

Atividade anti-protozoário *in vitro* do *p*-Cimeno sobre *Leishmania amazonensis*

Jesieli Beraldo-Borrazzo

Universidade Estadual de Maringá – UEM
Contato: jesieliberaldo@gmail.com

Adriana Oliveira dos Santos

Universidade Estadual de Maringá – UEM
Contato: oi_dri@hotmail.com

Benício Alves de Abreu Filho

Universidade Estadual de Maringá – UEM
Contato: baafilho@uem.br

Lucindo José Quintans-Júnior

Universidade Federal de Sergipe – UFS
Contato: lucindojr@gmail.com

Celso Vataru Nakamura

Universidade Estadual de Maringá – UEM
Contato: cvnakamura@uem.br

Resumo: As doenças tropicais constituem um grave problema de saúde pública por serem negligenciadas e atingirem especialmente as populações mais pobres, dentre as quais, a leishmaniose é considerada dependente de tratamentos quimioterápicos insatisfatórios. Grandes esforços têm sido empregados na busca por novos medicamentos nas últimas décadas, sendo o uso da fitoterapia investigado com grande interesse, devido às plantas serem consideradas uma ampla fonte de compostos com potencial medicinal. A atividade anti-protozoário da substância *p*-Cimeno sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*, foi avaliado. Após 72 horas de cultivo, o *p*-Cimeno apresentou concentração inibitória de 50% (CI₅₀) igual à 65,0 µg/mL e 55,0 µg/mL sobre as formas promastigotas e amastigotas axênicas, respectivamente. Análises de citotoxicidade do *p*-Cimeno, foram realizadas por meio do método colorimétrico da sulforodamina-B sobre macrófagos J774.G8 e a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi de 54,0 µg/mL. Os dados obtidos indicam efeito antiparasitário do *p*-Cimeno sobre *Leishmania amazonensis*, principalmente sobre sua forma amastigota, sendo considerado potencial candidato para novos estudos contra o parasito.

Palavras-chave: Monoterpenos; anti-*Leishmania*; óleos essenciais.

In vitro p-Cymene antiprotozoal activity on *Leishmania amazonensis*

Abstract: Tropical diseases are a serious public health problem as they have been neglected and especially affect the poorest populations. Among these diseases, leishmaniasis is considered dependent on unsatisfactory chemotherapy treatments. Great efforts have been made in the search for new drugs in the last decades, and the use of herbal medicine has been investigated with great interest due to the fact that plants are considered a wide source of compounds with medicinal potential. This study evaluated the anti-protozoal activity of the substance *p*-Cymene on axenic promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. After 72 hours of culture, *p*-Cymene had an inhibitory concentration of 50% (CI₅₀) equal to 65.0 µg/mL on axenic promastigotes and 55.0 µg/mL on axenic amastigotes. Cytotoxicity analyses of *p*-Cymene were performed using the colorimetric method of sulforodamine-B on macrophages J774.G8 and the cytotoxic concentration for 50% of the cells (CC₅₀) was 54.0 µg/mL. The data obtained indicate antiparasitic effect of *p*-Cymene on *Leishmania amazonensis*, mainly on its amastigotic form and *p*-Cimene was considered a potential candidate for further studies against the parasite.

Keywords: Monoterpenes; anti-*Leishmania*; essential oils.

Como citar este artigo:

BERALDO-BORRAZZO, J.; dos SANTOS, A. O.; ABREU FILHO, B. A.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; NAKAMURA, C.V. Atividade anti-protozoário *in vitro* do *p-Cimeno* sobre *Leishmania amazonensis*. *Luminária*, União da Vitória, v.21, n.02, p. 06 – 16, 2019.

INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Leishmania* sp., são transmitidos através da picada de insetos flebotomíneos, popularmente conhecido como mosquito-palha, o qual abriga uma das formas de vida do parasito chamado de promastigota (GOTO; LINDOSO, 2012; CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2019). Esta se aloja no trato digestório destes insetos e posteriormente são transmitidas por repasto sanguíneo. A outra forma em que se apresenta o parasito, é denominado de amastigota, que por serem intracelulares obrigatórios, parasitam macrófagos celulares infectando hospedeiros vertebrados, dentre os quais, se destaca o homem (ALVAR et al. 2012; RODRIGUES et al., 2019). Desta maneira, a doença conhecida como leishmaniose, se desenvolve através deste ciclo de vida dimórfico do protozoário.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose é endêmica em 97 países, com aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas em todo mundo, ocorrendo de 1 a 2 milhões de novos casos de infecção por ano, que afetam principalmente populações da África, Ásia e América Latina (WHO, 2019).

