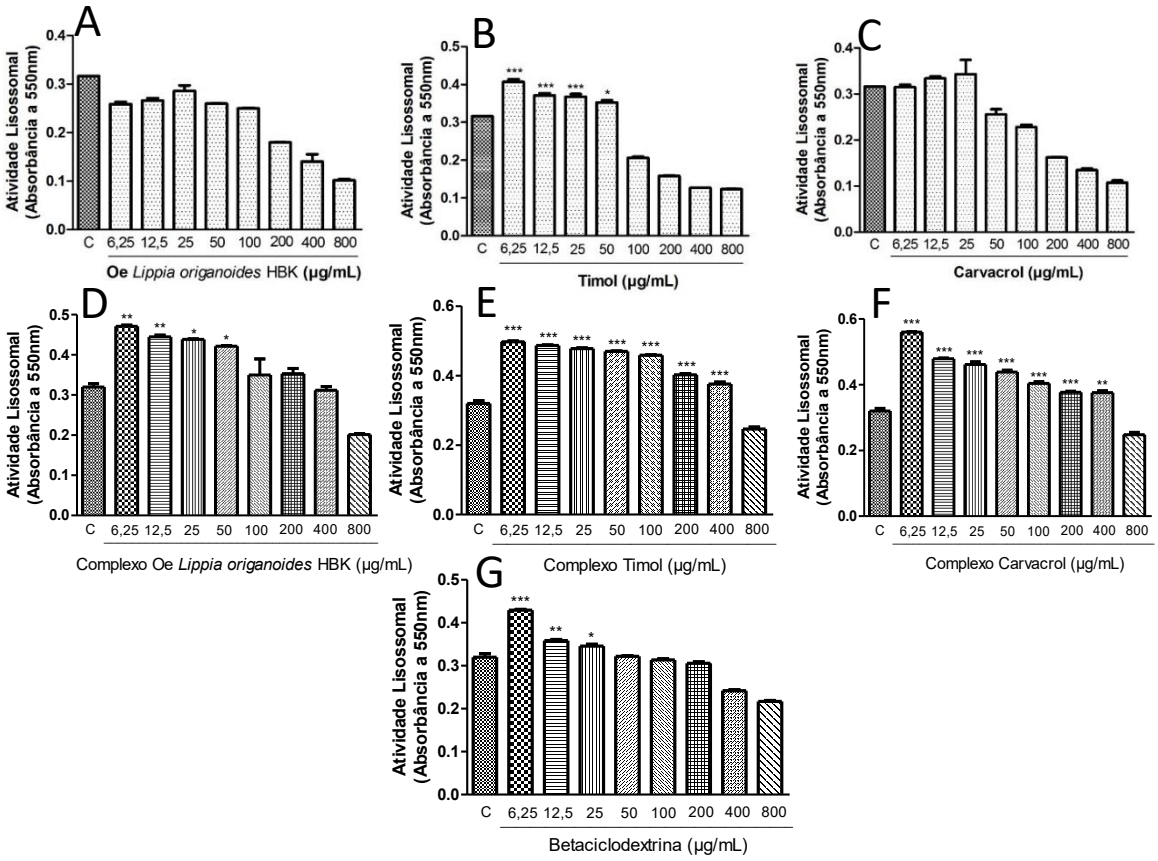
A avaliação do efeito dos compostos testados sobre formas amastigotas internalizadas (Figuras 6 e 7) veio corroborar os resultados de ativação de macrófagos para indução de NO, ativação fagocitária e aumento do volume lisossomal. Considerando que no protocolo realizado os compostos são incubados após a fagocitose das amastigotas pelos macrófagos, poderá haver a ativação de tais células via receptores extracelulares (em intensidades diferentes) pelo OELO, timol, carvacrol e seus complexos, e até mesmo intracelulares, tendo em vista que estudos demonstram que as betaciclodextrinas podem interferir nas jangadas lipídicas na membrana celular de macrófagos e, dessa forma reduzir a sua interação com o parasita e a sua internalização (PUCADYIL et al., 2004; PUCADYIL; CHATTOPADHYAY, 2006).

Figura 9 - Teste de capacidade fagocítica. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste de Bonferroni.



Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E=timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina. Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

Figura 10 - Teste de volume lisossomal.*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste de Bonferroni.



Legenda: CI = complexo de inclusão; A = OELO; B = timol; C = carvacrol; D = OELO CI; E=timol CI; F = carvacrol CI; G = betaciclodextrina. Fonte: Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais.

