



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



JACKELINE KNONER DOURADO DE ASSIS

Avaliação da Atividade Antileishmania do Óleo Essencial de *Levisticum officinale*

Campo Grande
2024

JACKELINE KNONER DOURADO DE ASSIS

**Avaliação da Atividade Antileishmania do Óleo Essencial
de *Levisticum officinale***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia –
Bacharelado da Instituição Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador (a): Thalita Bachelli Riul

Banca Avaliadora

Profa. Dra. Thalita Bachelli Riul

Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo

Me. Izadora Bonfim

Campo Grande
2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por sempre me mostrar que acreditar nos Teus planos é o melhor caminho.

A minha mãe, Ione, por ter me apoiado e acreditado no meu sonho desde o princípio, sobretudo nos momentos em que eu mesma já não acreditava; e por ter investido e trabalhado muito para que realizá-lo fosse possível.

Ao meu pai, Bosco, por ter me incentivado a ser quem eu sou hoje, mas principalmente pelas marmitas preparadas às 5:00 horas da manhã para que eu pudesse almoçar na faculdade.

Agradeço também aos meus tios, Elaine, Luiz e Jane, por terem me acolhido e me ajudado em diversos momentos para que este processo pudesse ocorrer da melhor maneira possível.

Um obrigada especial aos meus primos Rafael e Jenifer, pelas caronas para a faculdade e pelo apoio emocional.

Obrigada a minha irmã de vida e melhor amiga de infância Emilly, por todos esses anos de amizade, pelas longas conversas de madrugada, e por todo o incentivo.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos, Ana Beatriz, Ana Carolina, Dalila, David, Gabrielly e Olivia, por terem tornado meus dias mais alegres e leves, e por terem dividido o peso da conquista desse diploma comigo.

RESUMO

As leishmanioses são consideradas como doenças negligenciadas pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). São endêmicas e de alta prevalência no Brasil, e sua transmissão ocorre através da hematofagia dos flebotomíneos infectados para humanos e algumas espécies de animais, em especial os cães. Além de possuírem poucas opções de tratamento farmacoterapêutico, os medicamentos são de alto custo e apresentam vários efeitos adversos e tóxicos. A planta de *Levisticum officinale* é aromática e amplamente utilizada em produtos culinários, pelas indústrias de alimentos e medicina tradicional, contudo foram publicados poucos estudos relacionados a esta espécie vegetal em relação a sua atividade biológica. Seu óleo essencial é caracterizado pela presença de compostos voláteis como monoterpenos e ftálicas, compostos envolvidos em diversas atividades biológicas, demonstrando atividade antimicrobiana em alguns estudos. Ademais foram identificados sete compostos fenólicos nos decoctos e extratos hidro etanólicos que apresentaram atividade antioxidante e bacteriostática. Nanoemulsões são sistemas coloidais amplamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica para encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos. Suas partículas, com tamanho inferior a 100 nm, apresentam diversas vantagens: maior estabilidade a longo prazo, alta clareza óptica e maior biodisponibilidade. Este estudo avaliou a ação do óleo essencial de *Levisticum officinale* na sua forma pura e nanoemulsionada na viabilidade de formas promastigotas, bem sua citotoxicidade em células de camundongos e em macrófagos de camundongos infectados com as amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis in vitro*, utilizando a Anfotericina B como fármaco de referência. O óleo essencial puro de *L. officinale* mostrou boa atividade contra células do parasito, porém pouca seletividade em relação às células de mamíferos, enquanto sua forma nanoemulsionada foi pouco tóxica para fibroblastos e macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*, porém com baixa atividade antileishmania. Mais estudos são necessários para aperfeiçoar sua seletividade e segurança, ampliando seu uso clínico e eficácia terapêutica.

Palavras-chaves: Leishmaniose; *Leishmania sp.*; Óleos Voláteis; *Levisticum officinale*; *in vitro*.

ABSTRACT

Leishmaniasis are considered neglected diseases by the World Health Organization (WHO) and the Pan American Health Organization (PAHO). It is endemic and highly prevalent in Brazil and is transmitted to humans and some species of animals, especially dogs, through the hematophagy of infected female phlebotomines. In addition to having few pharmacotherapeutic treatment options, the drugs are expensive and have various adverse and toxic effects. The plant *Levisticum officinale* is aromatic and widely used in culinary products, by the food industry and in traditional medicine, but few studies have been published on its biological activity. Its essential oil is characterized by the presence of volatile compounds such as monoterpenes and phthalides, compounds involved in various biological activities, demonstrating antimicrobial activity in some studies. In addition, seven phenolic compounds have been identified in the decoctions and hydroethanolic extracts, showing antioxidant and bacteriostatic activity. Nanoemulsions are colloidal systems widely used in the food and pharmaceutical industries to encapsulate, protect and release lipophilic bioactive compounds. Their particle size of less than 100 nm has several advantages: greater long-term stability, high optical clarity and greater bioavailability. This study evaluated the effect of *Levisticum officinale* essential oil in its pure and nanoemulsified forms on the viability of promastigote forms, as well as its cytotoxicity in mouse cells and in mouse macrophages infected in vitro with intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*, using amphotericin B as a reference drug. The pure essential oil of *L. officinale* showed good activity against parasite cells but low selectivity towards mammalian cells, while its nanoemulsified form was not very toxic to mouse fibroblasts and macrophages infected with *L. amazonensis*, but with low anti-leishmanial activity. Further studies are needed to improve its selectivity and safety, thus expanding its clinical use and therapeutic efficacy.