A doença se distingue basicamente em duas formas clínicas: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT), que compreende a leishmaniose cutânea, cutânea difusa e mucocutânea (WHO, 2017). Estas últimas produzem ulcerações cutâneas e de tecidos mucosos que podem evoluir para o acometimento de órgãos nobres como baço, fígado e medula óssea, constituindo a forma mais grave e letal da doença (BELO et al. 2013; CANTANHÊDE et al. 2015). Para a espécie *Leishmania amazonensis* são atribuídas manifestações clínicas dos tipos cutânea e mucocutânea (BRASIL, 2017).

Atualmente o tratamento da leishmaniose apresenta alguns desafios, além de não haver vacina desenvolvida para impedir novas infecções, as drogas antimoniais pentavalentes

que foram desenvolvidas antes de 1960 ainda são utilizadas como primeira escolha para o tratamento. Estes medicamentos apontam alta toxicidade, com vários efeitos colaterais por haver necessidade de serem administrados por períodos de tempo prolongados, com alto custo e baixa eficácia (MENEZES et al., 2015; PONTE-SUCRE et al. 2017; CHARLTON et al. 2018). Complementarmente, os compostos de segunda escolha utilizados nos casos de recidiva, incluem a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina (NO, 2016; ARONSON et al., 2016). Para tanto, outros grupos de agentes quimioterapêuticos estão em fase experimental no tratamento contra a leishmaniose, são os inibidores de síntese do ergosterol, incluindo terbinafina e derivados de imidazol como: cetoconazol (KZT), itraconazol (ITZ) e clotrimazol (CTZ) (KHAMESIPOUR, 2014).

Diante disso, a quimioterapia disponível no momento atual ainda é limitada e insatisfatória, o que torna necessário à procura de novos agentes com propriedades terapêuticas para o tratamento da leishmaniose. Neste contexto, destacam-se os fitoquímicos. As plantas são reconhecidas importantes pela produção de compostos químicos naturais provenientes do seu metabolismo celular secundário, os quais apresentam propriedades medicinais e são caracterizados como óleos essenciais (NEWMAN; CRAGG, 2016; ULLAH et al. 2016; KUMAR et al., 2018).

O composto orgânico aromático chamado *p-Cimeno*, é encontrado constituindo diversos óleos essenciais, apresentando diversas aplicabilidades biotecnológicas na indústria farmacêutica. Sua atividade vai desde a antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer até efeito antinociceptivo (QUINTANS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; LIMA et al., 2018; SANTOS et al., 2019). Adicionalmente, é considerado um importante intermediário na síntese de antifúngicos, pesticidas e antimicrobianos (AGULLÓ et al. 2017; TIAN et al., 2018;

BENELLI et al., 2019).

No presente estudo, foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* da substância *p*-Cimeno, contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*, bem como seu efeito citotóxico sobre macrófagos da linhagem J774.G8.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilização do *p*-Cimeno

A substância teste utilizada neste estudo foi *p*-Cimeno (1-metil-4-(1-metiletil) benzeno), adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Manutenção das culturas de células

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) foram cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração, hemina e ácido fólico) pH 7,0 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco Invitrogen Corporation, New York, USA) e incubadas a 25 °C. As formas amastigotas foram mantidas em meio de Schneider (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 4,6 suplementado com 20% de SFB, incubadas a 32 °C. Macrófagos J774G8 foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma), pH 7,6, suplementado com 10% de SFB, incubadas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂.

Obtenção das formas amastigotas axênicas

As formas amastigotas axênicas foram obtidas a partir de formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA), conforme descrito em Ueda-Nakamura; Attias; Souza, 2001. Para isso, formas promastigotas com 72 h de cultivo foram semeadas em meio de Warren pH 7,0 suplementado com 20% de SFB e incubadas a 25 °C por 48 h. Essas culturas foram transferidas para a estufa a 30 °C onde permaneceram durante 24 h. Após esse tempo, foram incubadas a 32 °C até a diferenciação para serem semeadas em meio Schneider pH 4,6 suplementado com 20% de SFB, com incubação nessa mesma temperatura, conforme descrito anteriormente.

Atividade antiproliferativa do *p*-Cimeno

sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas

Para determinar a atividade inibitória do *p*-Cimeno no crescimento de *L. amazonensis*, formas promastigotas e amastigotas axênicas com 48 h de cultivo foram semeadas com um inóculo inicial de 1x10⁶ células/ml em meio Warren ou Schneider, respectivamente, em placas de 24 e 12 poços estéreis na presença ou na ausência do *p*-Cimeno solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido - Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a 1%. A inibição do crescimento foi avaliado através da contagem em câmara de Neubauer após 72 h de tratamento. Os resultados foram expressos através do percentual de inibição de crescimento em relação ao controle.

Ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico da sulforodamina-B

O efeito citotóxico do *p*-Cimeno sobre macrófagos J774.G8, foi determinado a partir de culturas com 72 h, com um inóculo inicial de 5 x 10⁵ células/ml em RPMI 1640. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços estéreis, com incubação a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ durante 24 h para a formação de uma monocamada de células. Após esse tempo, a monocamada de células foi tratada com várias concentrações do *p*-Cimeno e incubada por mais 48 h. A inibição do crescimento celular foi avaliada por meio do método colorimétrico da sulforodamina B, segundo Skehan et al. (1990). A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek FL-600 Microplate Fluorescence Reader), em densidade óptica (DO) de 530 nm. Os resultados foram expressos através do percentual de inibição de crescimento em relação ao controle.

Índice de Seletividade

Conforme descrito por Santin et al. (2009), para determinar a seletividade citotóxica da substância testada, o índice de seletividade (IS) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ para células de mamíferos}}{IC_{50} \text{ para protozoários}}$$

CC₅₀ = Concentração citotóxica de 50%

IC₅₀ = Concentração inibitória de 50%

Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas e os dados foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA). O teste t Student's foi aplicado, e um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo comparado ao grupo controle. A análise estatística foi realizada com o programa Graph-Pad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose a fim de obter novos medicamentos com atividade leishmanicida eficaz e de baixa toxicidade representa uma necessidade urgente. Pois, de acordo com estudos realizados por Bezerra et al. (2018), a incidência do tipo mais grave da doença a leishmaniose visceral, aumentou em 53% entre os anos de 1990 a 2016 no Brasil, acometendo em 26% de crianças menores de um ano de vida. Alvar et al. (2012) ,relatam que do número total de casos

de LV decorrentes nas Américas, 96% destes ocorrem no Brasil.

Várias classes de compostos químicos incluindo naturais e sintéticos são descritos com atividades biológicas potenciais (CAO et al., 2007; HUSSAIN et al., 2014; ASHOK et al., 2017). Sendo que, das 252 substâncias consideradas básicas e essenciais pela WHO, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo de fármacos sintéticos são obtidos de precursores naturais (RATES, 2001).

Primeiramente avaliamos a atividade antiproliferativa do *p*-Cimeno, sobre o crescimento das formas promastigotas (Figura 1A) e amastigotas axênicas (Figura 1B) de *L. amazonensis*. Nossos resultados demonstram que o *p*-Cimeno foi capaz de afetar o crescimento dos parasitos, e como pode ser observado, o melhor efeito antiproliferativo foi alcançado sobre as formas amastigotas axênicas, por apresentar menor CI_{50} , quando comparado com as formas promastigotas. Os valores de CI_{50} obtidos são mostrados na Tabela 1.

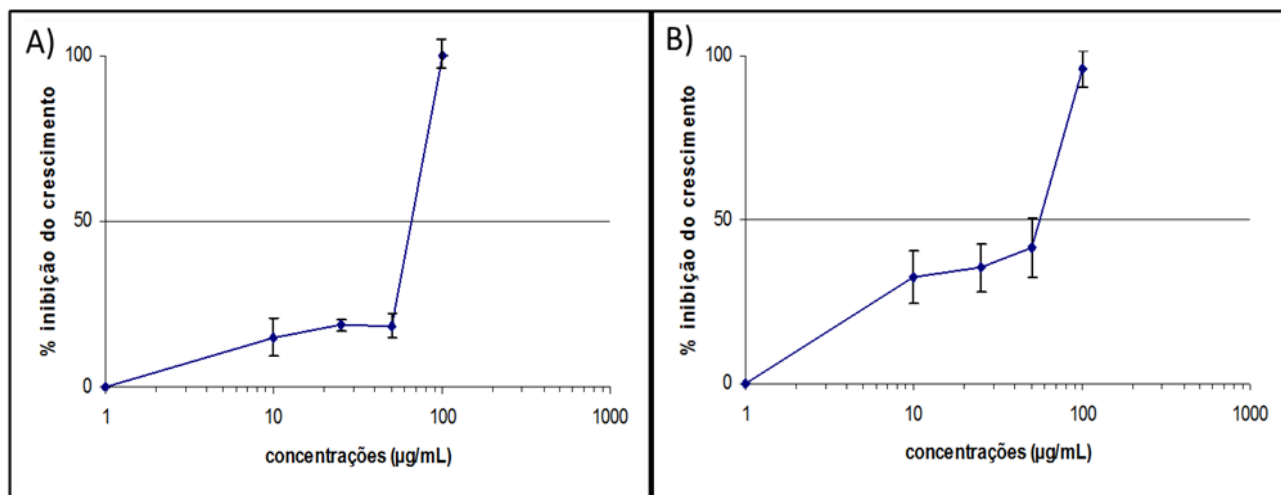


Figura 1. Efeito do *p*-Cimeno na proliferação de *L. amazonensis*, após 72 h de tratamento: A) células promastigotas; B) células amastigotas axênicas. As barras indicam o desvio padrão.