A formação de CI com betaciclodextrinas podem aumentar a solubilidade de certos compostos, além de sua taxa de dissolução, liberação, biodisponibilidade e a intensidade e duração do efeito terapêutico (KURKOV; LOFTSSON, 2013; MARQUES, 2010). Estudos recentes de carvacrol em CI com betaciclodextrinas vem demonstrando o incremento do seu efeito farmacológico *in vivo* em modelos de dor (SILVA et al., 2016b; GUIMARÃES et al., 2015) e atividade antimicrobiana (LIANG et al., 2012).

Os estudos encontrados reforçam a importância das ciclodextrinas na formação de CI com diversos derivados de produtos naturais. Os resultados deste trabalho evidenciam ainda a tese do potencial uso do OELO e seus constituintes majoritários timol e carvacrol em CI como uma futura alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose. No entanto, tais

resultados são preliminares e outros estudos da etapa pré-clínica são necessários, como avaliação *in vivo* da eficácia clínica em modelos animais, além de estudos adicionais de incorporação destes CI em possíveis formas farmacêuticas orais, parenterais ou tópicas.

4 CONCLUSÃO

De acordo com o resultados apresentados, OELO e seus constituintes majoritários apresentaram efeito antileishmania sobre formas promastigotas, amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e formas amastigotas internalizadas, bem como apresentaram ainda tais efeitos quando foram complexados com betaciclodextrinas. A formação dos CI reduziu de forma significativa a citotoxicidade sobre macrófagos murinos e hemácias de carneiro. Os compostos testados reduziram a infecção e infectividade de macrófagos parasitados, atuando também através de vias de ativação de macrófagos, tais como aumento da síntese de NO, da capacidade fagocitária e incremento no volume lisossomal. Os resultados deste trabalho evidenciam o potencial uso do OELO e seus constituintes majoritários timol e carvacrol em CI como uma futura alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose. Investigações futuras serão realizados para avaliar seu efeito terapêutico em modelos experimentais

REFERÊNCIAS

BADKE, M. R.; et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v.21, n.2, p.363-370, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils-a review. **Food Chem Toxicol**. v. 46, n.2, p. 446-75, 2008.

BARATA, L.E.S. et. al. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochem.** v.55, p.589-595, 2000.

BERNARDES, L. S. C.; ZANI, C. L.; CARVALHO, I. Trypanosomatidae Diseases: From the Current Therapy to the Efficacious Role of Trypanothione Reductase in Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry.** v. 20, p. 2673-2696, 2013.

BHATTACHARYA, P. et al. *In Vitro* susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes to piperolactam A loaded hydroxypropyl-β-cyclodextrin nanoparticles. **Acta Tropica**. v. 158, p. 97–106, 2016.

BARROS, L. M. et al. Chemical Characterization and Trypanocidal, Leishmanicidal and Cytotoxicity Potential of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) Essential Oil. **Molecules**. v. 21, n.2, p. 209, 2016.

BERNUCI, K. Z. Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of Piper Species. **Molecules**. v. 21, p. 1698, 2016**.**

BITENCOURT, J. J. G et al. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: Improving miltefosine stability and reducing its hemolytic potential toward erythtocytes and its cytotoxic effect on macrophages. **Biophysical Chemistry.** v. 217, p. 20–31, 2016.

BONATTO, S. J. R. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology,** v. 231, n. 1-2, p. 56–62, 2004.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and citotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology.** v. 132, n. 2, p. 123–128, 2012.

BUCKNER, F. S.,WILSON, A.J. Colorimetric assay for screening compounds against Leishmania amastigotes grown in macrophages. **Am J Trop Med Hyg**. v.72,p. 600–605,2005.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J., STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from Cymbopogon martini, Cymbopogon flexuosus and Lippia origanoides cultivated in Colombia against Tribolium castaneum. **Journal of Stored Products Research.** v. 50, p. 62–65, 2012.

CARNEIRO, S.M.P. et al. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits ofAzadirachta indica(A Juss.). **Biological Research.** v. 45, n. 2, p. 111–116, 2012.

CITAK, A. et al. Ceftriaxone-induced haemolytic anaemia in a child with no immune deficiency or haematological disease. **Journal of Paediatrics and Child Health.** v. 38, n.2, p. 209-210, 2002.

CORREA, J.E. et. al. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with Antileishmanial Activity. **Planta Medica**. v.72, n.3, p.270-272, 2006.

COSTA, E.V. et al. A pyrimidine-β-carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **J. Nat. Prod.** v.69, n.2, p.292-294, 2006.

DE MUYLDER, G. et al. A screen against Leishmania intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 5, n.7, p. 1253.