Keywords: Leishmaniasis; *Leishmania* sp.; Volatile Oils; *Levisticum officinale*; *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Avaliação da Atividade Antileishmania dos Extratos de Óleo Essencial de *Levisticum officinale* 18
- Figura 2 - Avaliação da atividade anti-amastigotas intracelulares das formulações de óleo essencial de *Levisticum officinale* 19
- Figura 3 - Avaliação da Citotoxicidade dos Extratos de Óleo Essencial de *Levisticum officinale* 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de CI_{50} , CC_{50} e índice de seletividade das amostras óleo essencial de *Levisticum officinale* 21

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
1.1 Leishmanioses	9
1.2 Parasito, Vetor e Ciclo de Vida.....	9
1.3 Diagnóstico	10
1.4 Tratamento	11
1.5 Óleos essenciais Como Fontes de Novas Terapias Antileishmania	11
1.6 Nanoemulsões e Suas Aplicações	13
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODO	14
3.1 Parasitos.....	14
3.2 Amostras	14
3.3 Ensaio de Viabilidade de Formas Promastigotas	14
3.4 Macrófagos peritoneais.....	15
3.5 Tratamento de Macrófagos Infectados.....	15
3.6 Ensaio de Citotoxicidade.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Ensaio de Viabilidade de Formas Promastigotas	17
4.2 Tratamento de Macrófagos Infectados.....	18
4.3 Ensaio de Citotoxicidade e Índice de Seletividade	20
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), endêmicas no Brasil, podendo acometer humanos e alguns animais vertebrados, sendo mais comum em cães nas regiões urbanas. O gênero *Leishmania* sp. pertence à ordem Kinetoplastidae à família Trypanosomatidae e são divididas em dois subgêneros (*Leishmania Viannia* e *Leishmania Leishmania*). Ademais, são parasitos heteroxenos, ou seja, possuem em seu ciclo de transmissão hospedeiros intermediários e definitivos (Soares, 2021).

Existem duas formas de desenvolvimento da doença, Sistêmica ou Visceral e Cutânea ou Tegumentar. A Leishmaniose Visceral é geralmente causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* no continente americano e acomete o organismo como um todo. A incubação dura em torno de dois a oito meses e as complicações dos sintomas, os quais envolvem febre, emagrecimento, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, hemorragias e imunodeficiência, podem levar o paciente a óbito se não tratada adequadamente (Fiocruz, s.d).

A Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar é caracterizada pelo aparecimento de ulcerações na pele, e estas podem ser classificadas como: única, múltiplas, disseminadas e difusas. Geralmente são indolores, possuem bordas elevadas e fundo granuloso (Ministério da Saúde, s.d). Sabe-se que esta forma de doença pode acarretar lesões nas mucosas do paciente, sendo mais comum na garganta e nas mucosas oral e nasal. Existem três espécies circulantes no Brasil: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, capazes de causar Leishmaniose Tegumentar. A incubação tende a seguir a média de dois a três meses, podendo apresentar períodos mais curtos ou mais longos (Ministério da Saúde, s.d).

1.2 Parasito, Vetor e Ciclo de Vida

Os parasitas causadores das Leishmanioses apresentam basicamente duas formas em seu ciclo de vida: amastigota e promastigota. Na forma amastigota, são parasitas intracelulares obrigatórios do Sistema Mononuclear Fagocitário nos hospedeiros vertebrados, multiplicando-se por divisão binária dentro dos macrófagos (Neves, 2016). Já sua forma promastigota (flagelada) é localizada na porção média

do intestino dos insetos vetores (as fêmeas dos flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito-palha) e são extracelulares.

O vetor das leishmanioses são as fêmeas dos flebotomíneos: insetos dípteros hematófagos pertencentes à família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. O gênero *Lutzomyia* é o principal responsável pela transmissão das leishmanioses nas Américas (Ministério da Saúde, s. d). Por conta de seu aparelho bucal, os insetos vetores são capazes de dilacerar a pele e os vasos sanguíneos durante a hematofagia, isto é, durante sua alimentação, assim, obtém junto com o sangue, um pouco de linfa, restos celulares, e amastigotas no caso da hematofagia em hospedeiros infectados (Bastos, 2021).

Após a ingestão de sangue e células fagocíticas contendo amastigotas, estas formas vão para o intestino do inseto, onde irão se transformar em promastigotas e posteriormente se multiplicarão, migrando para a faringe do mosquito. Ao mesmo tempo em que ocorre a ingestão de sangue, há também a transmissão das formas infectantes (promastigota) para o hospedeiro vertebrado através da saliva da fêmea flebotomíneo. Posteriormente, ao ser fagocitado pelas células de defesa, o parasita passa da forma promastigota para amastigota e começa a se multiplicar por divisão binária no interior da célula fagocítica. Como consequência, ocorre uma lise celular, e as amastigotas são liberadas na derme, linfa e corrente sanguínea, onde irão infectar novos fagócitos (Rios et al., 2022).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da Leishmaniose pode ser avaliado por parâmetros epidemiológicos e achados clínicos laboratoriais, devendo-se preferencialmente encontrar o parasita em tecido infectado. O padrão-ouro para diagnóstico de Leishmaniose Visceral é a punção da medula óssea, por apresentar uma boa sensibilidade. Para a Leishmaniose Tegumentar, recomenda-se examinar o raspado das bordas da lesão ou avaliação histopatológica. Atualmente os testes mais utilizados são os sorológicos, principalmente o de imunofluorescência indireta (IFI), pois é de mais fácil acesso, menos invasivo e é oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Contudo, apesar de apresentar uma boa resposta imune humoral, não possui boa especificidade e requer bastante tempo, laboratoristas treinados, equipamentos específicos e especializados, além da interpretação ser subjetiva (Ministério da Saúde s.d). Ademais, o teste deve ser repetido após trinta (30) dias. O

diagnóstico molecular por cadeia da polimerase (PCR) utiliza amostras biológicas como sangue e aspirado de medula para identificar o DNA do parasita. Contudo, além de depender de equipamentos e insumos caros, seu bom desempenho depende de alguns fatores importantes como a área endêmica, tipo de amostra, alvo do DNA que será utilizado para a amplificação e métodos de extração desse DNA. Assim, pode não oferecer o melhor resultado em se tratando da leishmaniose (Rios et al., 2022).

1.4 Tratamento

Os medicamentos utilizados para o tratamento das leishmanioses se baseiam no combate do parasita no hospedeiro, porém, por ser uma doença negligenciada prevalente em regiões em desenvolvimento, não há muitas alternativas para intervenção terapêutica. Os medicamentos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes como o Antimoniato de N-metil glucamina (Glucamine) e Estibogluconato de Sódio (Pentostan), todos em formulações de uso injetável (Nascimento, 2023). Apesar de serem a primeira escolha, apresentam efeitos adversos e tóxicos consideráveis que limitam o seu uso.