Tabela 1. CI_{50} das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*; efeitos citotóxicos (CC_{50}) para células J774.G8 e seus respectivos índices de seletividade (IS) para o *p*-Cimeno.

| Promastigotas | | Amastigotas | | Citotoxicidade <i>p</i> -Cimeno CC_{50} (µg/mL) |
|-------------------|------|-------------------|------|--|
| CI_{50} (µg/mL) | IS | CI_{50} (µg/mL) | IS | |
| 65,0 | 0,83 | 55,0 | 0,98 | 54,0 |

Os óleos essenciais correspondem a uma mistura de compostos com predomínio de terpenos. Estes compostos terpênicos são constituídos majoritariamente por monoterpenos e o restante corresponde a sesquiterpenos (GUIMARÃES et al., 2012). Estudos fitoquímicos revelam ser o *p*-Cimeno um hidrocarboneto aromático que possui origem natural nos monoterpenos, apresentando-se como principal precursor biossintético do carvacrol (MARCHESE et al., 2017).

Dentre os constituintes majoritários dos compostos terpênicos, estão: timol, carvacrol, limoneno, α - e β -Pinenos, mentol, α - e β -Tujona, linalol, γ -Terpineno, 1,8-cineol e *p*-Cimeno (BAKKALI et al., 2008; MARCHESE et al., 2017). De acordo com Tian et al. (2018), *p*-Cimeno, carvacrol e timol, são substâncias encontradas em maiores porcentagens nos óleos essenciais vegetais e responsáveis por suas propriedades antimicrobianas.

O *p*-Cimeno, é um dos constituintes terpênicos mais abundante que ocorre em plantas aromáticas como tomilho (gênero *Thymus*) e orégano (gênero *Origanum*). Contudo, também é encontrado em mais de 100 espécies de plantas pertencentes aos gêneros: *Ocimum* (Lamiaceae), *Eucalyptus* (Mirtaceae), *Protium* (Burseraceae) e *Artemisia* (Asteraceae) (PHILIS, 2005). Segundo Cavalli et al. (2004); Foe et al. (2016) e Mechergui et al. (2016), níveis expressivos de *p*-Cimeno são encontrados em óleos essenciais de plantas aromáticas como *Thymus vulgaris* L., composto por 45,9% de *p*-Cimeno, *Origanum vulgare* L., com 35,7%, *Chenopodium ambrosioides* L., 16,2% e *Ocimum gratissimum* L., com 14,06%.

De acordo com Monzote et al. (2011), a identificação da composição química do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L., apontou o *p*-Cimeno constituindo a sua segunda maior fração, com 21,1%. Nos ensaios o composto apresentou atividade contra *L. amazonensis*, através de CI_{50} de 20,7 $\mu\text{g/mL}$ para formas promastigotas e CI_{50} de 12,4 $\mu\text{g/mL}$ para formas amastigotas. Estudos realizados com a planta *Satureja bakhtiarica*, pertencente à família Lamiaceae, indicam que o *p*-Cimeno compõe 19,3% do seu óleo essencial. Sua atividade anti-*Leishmania* foi

avaliada sobre formas promastigotas de *L. major*, alcançando 100% de eficácia sobre a morte dos parasitos. (MOHAMMADPOUR; MARZONY; FARAHMAND, 2012).

Na busca por novos agentes leishmanicidas, Machado et al. (2014) relatam a atividade de *Thymus capitellatus* sobre formas promastigotas de *L. infantum*, *L. tropica* e *L. major*. Por meio de CI_{50} entre 32 e 62 $\mu\text{g/mL}$, o óleo essencial foi capaz de provocar apoptose celular nos parasitos. Monzote et al. (2014), avaliaram a capacidade *in vivo* do óleo essencial de *Artemisia absinthium* sobre *L. amazonensis*, o qual, apresentou controle de lesões do tipo cutânea em ratos, como redução da carga parasitária, quando comparados com os animais tratados com Glucantime®. Recentemente Bouyahya et al. (2017), revelam o potencial leishmanicida de *Origanum compactum* Benth, contra *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum*. A concentração inibitória obtida sobre 50% das formas promastigotas dos parasitos foi de 0,26 $\mu\text{g/mL}$, 0,12 $\mu\text{g/mL}$ e 0,35 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Um critério importante na busca por compostos ativos com atividade antiprotozoário é a sua toxicidade contra células de mamíferos. Para este propósito, a citotoxicidade do *p*-Cimeno sobre macrófagos da linhagem J774.G8 foi determinada após 72 h de tratamento, através da determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}), utilizando o método colorimétrico da sulfordamina-B. A CC_{50} obtida demonstrou elevada toxicidade da substância *p*-Cimeno. Os valores da CC_{50} são mostrados na Tabela 1.