DEMICHELI, C. et al. Oral Delivery of Meglumine Antimoniate-β-Cyclodextrin Complex for Treatment of Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 48, n. 1, p.100–103, 2004.

DUARTE, M. C. et al. Antileishmanial activity and mechanism of action from a purified fraction of *Zingiber officinalis* Roscoe against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology.** v.166, p. 21-28, 2016.

ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major componentes. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 105, n. 2, p.184-190, 2010.

FERREIRA, M. E. et. al. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **J. Ethno,** v.80, p.199-202, 2002.

GRANDO, F.C.C. et al. Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 42, n. 7, p. 599–605, 2009.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions.** v. 227, p. 69–76, 2015.

GUPTA, N., GOYAL, N., RASTOGI, A.K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of Leishmania. **Trends in Parasitology**. v. 17, n. 3, p. 150–153, 2001.

HORTA, M. F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. J**. Parasitol Res**. v. 11, n. 2, e0148084, 2016.

IGNÁCIO, S.R. et al. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with Phyllanthus tenellus extracts. **J Ethnopharmacol.** v. 74, n.2, p.181-187, 2001.

ISNARD, A.; SHIO, M.T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 2, p.72, 2012.

KAYSER, O. et al. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Trop**. v. 77, p. 307-314, 2000.
KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Curr. Med. Chem**. v.16, n.5, p.599-614, 2009.
KOLODZIEJ, H.; KIDERLEN, A.F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**. v. 66, n. 17, p. 2056–2071, 2005.
KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **Int. J. Pharm**. v. 453, n.1, p. 167–180, 2013.
LIANG, H.; YUAN Q.; VRIESEKOOP, F.; LV, F. Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds. **Food Chemistry.** v. 135, n. 3, p. 1020–1027, 2012.
LIMA, G. S. et al. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomed.,** v.22, n.12, p.1133-1137, 2015.
LÖFGREN, S.E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology.** v.118, n. 2, p.197–202, 2008.
MAHMOUDVAND, H. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Antileishmanial Activities of *Pistacia vera* Essential Oil. **Planta Med.** v. 82, n.4, p. 279-84, 2016.
MARQUES, H.M.C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour Fragrance J**. v. 25, p. 313–326, 2010.
MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica experimental.** Fortaleza: UFC, p.126, 1998.
MEDEIROS, M. G. F. et al. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol Int.** v. 60, n.3, p. 237-241, 2011.
MELO, J. O. et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**. v. 128, p. 110– 115, 2013.
MENESES, R. et al. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v. 6, p.8, 2009.
MESA, A.C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** *v.* 104, p. 878-884, 2009.
NARDELLO-RATAJ, V.; LECLERCQ, L. Encapsulation of biocides by cyclodextrins: toward synergistic effects against pathogens. **Beilstein J Org Chem**. v. 10, p. 2603–2622, 2014.
NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
OLIVEIRA, L.G.C. et al**.** In vitro effects of the Neolignan 2,3-Hihydrobenzofuran against *Leishmania amazonensis***. Basic** & **Clin Pharm** & **Toxicol,** v. 1, n.1, p.1-7, 2017.
OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **J Ethnopharmacol,** v. 111, n. 3, p. 630-5, 2007.
OSPINA, D. I. et al. Evaluacion de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lipppia origanoides* H.B.K. sobre el desarollo micelial y la formacion de esclerocios de Sclerotium cepivorum Berk. **Acta Agronomica**. v. 60, p. 306–311, 2011.
PASCUAL, M.E. et al. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J Ethnopharmacol.** v. 76, n. 3., 201-214, 2001.
PAULA, C.S. et al . Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de Dasyphyllum tomentosum (Spreng.) Cabrera. **Rev. bras. plantas med.,** v. 16, n. 2, p. 189-195, 2014.

PHAM, T.T.; LOISEAU, P.M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **Int J Pharm**. v.454, n.1, p.539-552, 2013.

PUCADYIL, J.U.; TEWARI, P.; MADHUBALA, R.; CHATTOPADHYAY, A. O colesterol é necessário para a infecção por Leishmania donovani. **Parasitol. Molecular & Biochem.**, v. 133, n. 2, p. 145-152, 2004.

PUCADYIL, T. J.; CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol: a potential therapeutic target in Leishmania infection?. **TRENDS in Parasitology**. v. 23, n. 2, p. 49-53, 2006.

RODRIGUES, K. A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α-pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **J Ethnopharmacol**. v. 160, p. 32-40, 2015.