A Anfotericina B, que será utilizada como fármaco de referência neste trabalho, é um medicamento de segunda escolha, usado principalmente para gestantes, pacientes com problemas cardíacos ou que não respondem ao tratamento com antimoniais pentavalentes. É encontrada na forma de solução (desoxicolato de anfotericina B) ou na forma lipossomal, sendo ambas de uso injetável. Apresentam bons resultados, com alto percentual de cura, entretanto por ser um tratamento de alto custo, muitos países endêmicos não possuem condições financeiras de fornecê-lo para o tratamento da população, o que limita o acesso e aumenta as taxas de transmissão (Rios et al., 2022). Além disso, ambas as classes de fármacos necessitam ser administradas em serviços de saúde de referência, tendo a necessidade do paciente se deslocar a estes locais para receber as medicações, muitas vezes por semanas consecutivas, o que diminui a adesão a tratamento e aumenta o aparecimento de cepas resistentes (Nascimento, 2023).

1.5 Óleos Essenciais Como Fontes de Novas Terapias Antileishmania

Nesse cenário, considerando as dificuldades em relação ao tratamento da Leishmaniose Tegumentar, os produtos de origem natural, como os óleos essenciais, aparecem como uma possível fonte de novas moléculas a serem exploradas

estrategicamente contra doenças negligenciadas. Entre os anos de 1981 e 2019 foram identificados 1.881 medicamentos advindos de produtos naturais, com locais e mecanismos de ações variados, e amplamente utilizados nos dias de hoje como alternativas para o controle e tratamento de diversas doenças, agudas e crônicas. Este fato evidencia cada vez mais a necessidade de explorar características anti parasitárias destes compostos na busca por possibilidades de aperfeiçoamento do tratamento da Leishmaniose (Newman et al., 2020).

A planta *Levisticum officinale*, popularmente conhecida como Levístico ou Lovage, pertence à família *Apiaceae* e é utilizada pela indústria de alimentos, principalmente por apresentar um sabor característico e forte (Spréa et al., 2020). Seu crescimento ocorre amplamente na região das Montanhas de Hezar no Irã, e seu uso medicinal está envolvido com efeito espasmolítico e diurético, sendo eficaz para tratamentos de infecção urinária (Miran et al., 2020). Uma característica importante em relação à sua composição química, é a presença de metabólitos secundários como saponinas, cumarinas, alcalóides e polifenóis (Basílio et al., 2024).

Em relação a sua atividade antiparasitária, existem alguns estudos *in vitro* que mostram diminuição da viabilidade celular de células de *Trypanossoma cruzi*, parasita pertencente à mesma classe (Kinetoplastea) e a mesma família (Trypanosomatidae) da *Leishmania* sp. Ademais, o óleo essencial de Levistico apresentou atividade bactericida contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes (Miran et al., 2018). Ao analisar os compostos voláteis do óleo essencial, extraído das partes aéreas da planta de *Levisticum officinale*, foram identificados, em sua maioria, monoterpenos, como α -terpinil acetato, β -felandreno, β -mirceno, α -terpineol e (Z)- β -ocimeno, e ftálicas (Spréa et al., 2020). Sabe-se que as ftálicas são compostos voláteis envolvidos com diversas atividades farmacológicas, dentre elas, pode-se citar sua ação antimicrobiana, demonstrando efetividade contra bactérias Gram negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* [VRE] *faecium* resistente à vancomicina, testadas *in vitro* (Miran et al., 2020). Neste cenário, os óleos essenciais aparecem como uma opção viável para a pesquisa de novos tratamentos para as leishmanioses, visto que apresentam bom perfil inibitório e estimulador do sistema imunológico contra *Leishmania* sp. (Souza et al., 2022).

1.6 Nanoemulsões e Suas Aplicações

Nanoemulsões são sistemas coloidais amplamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica para encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos. Suas partículas, com tamanho inferior a 100 nm, apresentam diversas vantagens: maior estabilidade a longo prazo, alta clareza óptica e maior biodisponibilidade. Embora frequentemente confundidas com microemulsões, as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis, enquanto as microemulsões são estáveis, o que influencia suas metodologias de fabricação, estratégias de estabilização e propriedades funcionais (McClements, 2011).

As nanoemulsões fabricadas com óleos essenciais possuem grande potencial terapêutico para indústria veterinária e humana, principalmente por influenciarem todos os princípios farmacocinéticos dos compostos ativos presentes na formulação, o que reduz os riscos e otimiza os resultados terapêuticos. Estudos mostram inúmeras aplicabilidades dos óleos essenciais na indústria farmacêutica, indústria de alimentos bem como em pesticidas e larvicidas (Bastos, 2021). O tamanho diminuído das partículas nestas formulações fornece uma série de vantagens interessantes como a melhora da biodisponibilidade, estabilidade aprimorada, melhora de características organolépticas, liberação controlada de fármacos e aprimoramento da solubilidade em água. Ademais, as nanoemulsões são carreadores favoráveis de óleos essenciais (Porto et al., 2020).

Considerando os escassos relatos na literatura em relação a estudos da atividade antileishmaniana de *Levisticum officinale*, este trabalho buscou explorar o potencial inibitório *in vitro* do óleo essencial desta planta, em sua forma pura e nanoemulsionada, contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, a fim de compreender melhor suas atividades biológicas e seu potencial como nova estratégia terapêutica contra leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto de pesquisa foi avaliar por meio de ensaios *in vitro* o potencial inibitório do óleo de *Levisticum officinale* em células de *Leishmania amazonensis*, bem como sua citotoxicidade em linhagens celulares de camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil inibitório do óleo de *Levisticum officinale* puro e nanoemulsionado em células promastigota de *Leishmania amazonensis*, utilizando a Anfotericina B como referência;
- Realizar análise de citotoxicidade do óleo de *Levisticum officinale* puro e nanoemulsionado em linhagens de células de camundongos;
- Realizar o perfil inibitório do óleo de *Levisticum officinale* em macrófagos de camundongos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Calcular o índice inibitório e a concentração citotóxica de 50% das células (IC50 e CC50, respectivamente) das formulações nas diferentes linhagens celulares e obter o índice de seletividade (IS) destas amostras.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Parasitos

A pesquisa trata-se de um estudo *in vitro* utilizando cepa de *Leishmania amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8) mantidas por passagens semanais em sua forma promastigota à temperatura de 26°C em meio Scheneider, suplementadas com 20% de soro fetal bovino inativado, 10.000 ul/mL de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina (Fermiano et al., 2024).