Segundo Dezaki et al. (2016), o *p*-Cimeno é uns dos principais constituintes encontrados na espécie *Zataria multiflora* Boiss (Lamiaceae). Atividade significativa contra *L. tropica* foi obtida no estudo, porém a CC_{50} de 89,3 $\mu\text{g/mL}$ sobre macrófagos celulares J774-A1, indicou efeito citotóxico do óleo essencial. Guardo et al. (2017) descrevem que o *p*-Cimeno foi capaz de atingir 88% de inibição sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* a uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, sua toxicidade sobre células LC5 apresentou aumento progressivo em relação às concentrações testadas, alcançando 80% de

toxicidade para 100 µg/mL.

A citotoxicidade do *p*-Cimeno sobre células de macrófagos J774.G8, foi comparada com a atividade antiproliferativa contra promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, utilizando o índice de seletividade (IS), razão entre CC₅₀ para células J774.G8 e o IC₅₀ para os protozoários. De acordo com Tabela 1, o *p*-Cimeno foi mais efetivo contra as formas amastigotas axênicas, resultado promissor, já que as amastigotas são responsáveis pela manutenção da infecção em hospedeiros vertebrados, relevantemente no homem. Porém, o maior efeito seletivo do *p*-Cimeno foi para atividade contra os macrófagos J774.G8, o que significa, que a substância é mais tóxica para células de mamíferos, do que para os protozoários de *L. amazonensis*.

Conforme Silva et al. (2018), o óleo essencial de *Ocimum canum*, além de apresentar atividade contra *L. amazonensis*, demonstrou maior efeito seletivo para atividade contra os parasitas, com IS de 24,0 para as amastigotas intracelulares e 18,1 para formas promastigotas. Através deste comparativo podemos inferir o efeito citotóxico do *p*-Cimeno, uma vez que os níveis de seletividade alcançados foram inferiores a 1, sendo menos tóxico para promastigotas 0,83 vezes e 0,98 vezes para amastigotas, do que para macrófagos J774.G8. Pois, índices de seletividade considerados promissores, são aqueles alcançados para valores maiores que 1 (BRENZAN et al., 2007; ALONSO-PADILLA; RODRÍGUEZ, 2014).

Neste sentido, o desenvolvimento de novas estratégias como técnicas em estereoquímica e biossíntese combinatória, promovem novas perspectivas na obtenção de quimioterápicos com atividade clínica desejada (KIM; MOORE; YOON, 2015). A alteração de grupos funcionais em moléculas ativas, permite modificações químicas sintéticas capazes de influir sobre sua toxicidade. Bem como, a auto-associação com substâncias biosintetizadas, aprimoram o potencial de efetividade dos compostos químicos. Assim, estes recursos impulsionam a descoberta de inovações em combinações químicas, para a concepção de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016; PAULO; SIGRIST; OLI-

VEIRA, 2019).

Como demonstrado por Baréa et al. (2018), a obtenção de análogos estruturais de compostos químicos bioativos contra *L. amazonensis* possibilitou o desenvolvimento de novos híbridos a partir de β-carbonila-1,3,5-triazina, os quais alcançaram melhor eficiência antileishmania. A vetorização de medicamentos é considerada uma abordagem promissora na elaboração de novas formulações de interesse, de acordo com Volpato et al. (2018), o encapsulamento do composto sintético T6 com atividade contra *L. infantum*, a partículas ricas em glucano, derivado de *Saccharomyces cerevisiae* (GPs), mostrou diminuição significativa na toxicidade a macrófagos J774-A1, em comparação ao composto T6 não encapsulado.

Adicionalmente, o uso de nanopartículas em sistemas de administração de fármacos para direcionar agente antiprotozoário foi investigado por Brita et al. (2016). O composto BZTS derivado do monoterpene limoneno associado a copolímeros, apresentou atividade satisfatória por meio de especificidade celular, contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Resultados similares foram apresentados por Colina-Vegas et al. (2019), através da conjugação de complexos organometálicos à moléculas bioativas contra *L. amazonensis*. Espécies químicas metálicas têm a capacidade de facilitar sua absorção pelas células, aumentando a eficiência terapêutica de moléculas com propriedades biológicas a baixas concentrações. No estudo, os complexos se apresentaram significativamente ativos sobre as duas formas de desenvolvimento do parasito, inibindo potencialmente o crescimento em uma faixa de concentração nanomolar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a substância *p*-Cimeno apresentou atividade leishmanicida, principalmente por exibir maior efetividade por meio das concentrações inibitórias obtidas contra amastigotas de *L. amazonensis*, que são as formas replicativas presentes no hospedeiro vertebrado e, portanto consideradas o principal alvo da quimioterapia para a leishmaniose.