ROJAS-AGUIRRE, Y. et al. Studies on 6-chloro-5-(1-naphthyloxy)-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole/2 hydroxypropyl-b eta-cyclodextrin association: characterization, molecular modeling studies, and in vivo anthelminthic activity. **Bioorg. Med. Chem**. v. 19, p. 789–797, 2011.

RUIZ, H. K. et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania spp*. **Int J Pharm.** v. 473, n.1-2, p.148-157, 2014.

SANTOS, F. J. B. et al. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**. v. 16, n. 5, p. 504–506, 2004.

SARRAZIN, S. L. et al. Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Lipids Health Dis**. v. 14, p.145, 2015.

SHEKALAGHE, S. A. et al. In Tanzania, hemolysis after a single dose of primaquine coadministered with an artemisinin is not restricted to glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (G6PD A−) individuals. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** v. 54, n.5, p.1762-1768, 2010.

SILVA, C. V. N. S. et al. Molecular modeling and cytotoxicity of diffractaic acid: HP-β-CD inclusion complex encapsulated in microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 92, p. 494–503, 2016a.

SILVA, J. C. et al. Enhancement of orofacial antinociceptive effect of carvacrol, a monoterpene present in oregano and thyme oils, by b-cyclodextrin inclusion complex in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 84, p. 454–461, 2016b.

SILVA, M. A. Avaliação do uso combinado do triterpeno lupano e glucantime na infecção por *Leishmania amazonensis in vitro.* 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2009.

SOARES et al.,2007; Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtainedfrom Tabernaemontana catharinensis. **Parasitol Int**, v. 56, n. 2,p.135-9, 2007.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; SINGH, OP. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. **J Trop Med.** v. 1, p.646932, 2014.

STASHENKO, E. E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GCMS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**. v. 33, n. 1, p. 93–103, 2010.

TANGARIFE-CASTANO, V. et al. Anti-Candida albicans activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. **Infection.** v. 15, p. 160–167, 2011.

TORRES-SANTOS, E.C. *et. al.* Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antim. Agents Chemother.,** v.43, p.1234-1241, 1999.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International.** v. 55, n.2, p. 99–105, 2006.

VALADARES, D.G. et al. Leishmanicidal activity of the Agaricus blazei Murill in diffrent Leishmania species. **Parasaitol Int**, v. 60, n.4, p.357-63,2011.

VICUNA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the Lippia origanoides essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia.** v. 81, n. 5, p. 343–349, 2010.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**. v. 91, n. 22, p. 285 - 296, 2016.

ZIMMER, S. et al. Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming. **Sci Transl Med.** v. 8, p.333, 2016.

APENDICE 1

Revista Cubana de Farmacia, Volúmen 50, Número 2 (2016)

Rev Cubana de Farmacia. 2016;50(2)

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Produtos naturais para tratamento da leishmaniose: uma prospecção tecnológica

Natural products for leishmaniasis treatment: exploratory technology

Productos naturales para el tratamiento de la leishmaniasis: una tecnologia de exploración

Jéssica Freire da Silva,[I] Kayo Alves Figueiredo,[II] Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho[I]

[I] Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela s/n, 64049-550, Teresina-PI, Brasil.

[II] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí-Campus Teresina Central-Departamento de Saúde, Teresina, PI, Brasil.

RESUMO

Introdução: a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, atingindo populações de baixa renda, sobretudo em paises em desenvolvimento. Estima-se que 1,3 milhões de novos casos e 20 000 a 30 000 mortes ocorrem anualmente por leishmaniose. Devido à grande dificuldade de encontrar fármacos adequados, mais eficazes e menos tóxicos, para o tratamento dessa enfermidade, diferentes produtos naturais vêm sendo estudados na busca de novos agentes terapêuticos. **Objetivo:** realizar uma busca nos últimos 10 anos e apresentar um panorama do atual desenvolvimento científico e tecnológico

APÊNDICE 2

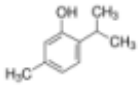
SIGMA-ALDRICH® sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Thymol - ≥99.0%

Product Number:	**T0501**
CAS Number:	89-83-8
MDL:	MFCD00002309
Formula:	C10H14O
Formula Weight:	150.22 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	White
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Colorless
Solubility (Turbidity) 50 mg/ml, EtOH	Clear
Infrared spectrum	Conforms to Structure
EmM in EtOH	2.30 - 2.38
Lambda Max	277 - 278 nm
Purity (GC)	≥ 99.0 %
Recommended Retest Period 3 years	----------

Specification: PRD.1.ZQ5.10000036731

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

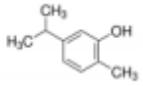
SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Carvacrol - ≥98%, FCC, FG