3.2 Amostras

O óleo essencial de *Levisticum officinale* na forma pura e na forma nanoemulsionada foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Hematologia e Biologia Redox e pelo Laboratório de Sistemas Micro e Nanoestruturados (LaSMiNano), ambos da FACFAN/UFMS.

3.3 Ensaio de Viabilidade de Formas Promastigotas

Ambas as amostras foram avaliadas quanto a sua atividade antileishmania em células promastigotas de *Leishmania amazonensis* através de diferentes concentrações, variando de 1000 a 15,6 ug/ml em meio Schneider devidamente suplementado (Sigma – Aldrich, EUA). Os parasitos foram semeados em placas de 96 poços, contendo 1×10^5 promastigotas de *Leishmania amazonensis* por poço com as diferentes concentrações das amostras a serem testadas, e posteriormente

incubadas a temperatura de 26°C por um período de 48 horas em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (Fermiano et al., 2024).

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico de resazurina (Sigma – Aldrich). Cinco microlitros de uma solução de resazurina a 0,2 mg.ml⁻¹ foi adicionada em cada poço da microplaca, e as absorbâncias foram lidas, após 4 horas de incubação a 26°C, em 570 nm e 600 nm em espectrofotômetro. A viabilidade celular foi avaliada por meio de cálculos obtidos no site do fornecedor do AlamarBlue® (Fermiano et al., 2024).

A Anfotericina B foi utilizada como fármaco de referência antileishmania em concentrações seriadas de 10 a 0,78 µM. Poços contendo somente os parasitos e o meio de cultura foram considerados controles positivos de viabilidade. Os valores da metade da dose inibitória mínima (IC₅₀) foram obtidos através de uma curva de regressão dose-resposta, não linear, geradas pelo programa Prism 5 (GraphPad Software, EUA) (Fermiano et al., 2024).

3.4 Macrófagos Peritoneais

Macrófagos peritoneais murinos foram coletados após a eutanásia animal. Foram injetados na cavidade peritoneal cerca de dez mililitros de meio RPMI frio (Sigma-Aldrich, EUA), devidamente suplementado com 10.000 U/ml de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). Para que a liberação dos macrófagos fosse facilitada, a região abdominal dos camundongos passou por uma suave massagem e, posteriormente, o fluido peritoneal foi aspirado e transferido para um erlenmeyer em banho de gelo, evitando a aderência entre as células. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS sob o número 1041/2019.

3.5 Tratamento de Macrófagos Infectados

Duas placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas (13mm) foram semeadas com macrófagos peritoneais murinos (1 × 10⁶ células/poço) em meio RPMI 1640 devidamente suplementado (Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 1 hora, para que ocorresse a adesão, confirmada por microscopia. Os macrófagos aderentes foram infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária (4 × 10⁶ parasitas/mL) após duas lavagens com solução tampão de fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, EUA), e posteriormente foram incubados a 35 °C/5% de CO₂. Os parasitas livres foram removidos com duas

lavagens com PBS após 4 horas de incubação. As células infectadas foram tratadas durante 24 horas com o óleo essencial de *Levisticum officinale* em sua forma pura e nanoemulsionada nas concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50 μM . As células não tratadas foram utilizadas como controle positivo de infecção e a Anfotericina B (Sigma-Aldrich, EUA; 1 μM), foi usada como fármaco antileishmania de referência (controle negativo de infecção). Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram removidos, e as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com solução de Bouin (Sigma-Aldrich, EUA) e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:10 em água destilada. As lamínulas utilizadas na visualização microscópica foram desidratadas por um gradiente de acetona/xileno (100%, 70%, 50%, 30% e 100% cada da Sigma-Aldrich). Em três réplicas, com o auxílio de um microscópio óptico, foram contabilizados em 200 células por lamínula, o número total de amastigotas intracelulares. Através de uma curva de regressão não linear no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), os valores da concentração inibitória semi-máxima (IC 50) foram calculados.

3.6 Ensaio de Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade utilizamos células NIH/3T3 (ATCC CRL-1658, linhagem de fibroblastos de camundongo) cultivados em placas de 96 poços em meio RPMI 1640 (Sigma – Aldrich, EUA) devidamente suplementado. As amostras de óleo essencial puro e nanoemulsionado foram testadas nas concentrações de 1000 a 15,625 $\mu\text{g/ml}$ e posteriormente, a microplaca foi incubada por 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Células tratadas com Anfotericina B, variando sua concentração do fármaco de 50 a 0,78 $\mu\text{g/ml}$ foram utilizadas como referência e poços contendo somente as células e meio de cultura foram utilizadas como controle positivo de viabilidade. Por fim, 5 μL de uma solução de 0,2 mg. ml^{-1} de resazurina foram adicionados em cada poço, os quais foram submetidos posteriormente a incubação por 4 horas a 37°C e 5% de CO_2 a fim de avaliar a viabilidade celular. As absorbâncias foram lidas em 570 e 600 nm e a concentração citotóxica semi máxima (CC_{50}) foi calculada partir de uma regressão sigmoidal da curva dose-resposta gerada usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA) (Fermiano et al., 2024).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A planta *Levisticum officinale* é comum em países da Europa, principalmente em Portugal, onde é utilizada como tempero comercial (Spréa et al., 2020). Ao analisar os compostos voláteis de seu óleo essencial, extraído de suas partes aéreas, foram identificados, em sua maioria, monoterpenos e ftálicas. Ademais, ambos os extratos (hidroalcoólico e decocção), demonstraram ação antioxidante e maior efetividade em bactérias Gram-negativas (Spréa et al., 2020). Sabe-se que a maioria dos estudos em relação a planta de *Levisticum officinale* tratam a respeito dos compostos voláteis identificados. A ftálica ligustilida é descrita como principal constituinte do óleo essencial extraído das raízes, e outros componentes como os terpenos α -terpinil acetato e β -felandreno, foram encontrados em grandes quantidades em suas folhas (Spréa et al., 2020). Sabe-se que as ftálicas são uma classe de compostos voláteis envolvidos com diversas atividades farmacológicas, dentre elas, pode-se citar sua ação antimicrobiana, demonstrando efetividade contra Gram negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e das bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* [VRE] *faecium* resistente à vancomicina, testadas *in vitro* (Miran et al., 2020). Ademais, existem alguns estudos *in vitro* publicados que mostram diminuição da viabilidade celular de células de *Trypanosomacruzi*, parasita pertencente à mesma classe (Kinetoplastea) e a mesma família (Trypanosomatidae) da *Leishmania* sp. (Miran et al., 2018).