Contudo, estudos futuros devem ser desenvolvidos para investigar o mecanismo responsável pela atividade anti-*Leishmania* do *p*-Cimeno, e estabelecer melhor correlação da atividade farmacológica com sua estrutura química. A obtenção de análogos estruturais derivados do *p*-Cimeno ou sua conjugação com agentes complexantes terapêuticos, podem auxiliar elucidar seu modo de ação celular, aperfeiçoando suas propriedades antimicrobianas e quimioterapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Capacitação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- AGULLÓ, L.; ROMERO-SILVA, M.J.; DOMENECH, M.; SEEGER, M. *p*-Cymene Promotes Its Catabolism through the *p*-Cymene and the *p*-Cumate Pathways, Activates a Stress Response and Reduces the Biofilm Formation in *Burkholderia xenovorans* LB400. **Plos One**, v.12, n.1, p.e0169544, 2017.
- ALONSO-PADILLA, J.; RODRÍGUEZ, A. High throughput screening for anti-*Trypanosoma cruzi* drug discovery. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.12, p. e3259, 2014.
- ALVAR, J. VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.D. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v.7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ARONSON, N.; HERWALDT, B.L.; LIBMAN, M.; PEARSON, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; WEINA, P.; CARVALHO, E.M.; EPHROS, M.; JERONIMO, S.; MAGILL, A. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (ISDA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v.63, n.12, p.e202-e264, 2016.
- ASHOK, P.; CHANDER, S.; CHOW, L.M.C.; WONG, I.L.K.; SINGH, R.P.; JHA, P.N.; SANKARANARAYANAN, M. Synthesis and in-vitro anti-leishmanial activity of (4-arylpiperazin-1-yl)(1-(thiophen-2-yl)-9H-pyrido[3,4-b]indol-3-yl)methanone derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 70, p.100-106, 2017.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BARÉA, P.; BARBOSA, V.A.; BIDÓIA, D.L.; DE PAULA, J.C.; STEFANELLO, T.F.; COSTA, W.F.; NAKAMURA, C.V; SARRAGIOTTO, M.H. Synthesis, antileishmanial activity and mechanism of action studies of novel β -carboline-1,3,5-triazine hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.150, p. 579e590, 2018.
- BELO, V.S.; WERNECK, G.L.; BARBOSA, D.S.; SIMÕES, T.C.; NASCIMENTO, B.W.L; SILVA, E.S; STRUCHINER, C.L. Correction: Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.5, p.e10.1371, 2013.
- BENELLI, G; PAVELA, R.; MAGGI, F.; WANDJOU, J.G.N.; FOFIE, N.G.B.Y.; KONÉ-BAMBA, D.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S.; CAPRIOLI, G. Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. **Industrial Crops and Products**, v. 132, p. 377-385, 2019.
- BEZERRA, J.M.T.; ARAÚJO, V.E.M.; BARBOSA, D.S.; MARTINS-MELO, F.R.; WERNECK, G.L.; CARNEIRO, M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.12, n. 9, p. e0006697, 2018.
- BOUYAHYA, A.; DAKKA, N.; TABAOUI, A.; ET-TOUYS, A.; EL-BOURY, H.;