Product Number:	**W224502**
CAS Number:	499-75-2
MDL:	MFCD00002236
Formula:	C10H14O
Formula Weight:	150.22 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless to Faint Yellow
Appearance (Form)	Liquid
Refractive index at 20 °C	1.521 - 1.526
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Purity (GC)	≥ 98.0 %
Residual Solvent	≤ 890 ppm
Toluene	
Specific Gravity	0.974 - 0.980
Solubility (Turbidity)	Clear to Slightly Hazy
1ml/4ml 60% Ethanol	
Solubility (Color)	Colorless to Faint Yellow
Arsenic (As)	≤ 3 ppm
Cadmium (Cd)	≤ 1 ppm
Mercury (Hg)	≤ 1 ppm
Lead (Pb)	≤ 10 ppm
Expiration Date Period	----------
5 Years	

Specification: PRD.2.ZQ5.10000031424

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

SIGMA-ALDRICH®

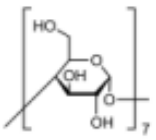
sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
β-Cyclodextrin - ≥97%

Product Number:	**C4767**
CAS Number:	7585-39-9
MDL:	MFCD00078139
Formula:	C42H70O35
Formula Weight:	1,134.98 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	White
Appearance (Form)	Powder
Infrared spectrum	Conforms to Structure
% Water (KF)	≤ 14
10 mol/mol	
Purity (TLC)	≥ 97 %
Recommended Retest Period	----------
3 Years	

Specification: PRD.1.ZQ5.10000035749

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.


Tuberculose
Hantavirose
Hanseníase
Malária
Chagas
Zika vírus
Malária
Raiva
Malária
Tracoma
Tracoma
Chikungunya
Dengue
Malária
Tuberculose
Filariose
CONDONER 2016
II Congresso Norte/Nordeste de Doenças
NEGLIGENCIADAS E REEMERGENTES
Uma nova era de desafios em um mundo sem fronteiras
CERTIFICADO
Certificamos que o trabalho intitulado: Atividade in vitro do óleo essencial de Lippia origanoides HBK, e seus majoritários, timol e carvacrol sobre formas promastigotas de Leishmania amazonensis., de autoria de JÉSSICA FREIRE DA SILVA FIGUEIREDO, MICHEL MUALÉM DE MORAIS ALVES, BÁRBARA CRISTINA SILVA HOLANDA QUEIROZ, BRENDA NAYRANNE GOMES DOS SANTOS, ANTONIA MARIA DAS GRAÇAS LOPES CITÓ, FERNANDO AÉCIO DE AMORIM CARVALHO, MARIA DAS GRAÇAS FREIRE DE MEDEIROS CARVALHO; foi apresentado na modalidade Pôster, durante o II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes, realizado no período de 23 a 26 de setembro de 2016, na Universidade Federal do Piauí - UFPI, campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí.
Parnaíba (PI), 26 de setembro de 2016.
Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite (UnB)
Presidente do evento, Professor Visitante, Universidade do Porto, Porto, Portugal.Professor Associado, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (FIOCRUZ)
Presidente da Comissão Científica - CONDONER 2016
Coordenador de Ensino da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/Piauí.
Realização
BioTec
Deta
Apoio Institucional

Acesse **https://doity.com.br/validar-certificado** para verificar se este certificado é válido. **Código de validação:** 9UUU1-A



CONDONER 2016

II Congresso Norte/Nordeste de Doenças NEGLIGENCIADAS E REEMERGENTES

Uma nova era de desafios em um mundo sem fronteiras

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado: Atividade antileishmania in vitro do óleo essencial de Lippia origanoides HBK, e seus majoritários, timol e carvacrol sobre formas amastigotas axênicas de Leishmania amazonensis., de autoria de Jéssica Freire da Silva Figueiredo, Michel Mualém de Moraes Alves, Adriana Cunha Souza, Fernando Aécio de Amorim Carvalho, Maria das Graças Freire de Medeiros Carvalho; foi apresentado na modalidade Pôster, durante o II Congresso Norte/Nordeste de Doenças Negligenciadas e Reemergentes, realizado no período de 23 a 26 de setembro de 2016, na Universidade Federal do Piauí - UFPI, *campus* Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí.

Parnaíba (PI), 26 de setembro de 2016.

Prof. Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite (UnB)
Presidente do evento, Professor Visitante, Universidade do Porto, Porto, Portugal.Professor Associado, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (FIOCRUZ)
Presidente da Comissão Científica - CONDONER 2016
Coordenador de Ensino da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/Piauí.

Realização

Apoio institucional