4.1 Ensaio de Viabilidade de Formas Promastigotas

Para avaliar a atividade antileishmania das diferentes formulações de óleo essencial de *Levisticum officinale*, puro (OELO) e nanoemulsionado (OELO NANO), as amostras foram diluídas em meio Schneider devidamente suplementado, com concentrações variando de 15,625 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, e incubadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 48 horas a 26°C. Após esse período, a viabilidade das células foi avaliada por espectrofotometria pelo método da resazurina, e os resultados estão na Figura 1.

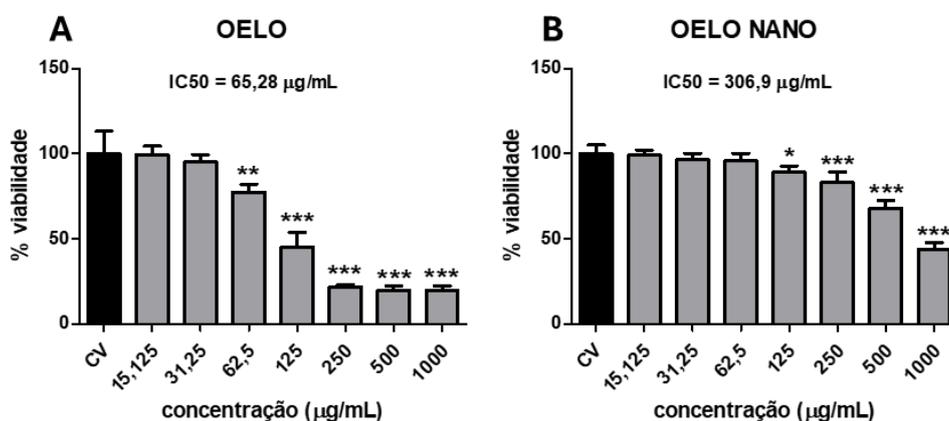


Figura 1: Atividade antileishmania do óleo essencial de *Levisticum officinale*. As amostras foram incubadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A - óleo puro (OELO) e B - nanoemulsionado (OELO NANO). *, ** e *** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

Pode-se observar que ambas as amostras reduziram a viabilidade das formas promastigotas nas maiores concentrações testadas em relação ao controle de viabilidade (CV, apenas parasitos com meio de cultura). No entanto, essa redução da viabilidade mostrou ser mais evidente e dose-dependente para a amostra de óleo essencial puro (OELO), que reduziu a viabilidade dos parasitos a partir de 62,5 µg/mL e nas maiores concentrações essa redução foi maior que 50%. Já a amostra de óleo nanoemulsionado (OELO NANO) também reduziu a viabilidade dos parasitos a partir de 125 µg/mL nas condições testadas, porém em menor grau.

4.2 Tratamento de Macrófagos Infectados

Ambas as formulações do óleo essencial de *Levisticum officinale* foram testadas em macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis* em concentrações de 6,25, 12,5, 25 e 50 µM. Para cada concentração foram utilizadas três lamínulas. Foram contabilizados os amastigotas presentes em 200 macrófagos por lamínula. A Anfotericina B na concentração de 1 µM foi utilizada como fármaco de referência e as células que não receberam tratamento, como controle negativo, e os resultados encontram-se na Figura 2.

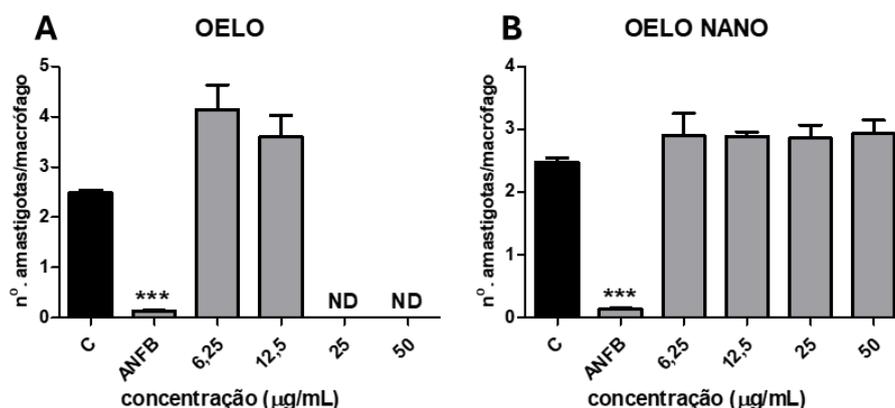


Figura 2: Avaliação da atividade anti-amastigotas intracelulares das formulações de óleo essencial de *Levisticum officinale*. O óleo essencial puro (OELO) e nanoemulsionado (OELO NANO) foram incubados com macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* por 24 horas, e o número de amastigotas por células foi analisado por microscopia óptica. A – óleo essencial puro (OELO) e B – óleo nanoemulsionado (OELO NANO). *** significa $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey). C = controle de macrófagos infectados sem tratamento; ANFB = macrófagos infectados e tratados com anfotericina B (1 µM); ND = células não detectadas.

O controle de macrófagos não tratados apresentou respectivamente 2,53; 2,49 e 2,41 como média de amastigotas por célula em cada lamínula. A Anfotericina B demonstrou em média 0,13; 0,12 e 0,15 de amastigotas por célula infectada. O OELO puro na concentração de 6,25 µM evidenciou por lamínula respectivamente as médias de 3,24; 2,53; 2,92, bem próximo ao controle de infecção. Na concentração de 12,5 µM os valores também não distanciaram do controle negativo, totalizando 2,97; 2,85 e 2,84 de amastigotas por célula. Nas concentrações de 25 e 50 µM do OELO puro, não foi possível a realização da contagem de amastigotas, pois não havia macrófagos aderidos na lamínula. Aparentemente a amostra apresentou citotoxicidade contra os macrófagos nas concentrações de 25 e 50 µM, e as células foram destruídas.