- ABRINI, J.; BAKRI, Y. Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). **Industrial Crops and Products**, v.108, p.729–737, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. 2017. 189 p.
- BRENZAN, M.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; UEDA-NAKAMURA, T.; YOUNG, M.C.M.; CORTEZ, D.A.G. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v.101, p.715–722, 2007.
- BRITTA, E.A.; SILVA, C.C.; RUBIRA, A.F.; NAKAMURA, C.V.; BORSALI, R. Generating nanoparticles containing a new 4-nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone compound with antileishmanial activity. **Materials Science and Engineering**, C69, p.1159–1166, 2016.
- CANTANHÊDE, L.M.; JÚNIOR, C.F.S.; ITO, M.M.; FELIPIN, K.P.; NICOLETE, R.; SALCEDO, J.M.V.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, R.G.M. Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania RNA Virus 1* and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.9, p.e0004079, 2015.
- CAO, R.; WENLIE, P.; ZIHOU, W.; ANLONG, X. β -carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 479-500, 2007.
- CAVALLI, J.F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A.F.; CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 275–279, 2004.
- CHARLTON, R. L.; ROSSI-BERGMANN, B.; DENNY, P.W.; STEEL, P.G. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art. **Parasitology**,v.145, p.219–236, 2018.
- COLINA-VEGAS, L.; GODINHO, J.L.P.; COUTINHO, T.; CORREA, R.S.; SOUZA, W.; RODRIGUEZ, J.C.F.; BATISTA, A.A.; NAVARRO, M. Antiparasitic activity and ultrastructural alterations provoked by organoruthenium complexes against *Leishmania amazonensis*. **New Journal Chemistry**,v.43, p.e1431, 2019.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N. *Leishmania* Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset,but Is There an End?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.9, p.330, 2019.
- DEZAKI, E.S.; MAHMOUDVAND, H; SHARIFIFAR, F.; FALLAHI, S.; MONZOTE, L.; EZATKHAH, F. Chemical composition along with antileishmanial and cytotoxic activity of *Zataria multiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.5, p.752-758, 2016.
- FOE, F.M.C.; NYEGUE, M.A.; KAMDEM, S.L.S.; ESSAMA, R.H.S.; ETOA, F. Chemical composition, antioxidant effects and antimicrobial activities of some spices' essential oils on food pathogenic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 649–656, 2016.
- GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America Journal**, v.26, p. 293-307, 2012.
- GUARDO, N.I. Trypanocidal Effects of Essential Oils from Selected Medicinal Plants. Synergy among the Main Components. **Natural Product Communications**, v.12, n.5, p.709-712, 2017.
- GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Monoterpenes with analgesic activity--a system-

- atic review. **Phytotherapy Research: PTR**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2012.
- HUSSAIN, H.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; GREEN, I.R.; GIBBONS, S. Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 10369-10428, 2014.
- KHAMESIPOUR, A. Therapeutic vaccines for leishmaniasis. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.14, p.1641–1649, 2014.
- KIM, E.; MOORE, B. S.; YOON, Y. J. Reinvigorating natural product combinatorial biosynthesis with synthetic biology. **Nature Chemical Biology**, v.11, n.649, 2015.
- KUMAR, Y.; PRAKASH, O.; TRIPATHI, H.; TANDON, S.; GUPTA, M.M.; RAHMAN, L.U.; LAL, R.K.; SEMWAL, M.; DAROKAR, M.P.; KHAN, F. AromaDb: A database of medicinal and aromatic plant's aroma molecules with phytochemistry and therapeutic potentials. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–11, 2018.
- LIMA, E.J.S.P.; ALVES, R.G.; D'ELIA, G.M.A.; ANUNCIACÃO, T.A.; SILVA, V.R.; SANTOS, L.S; SOARES, M.B.P.; CARDOZO, M.N.D.; COSTA, E.V.; SILVA, F.M.A; KOOLEN, H.H.F.; BEZERRA, D.P. Antitumor Effect of the Essential Oil from the Leaves of *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 23, n.11, p. 2974, 2018.
- MACHADO, M.; DINIS, A.M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVEZ, V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M.C. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1, p. 39–49, 2014.
- MARCHESE, A.; ARCIOLA, C.R.; BARBIERI, R.; SILVA, A.S.; NABAVI, S.F.; SOKENG, A.J.T.; IZADI, M.; JAFARI, N.J.; SUNTAR, I.; DAGLIA, M.; NABAVI, S.M. Update on monoterpenes as antimicrobial agents: a particular focus on p-Cymene. **Materials**, v. 10, n. 8, p. 947, 2017.
- MECHERGUI, K.; JAOUADI, W.; COELHO, J.P.; KHOUJA, M.L. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp *glandulosum* (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 32–37, 2016.
- MENEZES, J.P.B.; GUEDES, C.E.S.; PETERSEN, A.L.O.A.; FRAGA, D.B.M.; VERAS, P.S.T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, p. 1-11, 2015.
- MOHAMMADPOUR, G.; MARZONY, E.T.; FARAHMAND, M. Evaluation of the Anti-*Leishmania major* Activity of *Satureja bakhtiarica* Essential Oil in vitro. **Natural Product Communications**, v.7, n.1, 2012.
- MONZOTE, L.; NANCE, M.R.; GARCIA, M.; SCULL, R.; SETZER, W.N. Comparative Chemical, Cytotoxicity and Antileishmanial Properties of Essential Oils from *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Communications**, v.6, n.2, 2011.
- MONZOTE, L.; PIÑÓN, A.; SCULL, R.; SETZER, W.N. Chemistry and leishmanicidal activity of the essential oil from *Artemisia absinthium* from Cuba. **Natural Products Communications**, v.9, n. 12, p. 1799–1804, 2014.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, p.629–661, 2016.
- NO, J.H. Visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v.155, p.113–123, 2016.
- OLIVEIRA, T. M.; CARVALHO, R.B.F.; COSTA, I.H.F.; OLIVEIRA, G.A.L.; SOUZA, A.A.; LIMA, S.G.; FREITAS, R.M. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 423–428, 2015.
- PAULO, B.S.; SIGRIST, R.; OLIVEIRA, L.G. AVANÇOS RECENTES EM BI-