O OELO NANO na concentração de 6,25 µM demonstrou valores elevados de amastigotas por macrófagos (3,7; 4,08 e 4,66) quando comparado com as células não tratadas. Na concentração de 12,5 µM, as médias foram de 4,06; 3,18 e 3,53. Na concentração de 25 µM, as médias de amastigotas por célula foram de 3,05; 2,64 e 2,89. E por fim, na concentração de 50 µM foram encontradas as médias de 2,83; 3,18 e 2,76 de amastigotas por célula. Dessa forma, podemos observar que a formulação de óleo essencial nanoemulsionada não foi eficiente para eliminar as formas amastigotas de *L. amazonensis* no interior dos macrófagos infectados nas concentrações testadas. Já o óleo essencial puro não reduziu o número de amastigotas intracelulares nas concentrações de 6,25 e 12,5 µM, e foi citotóxico para

os macrófagos nas concentrações de 25 e 50 μM .

Algumas características físico-químicas atribuídas aos óleos essenciais, como sua alta volatilidade e dificuldade de dispersão, podem limitar sua utilização em formulações clínicas (Fontes et al., 2021). Desta forma, ao recorrer às nanoemulsões, onde as partículas são reduzidas a valores inferiores a 100 nm; algumas destas atribuições, como a dispersão do óleo essencial inserido na formulação, podem ser otimizadas (Fontes et al., 2021). Alguns estudos recentes, investigam atividades antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias de alguns óleos essenciais nanoemulsionados (Fontes et al., 2021). Contudo, apesar de tratar-se de uma tecnologia inovadora, é importante reconhecer a necessidade de estudos futuros que salientem a utilização destas formulações em modelos animais, para que a previsão de mecanismos de ação, possam ser investigadas e otimizadas.

Ao analisar artigos de revisão, observa-se que alguns óleos essenciais como o Timol e o Carvacrol, quando testados em promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, obtiveram valores satisfatórios de IC_{50} ($\text{IC}_{50} = 26,8 \mu\text{g/mL}$ e $\text{IC}_{50} = 25,4 \mu\text{g/mL}$ respectivamente). A atividade antileishmania neste caso foi atribuída a presença da hidroxila aromática na estrutura química destes óleos essenciais, pois quando comparados a outros compostos que não apresentam grupamento hidroxila e anel aromático, como o Mentol ($\text{IC}_{50} = 198,9 \mu\text{g/mL}$), e a um composto com uma hidroxila e sem anel aromático como o p-cimeno ($\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), pode-se notar diferença significativa das concentrações inibitórias mínimas (Souza et al., 2022). Considerando essas informações, é possível atribuir os baixos resultados referentes a atividade antileishmania do óleo essencial de *Levisticum officinale* contra amastigotas de *Leishmania amazonensis* a ausência de hidroxilas aromáticas em sua composição química (Spréa et al., 2020).

4.3 Ensaio de Citotoxicidade e Índice de Seletividade

As formulações de óleo essencial de *Levisticum officinale* também foram avaliadas quanto à citotoxicidade na linhagem celular NIH/3T3, de fibroblastos de camundongo. As células foram incubadas com diferentes concentrações das amostras (de 15,625 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI devidamente suplementado por 48 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Após esse período, a viabilidade das células também foi avaliada pelo método da resazurina, e os resultados estão ilustrados na Figura 3.

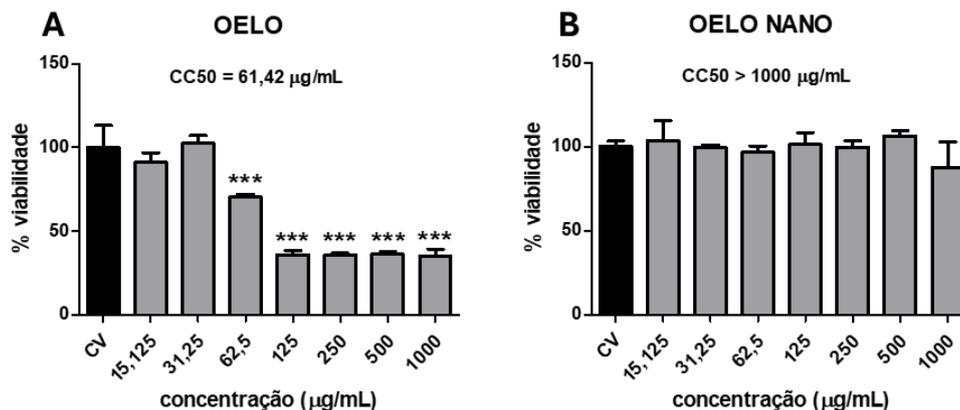


Figura 3: Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Levisticum officinale*. As amostras foram incubadas com fibroblastos da linhagem NIH/3T3 por 48 horas, e a viabilidade foi avaliada por espectrofotometria. A - óleo puro (OELO) e B - nanoemulsionado (OELO NANO). *** significa $p < 0,001$. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

É possível observar que a formulação OELO NANO não apresentou citotoxicidade às células NIH/3T3 nas condições testadas. Já o OELO puro foi citotóxico a partir de 62,5 µg/mL, de forma semelhante aos resultados apresentados na atividade antileishmania.

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos de atividade antileishmania e citotoxicidade, foi feita uma regressão não linear dos resultados obtidos para o cálculo das concentrações inibitórias de 50% das células e concentrações citotóxicas de 50% das células (CI_{50} e CC_{50} , respectivamente). Além disso, o índice de seletividade de cada amostra foi calculado a partir dos resultados obtidos para CI_{50} e CC_{50} . Todos esses resultados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de CI_{50} , CC_{50} e índice de seletividade das amostras óleo essencial de *Levisticum officinale*

	IC50 promastigotas <i>L. amazonensis</i> (µg/mL)	CC50 NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de seletividade IS
OELO	65,3	61,42	0,9
OELO NANO	306,9	> 1000	3,3
ANFB	0,04	39,31	982,8

CI_{50} : concentração inibitória de 50% nas células promastigotas; CC_{50} : concentração citotóxica em 50% das células NIH/3T3; IS: índice de seletividade, obtido pela razão entre CC_{50} e CI_{50} ; ANFB: anfotericina B (em µM).

Observando os resultados das Figuras 1 e 3 e da Tabela 1, podemos notar que as amostras de OELO e OELO NANO reduziram de forma significativa e dose

dependente a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* nas condições testadas, sendo que OELO apresentou maior redução da viabilidade do parasito, onde a CI_{50} obtida foi menor em relação ao OELO NANO, cuja CI_{50} foi quase cinco vezes maior que OELO. Em relação à citotoxicidade das amostras frente às células NIH/3T3, a formulação OELO NANO não foi citotóxica nas condições testadas, cuja maior concentração foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Já o OELO puro apresentou citotoxicidade para os fibroblastos de forma semelhante ao parasito.

O índice de seletividade (IS) de cada amostra foi obtido pela razão da CC_{50} pela CI_{50} de cada amostra, e encontra-se na Tabela 1. Quanto maior o IS, maior a seletividade de uma amostra em reduzir a viabilidade da célula dos parasitos do que das células de mamíferos testadas (Silveira, 2016). Dessa forma, a formulação OELO NANO foi a que apresentou maior seletividade (IS) estimada, já que CC_{50} é maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$, mas não sabemos exatamente quanto, já que esta foi a maior concentração testada neste trabalho. O IS de OELO foi de 0,9, próximo de 1, pois o CC_{50} obtido para as duas células foi semelhante. Dessa forma, o OELO não é seletivo, sendo tóxico para ambas as células testadas. É interessante observar também os resultados obtidos para a Anfotericina B, fármaco de segunda escolha para o tratamento de leishmanioses: apesar de apresentar efeitos tóxicos conhecidos, esta é bastante ativa contra o parasito (CI_{50} de 0,04 μM). Esse resultado pode variar bastante de acordo com as cepas de *Leishmania*, e as condições usadas em cada experimento (Ássimos, 2020). Apesar de se tratar de um experimento *in vitro*, os efeitos tóxicos da Anfotericina B para os pacientes são bem conhecidos, porém ainda é um dos poucos fármacos efetivos no tratamento das leishmanioses (Mendes, 2023). Estudos que avaliaram a atividade antiagregante plaquetária e anticoagulante do óleo essencial de *Levisticum officinale* não demonstraram toxicidade para as plaquetas (Basílio et al, 2024), contudo, neste estudo, o OELO puro foi citotóxico não apenas para os macrófagos mas também para linhagem de fibroblastos murinos. As pesquisas acerca dos mecanismos de ação dos óleos essenciais são escassas, principalmente por apresentarem composição química complexa, o que dificulta a especificidade de ação (Gonçalves Pereira et al., 2021). Desta forma, é difícil prever qual mecanismo de ação pode estar envolvido com a citotoxicidade. Ademais, produtos derivados de plantas em sua grande parte possuem em sua composição moléculas de mais de um grupo químico capazes de interagir com diferentes estruturas nas células.

Produtos naturais, como os óleos essenciais, representam uma fonte rica e promissora para a descoberta de novos fármacos com atividade antileishmania, devido à sua diversidade química e potencial terapêutico. Formulações em nanoemulsões têm se destacado como sistemas inovadores de liberação de fármacos, com capacidade de reduzir a toxicidade associada a componentes oleosos, como os óleos essenciais, e melhorar sua biodisponibilidade. Nesse contexto, o óleo essencial de *Levisticum officinale* apresenta potencial contra *Leishmania* sp.; no entanto, mais estudos são necessários para aperfeiçoar sua seletividade e segurança, ampliando seu uso clínico e eficácia terapêutica (Basilio et al, 2024; McClements, 2011).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabe-se que as leishmanioses são doenças endêmicas de alta prevalência e mortalidade em países subdesenvolvidos. Ademais, apresenta poucas opções de tratamento, responsáveis por inúmeros efeitos colaterais. Dessa forma, é notória a necessidade de pesquisas que investiguem potenciais compostos ativos capazes de diminuir a viabilidade das células de *Leishmania* sp. com menores efeitos colaterais ou toxicidade para as células do hospedeiro. Neste sentido, os produtos naturais e óleos essenciais aparecem como uma perspectiva de fonte para novas moléculas ativas. Contudo, apesar de suas vantagens, sabe-se que produtos naturais apresentam grande quantidade de grupamentos químicos fisiologicamente ativos, fato que promove interações medicamentosas, e até mesmo indução e inibição de alguns mecanismos de ação. Outrossim, a presença destes vários compostos, torna a previsão da citotoxicidade difícil, já que identificar qual deles é o responsável por aquele efeito é, na maioria das vezes, complexo.

Sendo assim, espera-se que com o desenvolvimento de novas tecnologias e descoberta de novos potenciais fármacos, as pesquisas acerca da Leishmaniose e do óleo essencial de *Levisticum officinale* não cessem, e que em breve, esta doença deixe de ser negligenciada, passe a ser notada e torne-se prioridade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ássimos, Gabriela Ribeiro. **Caracterização genética de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* provenientes de hospedeiros humanos, cães domésticos e pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos de Minas Gerais, Brasil**. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/43599>.

Basilio, Denise Caroline Luiz Soares, Isabelly Teixeira Espinoça, Paola Mayara Valente Coronel, Rafael Seiji Nakano Ota, Anna Júlia Papa de Araujo, Nadla Soares Cassemiro, Denise Brentan Silva, et al. **“Chemical Profile and Antithrombotic Activity of the Essential Oil of *Levisticum Officinale* W.D.J.Koch (Apiaceae)”**. *Chemical Papers* 78, nº 12 (1º de agosto de 2024): 6891–6900. <https://doi.org/10.1007/s11696-024-03573-5>.

Bastos, Paulo Eduardo da Silva. **“Monitoramento tecnológico de nanoemulsões produzidas a partir de óleos essenciais e sua aplicação na saúde humana e veterinária”**. Bachelor Thesis, Brasil, 2021. <http://repository.ufrpe.br/handle/123456789/5654>.