- OSSÍNTESE combinatória de policetídeos: perspectivas e desafios. **Química Nova**, v.42, p.71-83, 2019.
- PHILIS, J.G. The $S_1 \leftarrow S_0$ spectrum of jet-cooled *p*-cymene. **Spectrochimica Acta: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 61, n. 6, p. 1239–1241, 2005.
- PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J.C.; BARRET, M.P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUTAIN, A.W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.11, p.e0006052, 2017.
- QUINTANS, J.S.S.; MENEZES, P.P.; SANTOS, M.R.V.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.G.S.; GELAIN, D.P.; ARAÚJO, A.A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.L. Improvement of *p*-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 20, p. 436–440, 2013.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603–613, 2001.
- RODRIGUES, J.H.S.; MIRANDA, N.; VOLPATO, H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. The antidepressant clomipramine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* through a mitochondrial pathway. **Parasitology Research**, v.118, p.977–989, 2019.
- SANTIN, M.R.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; FERREIRA, I.C.P.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v.105, p.1489-1496, 2009.
- SANTOS, W.B.R.; MELO, M.A.O.; ALVES, R.S.; BRITO, R.G.; RABELO, T.K.; PRADO, L.S.; SILVA, V.K.S.; BEZERRA, D.P.; MENEZES-FILHO, J.E.R.; SOUZA, D.S.; VASCONCEL-OSCM.L.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; JÚNIOR, W.L.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; GUIMARÃES, A.G. *p*-Cymene attenuates cancer pain via inhibitory pathways and modulation of calcium currents. **Phytomedicine**, v. 61, p. 152836, 2019.
- SILVA, V.D.; ALMEIDA-SOUZA, F.; TELES, A.M.; NETO, P.A.; MONDEGO-OLIVEIRA, R.; FILHO, N.E.M.; TANIWAKI, N.N.; ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; FILHO, V.E.M. Chemical composition of *Ocimum canum* Sims. essential oil and the antimicrobial, antiprotozoal and ultrastructural alterations it induces in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 201–208, 2018.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WRREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. **Journal National Cancer Institute**, v.82, n.13, p. 1107–12. 1990.
- TIAN, F.; WOO, S.Y.; LEE, S.Y.; CHUN, H.S. *p*-Cymene and its derivatives exhibit antiaflatoxinogenic activities against *Aspergillus flavus* through multiple modes of action. **Applied Biological Chemistry**, v. 61, p. 489-497, 2018.
- UEDA-NAKAMURA, T.; ATTÍAS, M.; SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v.87, p.89–97, 2001.
- ULLAH, N.; NADHMAN, A.; SIDDIQ, S.; MEHWISH, S.; ISLAM, A.; JAFRI, L.; HAMAYUN, M. Plants as antileishmanial agents: current scenario. **Phytotherapy Research**, v.30, n.12, p.1905–1925, 2016.
- VOLPATO, H.; SCARIOT, D.B.; SOARES, E.F.; JACOMINI, A.P.; ROSA, F.A.; SARRAGIOTTO, M.H.; UEDA-NAKAMURA, T.; RUBIRA, A.F.; PEREIRA, G.M.; MANADAS, R.; LEITÃO, A.J.; BORGES, O.; NAKAMURA, C.V.; SOUSA, M.C. In vitro

- VERCELLINO, I.S.; BICUDO, D.C. Sucessão da comunidade de algas perifíticas em reservatório oligotrófico tropical (São Paulo, Brasil): comparação entre período seco e chuvoso. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 363-377, 2006.
- WARMLING, J.V.; SIGNORATI, A.; TRACÇA, R.R.; ROQUE, A.A.; MEREDIK, P.A.; IORIS, E.G.; FERRARI, F. Avaliação do estado de trofia de represas dos Municípios de Dois Vizinhos e Enéas Marques, Paraná. In: CONGRESSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA UTFPR DOIS VIZINHOS, 2015, Dois Vizinhos. **Anais... Dois Vizinhos: CCT**, 2015. p. 238-240.
- WETZEL, R.G. Recommendation for future research on periphyton. In: WETZEL, R.G. (Ed.). **Periphyton of freshwater ecosystems**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 1983, p. 339-346.

Recebido em: 05 de fevereiro de 2019.

Aceito em: 12 de setembro de 2019.