Fermiano, Maria Helena; Das Neves, Amarith Rodrigues; Da Silva, Fernanda; Barros, Manuella Salustiano Andrade; Vieira, Camila Barbosa; Stein, André L.; Frizon, Tiago Elias Allievi; Braga, Antonio Luiz; Arruda, Carla Cardozo Pinto de; Parisotto, Eduardo Benedetti; et al. **Selenium-Containing (Hetero)Aryl Hybrids as Potential Antileishmanial Drug Candidates: In Vitro Screening against *L. amazonensis***. *Biomedicines*, v. 12, n. 1, p. 213, 2024. DOI: 10.3390/biomedicines12010213

Fiocruz. **“Leishmaniose”**. Acesso em 4 de novembro de 2024. <https://portal.fiocruz.br/doenca/leishmaniose>.

“Leishmaniose Tegumentar (LT) — Ministério da Saúde”. Acesso em 4 de novembro de 2024. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt>.

McClements, D. J. **Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities**. *Soft Matter*, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 23 dez. 2011.

Mendes, Evelyn Caroline Vicente. **“Investigação dos efeitos de fármacos**

utilizados no tratamento da leishmaniose visceral sobre a plasticidade neural mioentérica do cólon de hamsters infectados”, 6 de julho de 2023. <http://hdl.handle.net/11449/244771>.

Miran, M., Monsef Esfahani, H., Moridi Farimani, M., Ahmadi, AA, & Ebrahimi, SN (2018). **Composição do óleo essencial e atividade antibacteriana de *Levisticum officinale* Koch em diferentes estágios de desenvolvimento.** *Journal of Essential Oil Bearing Plants* , 21 (4), 1051–1055. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1507759>

Miran, Mansour, Hamidreza Monsef Esfahani, JeeHyung Jung, Atousa Aliahmadi, Danielle Skropeta, Mahdi Abbas-Mohammadi, Samad Nejad Ebrahimi, e Mahdi Moridi Farimani. **“Characterization and Antibacterial Activity of Phthalides from the Roots of the Medicinal Herb *Levisticum officinale* W.D.J. Koch”.** *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 19, nº 2 (Spring de 2020): 182. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112583.13839>.

Nascimento, Maria Isabelly Xavier do. **Avaliação do tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral em humanos: uma revisão narrativa .** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

Neves, David Pereira. **Parasitologia Humana.** 13. ed. São Paulo: Ateneu, 2016. 616 p.

Newman, David. J, Gordon M. Cragg **“Produtos naturais como fontes de novos medicamentos ao longo das quase quatro décadas de 01/1981 a 09/2019”,** *Revista de Produtos Naturais* 2020 83 (3), 770-803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285

Parise, Michelle Rocha, Alessanie Ayumi Morita Gonçalves Pereira, Orlando Carvalho de Lima Filho, Iasmin Ramos da Silva, Claudinei Alves da Silva, Adalberto Manoel da Silva, Alane Pereira Cortez, e Marize Campos Valadares. **“AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eremanthus erythropappus* SOBRE CÉLULAS K-562”.** *REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA* 10, nº1 (16 de setembro de 2021): 58–70. <https://doi.org/10.35572/rsc.v10i1.396>.

Porto, Alice Sperandio; ALMEIDA, Igor Vivian de; VICENTINI, Verônica Elisa Pimenta. **Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade .** *Revista Fitos* , Rio de Janeiro, v. 4, pág. 513-527, 2020. DOI: 10.17648 /2446 -4775.2020.1060 . Disponível em:

<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/1060>. Acesso em: 22 nov. 2024.

Resende, J. A., da Silva, M. A., Trivilin, L. O., & Cardoso, L. D. “**Potencial de nanoemulsões contendo óleos essenciais para o controle alternativo de dermatoses fúngicas em animais domésticos**”. *TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL*, Alegre (ES), 9^oed. 233-253. (2021).

Ribeiro, Luana Paula de Faria, Lívia Vilaça Cota Pereira, Marcela de Castro Bastos Rodrigues, Marayra Inês França Coury, Marcilene Rezende Silva, e Roberta Passaglia Bolina. “**Tratamento empírico com desoxicolato de Anfotericina B, em caso suspeito de Leishmaniose Visceral: um relato de caso / Empirical treatment with amphotericin B deoxycholate for a suspected case of Visceral Leishmaniasis: A case report**”. *Brazilian Journal of Development* 7, nº 2 (8 de fevereiro de 2021): 13602–9. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-125>.

Rios, Letícia Correia; Amaral, Carolina Azevedo; Pinto, Débora Carolina Sousa; Sobrinho, Vitória Rauane Simpício; Magalhães, Otávio de Oliveira; Araújo, João Guilherme Nantes; Higino, Taciana Mirely Maciel; Aliança, Amanda Silva dos Santos. Leishmaniose visceral: histórico, agente etiológico, ciclo biológico, vetor, diagnóstico e tratamento. In: PEÑA, Aris Verdecia (Org.). **Tópicos nas Ciências da Saúde: Volume X**. Nova Xavantina: Pantanal Editora, 2022. p. 98-107.

Silveira, Michele Maria Xavier. **Estudo de um derivado de aminoquinolina: citotoxicidade em macrófagos, potencial efeito em *Leishmania amazonensis* e mitocôndria**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015. Disponível em: <https://www2.ufjf.br/farmacia/wp-content/uploads/sites/161/2015/04/TCC-Michele-Maria-Xavier-Silveira.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2024

Soares, Dara da Costa. “**Atividade e expressão da metaloprotease GP63 nas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) brasiliensis***”. Disponível na internet via correio eletrônico: biblicb.420@gmail.com, junho de 2021. <https://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/15060>.

Souza, Rômicy Dermondes, Maria Alves Fontenele, Núbia Régia de Almeida, Jaqueline Pereira de Araújo, Paulo Roberto Barros Gomes, RômicyDermondes Souza, Maria Alves Fontenele, Núbia Régia de Almeida, Jaqueline Pereira de Araújo, e Paulo Roberto Barros Gomes. **“Atividade antileishmanial dos óleos essenciais: uma revisão”**. *Revista Colombiana de Ciências Químico - Farmacéuticas* 51, nº 1 (abril de 2022): 68–88. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n1.91041>.

Spreá, Rafael Mascoloti et al. **Caracterização química e bioativa da planta aromática *Levisticum officinale* WDJ Koch: um estudo abrangente** . *Food & Function* , v. 11, p. 1292-1303, 2020. DOI: 10.1039 /C9FO02841B .